

УДК 577.336

ОЦЕНКА МИТОХОНДРИАЛЬНОГО ПОТЕНЦИАЛА ИЗОЛИРОВАННЫХ ГЕПАТОЦИТОВ ПРИ ИЗМЕНЕНИИ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТАТУСА**Е.А. Аверченко, Н.С.Кавок, А.М. Степаненко, И.А.Боровой М.Ю. Малюкина***Институт сцинтилляционных материалов НТК Институт монокристаллов**НАН Украины, 61001, г. Харьков, Украина*

Поступила в редакцию 26 декабря 2009 г

Принята 15 мая 2009 г.

Методом флуоресцентных зондов оценивали изменения трансмембранного потенциала митохондрий одиночных клеток в ответ на действие экзогенных окислителей. С помощью митохондриального зонда JC-1, признанного в настоящее время среди липофильных катионных красителей наиболее специфичным в оценке $\Delta\Psi_m$ живых клеток, было показано, что под влиянием H_2O_2 и трет-бутилгидропероксида (ТБГП) в условиях продолжительной инкубации (в течение 3 часов) происходит падение трансмембранного потенциала митохондрий, которое не отменяется под влиянием дитиотрейтола.

Возрастание интенсивности флуоресценции агрегатной формы красителя в условиях стимуляции клеток адреналином ($10^{-6}M$) свидетельствовало о повышении трансмембранного потенциала митохондрий. Динамика флуоресцентного ответа на гормональный сигнал сохранялась на фоне краткосрочного воздействия пероксида водорода, однако при использовании в качестве прооксиданта ТБГП характер флуоресцентных изменений был иным. Это позволяет говорить о различиях в механизме влияния данных соединений на митохондриальные процессы и особенностях антиоксидантной защиты клетки в отношении прооксидантов разной природы. Исследования являются актуальными, учитывая современные представления о ключевой роли митохондрий в биоэнергетике клетки, в регуляторных, сигнальных и патофизиологических процессах, так как $\Delta\Psi_m$ может служить характеристикой функционального состояния митохондрий и клетки в целом.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: трансмембранный потенциал, флуоресцентные зонды, митохондрии, АФК - активные формы кислорода

Флуоресцентные зонды позволяют обнаруживать изменения в мембранах и липопротеинах, и по ним судить о молекулярных механизмах патогенеза [1,2], либо о способе и последствиях действия биологически активных веществ – например таких, как запрограммированная смерть клетки. Обнаруженные зондами изменения могут служить диагностическими признаками многих заболеваний. Зонды позволяют изучать величину поверхностного поля мембраны, обнаруживать его неоднородности, скопление зарядов, исследовать связывание ионов с мембраной, изменение потенциалов при энергизации митохондрий и субмитохондриальных частиц [3]. На интенсивность флуоресценции заряженных зондов влияют главным образом изменения поверхностного и трансмембранного потенциала в мембранных системах изучаемых клеток. Возрастание мембранного потенциала у активно метаболизирующих клеток и его снижение при ингибировании клеточных процессов отражается в изменениях интенсивности флуоресценции.

Митохондриальный трансмембранный потенциал ($\Delta\Psi_m$) тесно связан с функционированием митохондрий, создается электрохимическим градиентом протонов по обе стороны мембраны, его поддержание обеспечивается процессами переноса электронов в дыхательной цепи. $\Delta\Psi_m$ может служить характеристикой и митохондриальной функции, и состояния клетки в целом. Одноэлектронное или двухэлектронное восстановление кислорода в процессе митохондриального дыхания до

супероксида ($O_2^{\cdot-}$) или перекиси водорода является механизмом образования токсичных АФК [4]. $O_2^{\cdot-}$ и H_2O_2 – предшественники радикала гидроксила (OH^{\cdot}), сильнее окислителя, разрушающего любое вещество живой клетки, включая ДНК [5]. При нарушении в клетках окислительного баланса (оксидативный стресс) митохондрии повреждаются одними из первых. Они начинают слабее окислять субстраты за счет потребления молекулярного кислорода и, главное, теряют способность синтезировать АТФ. И то и другое, в конечном счете, связано с увеличением проницаемости мембран митохондрий для ионов и потерей разности потенциалов на митохондриальной мембране. Митохондрия, не справившаяся с проблемой детоксикации собственных АФК, погибает, что сопровождается выходом в цитозоль проапоптотических факторов. Если же все больше и больше митохондрий становятся суперпродуцентами АФК, то концентрации цитохрома *c* и других проапоптотических белков в цитозоле достигают таких значений, что начинается апоптоз клетки. В результате происходит очистка ткани от клеток, митохондрии которых образуют слишком много АФК. Установлено, что падение митохондриального потенциала является одним из признаков необратимости апоптоза. Поэтому амплитуда и направленность этих изменений $\Delta\Psi_m$ может составлять важный критерий в оценке действия регуляторных факторов на окислительный баланс и функционально-метаболическое состояние клетки.

Среди зондов позволяющих оценивать митохондриальный потенциал наиболее систематически изучены производные родамина и карбоцианины. К их преимуществам относятся возможность прижизненного наблюдения клеток и отсутствие немедленного токсического эффекта [6]. Однако следует отметить, что интерпретация результатов, полученных с помощью карбоцианиновых зондов и производных родамина, представляет определенную сложность. Ряд известных недостатков, свойственных этим флуорофорам, затрудняет их использование в измерении $\Delta\Psi_m$, к таким недостаткам можно отнести [7]:

- а) достаточно продолжительное время для достижения уравнивания;
- б) неспецифическое связывание с мембранами и их компонентами;

Более специфичным в оценке $\Delta\Psi_m$ является липофильный катион 5,5',6,6'-тетрахлор-1,1',3,3'-тетраэтилбензимидазол карбоцианин йодид (JC-1). Данное соединение избирательно накапливается в митохондриях, и при возрастании мембранного потенциала (свыше 80-100mV) происходит обратимое изменение цвета флуоресценции с зеленого на оранжевый. Эти изменения обусловлены обратимым образованием J – агрегатов красителя при поляризации мембраны, что сопровождается сдвигом длин волн испускаемого света с 520 нм (эмиссия мономерной формы JC-1) на 590 нм (эмиссия J – агрегатов) при возбуждении 490 нм. JC-1 в качестве молекулы – репортера применялся при анализе $\Delta\Psi_m$ в различных клетках млекопитающих и человека. Показано, что образование J-агрегатов происходит при определенных концентрациях красителя, определенных рН (внутримитохондриальный диапазон рН 8.0-8.2) и определенной ионной силе по сравнению с внемитохондриальным окружением. Липофильные молекулы флуорохрома аккумулируются в матриксе митохондрий с последующим образованием J-агрегатов в зависимости от $\Delta\Psi_m$. JC-1 позволяет изучать локальные изменения $\Delta\Psi_m$, и, в отличие от других красителей, визуализировать митохондрии с низким и высоким потенциалом. Образование и стабилизация агрегатов красителя в митохондриях зависит от интактности митохондрий и поддержания $\Delta\Psi_m$. Агенты и лекарственные соединения, разрушающие электрохимический градиент вызывают деполяризацию мембраны и потерю красной флуоресценции J – агрегатов. Результаты, полученные с помощью JC – 1, свидетельствуют о значительных различиях $\Delta\Psi_m$ между типами клеток и о

существовании внутриклеточных митохондриальных субпопуляций с различным потенциалом и даже указывают на его флуктуации в пределах хондриома одной клетки [8, 9].

При оценке трансмембранного потенциала митохондрий различных типов клеток с помощью красителя JC – 1 наиболее часто применяют показатели интенсивности флуоресценции мономеров и агрегатов, а также их соотношение [10].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Зонд JC–1 синтезировали в лаборатории нанокристаллических материалов ИСМА НАН Украины (г. Харьков). Исходный (1 мМ) раствор исследуемого зонда в ДМСО разводили непосредственно перед экспериментом до необходимой концентрации.

Исследования проводили на изолированных гепатоцитах крыс-самцов популяции Вистар 3 мес. возраста. Клетки выделяли неферментативным методом [11], жизнеспособность клеток по окрашиванию трипановым синим составляла 85-90%. Инкубацию клеток с красителем JC–1 (10^{-6} М) проводили в среде Игла pH 7,4 при концентрации $5 \cdot 10^5$ кл/мл. Протонофор FCCP вносили в среду инкубации в конечной концентрации 5 мкМ. В экспериментах по моделированию окислительного стресса конечная концентрация H_2O_2 в инкубационной среде составляла 500 мкМ, трет–бутил гидропероксида (ТБГП) – 50 мкМ, дитиотрейтола (ДТТ) – 2 мМ.

Наблюдение и фотографирование клеток осуществляли с помощью люминесцентного микроскопа Olympus IX71 и цифровой камеры Olympus C–5060. Для мономеров красителя JC–1 полоса возбуждения составляла 450-490 нм, полоса люминесценции 500 нм и выше. Для агрегатов эти параметры составляли – 510–560 нм и 570 нм и выше соответственно. Оценивали интегральную яркость клеток, нормализованную по отношению к фону. Разработанные нами дополнительные компоненты программного обеспечения позволяли проводить обработку в полуавтоматическом режиме.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Динамика накопления агрегатов зонда JC–1 в изолированных гепатоцитах представляла собой кривую с выходом на плато при уравнивании системы к 40 -50 минутам инкубации клеток в присутствии красителя (Рис.1). Основываясь на этих результатах, дальнейшие эксперименты проводили при окрашивании клеток не менее 1 часа.

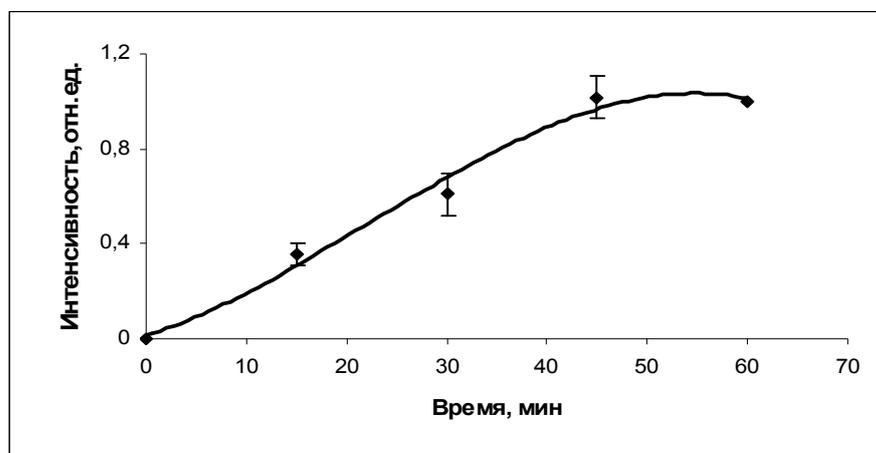


Рис.1. Динамика аккумуляции агрегатов зонда JC – 1 гепатоцитами крыс.

Было также установлено, что под влиянием протонофора FCCP происходит падение флуоресценции агрегатной формы красителя, что подтверждает чувствительность

данного параметра к изменениям митохондриального трансмембранного потенциала (Рис.2).

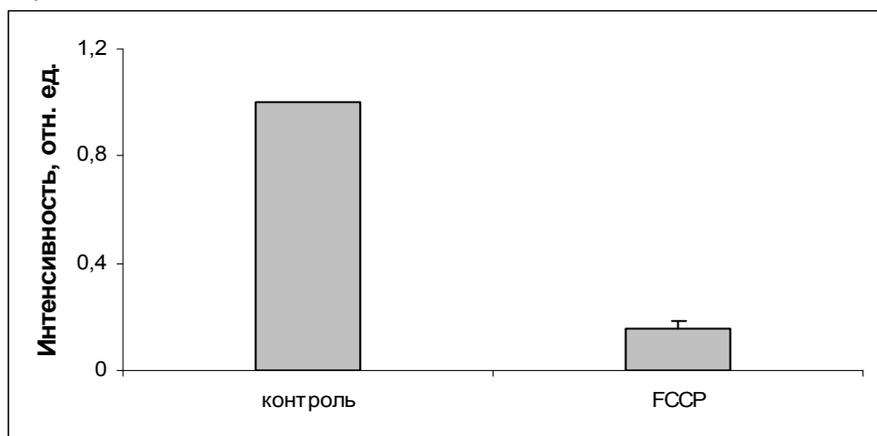


Рис. 2. Влияние протонифора FCCP на флуоресценцию агрегатов JC-1 в гепатоцитах.

Индукция оксидативного стресса добавлением перекиси водорода в среду инкубации клеток сопровождалась падением флуоресценции агрегатов красителя в условиях долгосрочного эксперимента (Рис. 3).

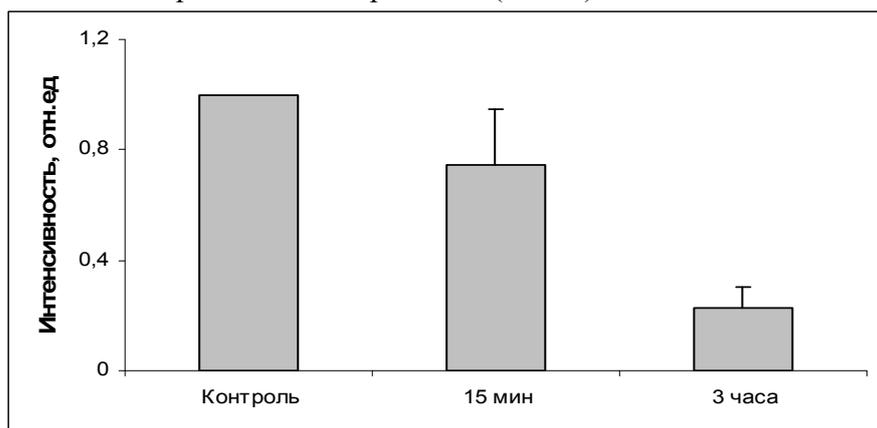


Рис. 3. Влияние H_2O_2 на интенсивность флуоресценции агрегатов JC-1 в гепатоцитах при краткосрочной и долгосрочной инкубации

Важно отметить, что действие тиолредуцирующего соединения ДТТ не отменяло снижение митохондриального потенциала клеток в данных условиях (Рис. 4).

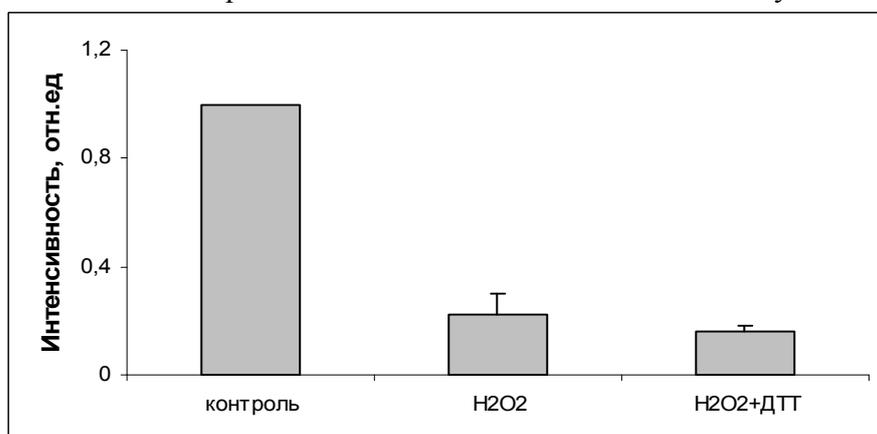


Рис. 4. Оценка протекторного действия ДТТ в условиях окислительного стресса.

Механизм повреждающего действия перекиси водорода в митохондриях может быть опосредован образованием гидроксильных радикалов, активирующих процессы перекисного окисления липидов и окисляющих сенсорные SH-группы митохондриальной поры. Наблюдаемое в настоящих исследованиях падение потенциала и отсутствие протекторного эффекта ДТТ свидетельствует о глубоких нарушениях окислительного баланса в клетках в данных экспериментальных условиях и о связи этих нарушений с развитием процессов клеточной гибели.

ТБГП - прооксидант механизм воздействия, которого связан с подавлением дыхания на уровне комплекса I, окислением NADH и NADPH, а также тиоловых групп белков, в том числе митохондриальной поры. ТБГП также повышает чувствительность поры к стимуляции Ca^{2+} [12]. В гепатоцитах разобщающее действие соединения проявляется при концентрациях ≥ 100 мкМ, при концентрациях менее 50 мкМ подавляется синтез АТФ, но разобщения не происходит [13]. В настоящих исследованиях уровень флуоресценции агрегатов JC-1 в гепатоцитах при действии ТБГП в условиях длительного эксперимента также изменялся (Рис. 5).

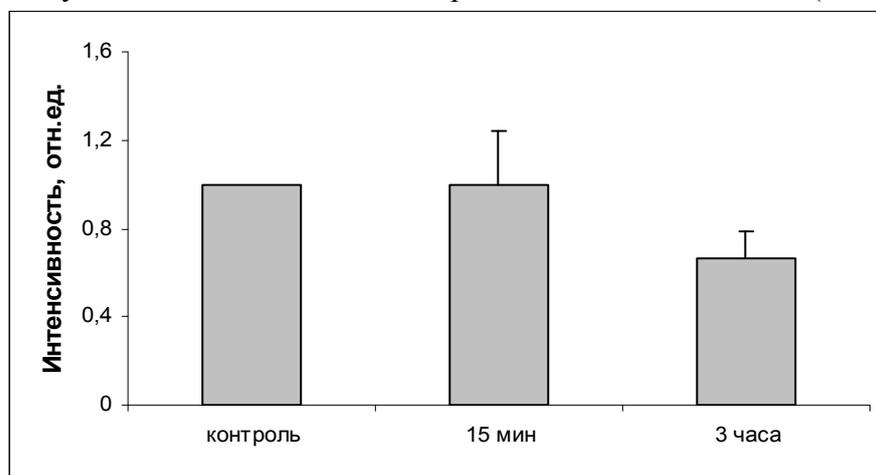


Рис. 5. Влияние ТБГП на интенсивность флуоресценции агрегатов JC-1 при краткосрочной и долгосрочной инкубации

ДТТ также не оказывал защитного действия при данной постановке эксперимента (Рис 6).

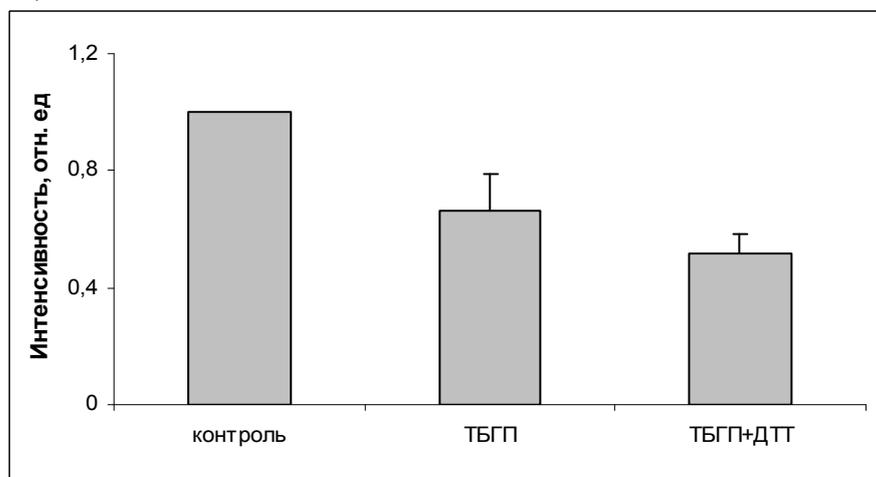


Рис. 6. Оценка эффекта ДТТ в условиях ТБГП-индуцированного стресса.

Кальций–мобилизующие стрессорные гормоны, например адреналин, активируют митохондриальные процессы и стимулируют образование активных форм кислорода в митохондриях, поэтому представляло интерес выяснить, насколько существенно в условиях развития окислительного стресса изменяется реакция клеток на воздействие данного гормона. Влияние адреналина на потенциал митохондрий оценивали в условиях непрерывного наблюдения и фотографирования одиночных клеток в автоматическом режиме. Было установлено, что адреналин стимулирует быстрое, с первых секунд воздействия, повышение потенциала митохондрий, о чем свидетельствовало увеличение интенсивности флуоресценции агрегатов зонда (Рис. 7)

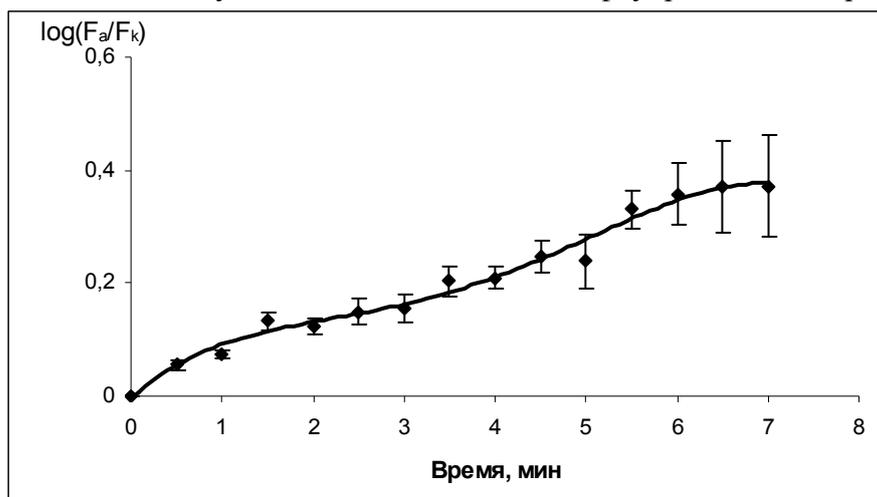


Рис. 7. Влияние адреналина (10-6М) на флуоресценцию JC-1 в гепатоцитах.

На фоне кратковременного воздействия H_2O_2 динамика ответа потенциала на адреналин не изменялась (Рис. 8).

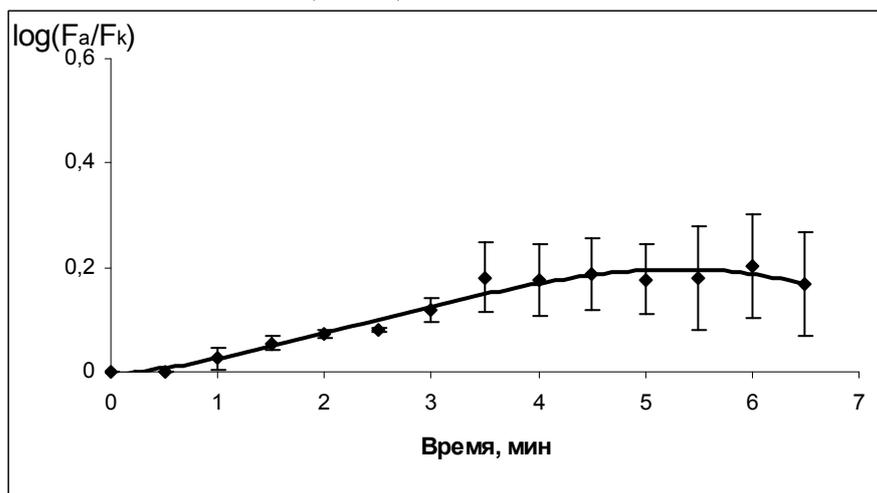


Рис. 8. Влияние адреналина на потенциал гепатоцитов в условиях кратковременного воздействия перекиси водорода.

Существенно иной характер ответа митохондриального потенциала на воздействие адреналина наблюдался в присутствии окислителя ТБГП (Рис. 9).

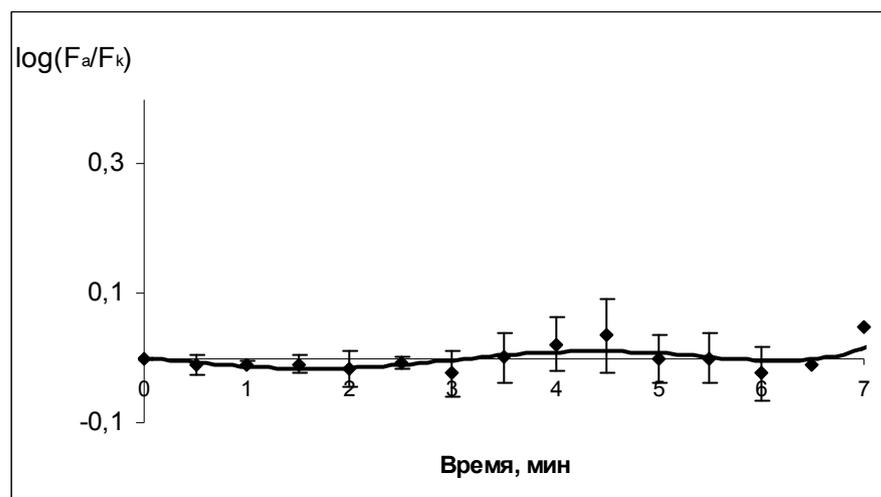


Рис. 9. Влияние адреналина на потенциал митохондрий в условиях кратковременного воздействия ТБГП

Подобные различия в действии прооксидантов возможно объясняются более специфичным эффектом ТБГП в отношении тиоловых групп митохондриальной поры. Их окисление приводит к повышению чувствительности поры к индуцирующему действию ионов кальция. Мобилизация внутриклеточного кальция под действием гормонального стимула на фоне вызванных действием прооксидантом изменений, возможно, является пусковым механизмом обнаруженного эффекта. С другой стороны, высокая каталазная активность, свойственная клеткам печени может также снижать повреждающее действие экзогенного пероксида в условиях кратковременной инкубации. Таким образом, обнаруженные в действии прооксидантов различия объясняются как наличием специфичных внутриклеточных мишеней для повреждающего эффекта и особенностями реакции системы антиоксидантной защиты.

ВЫВОДЫ

Использование в качестве оптического индикатора митохондриальной функции зонда JC-1 позволяет на уровне одиночных клеток оценивать динамические изменения трансмембранного потенциала. Применение данного подхода позволило выявить особенности реакции клеток на воздействие окислителей разной природы. Влияние пероксида водорода на начальные этапы активации митохондрий под влиянием гормонального стимула было менее заметным по сравнению с ТБГП. Способность сульфгидрильного окислителя нарушать процессы гормональной регуляции в митохондриях свидетельствует о важной роли баланса сульфгидрильных групп в физиологии и патофизиологии органелл.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Freedman J.C., Novak T.S. Membrane potentials associated with Ca-induced K conductance in human red blood cells: studies with a fluorescent oxonol dye, *WW 781//J Membr Biol.* -1983. 72, 59-74
2. Gross D., Loew L.M., Webb W.W. Optical imaging of cell membrane potential changes induced by applied electric fields//*Biophys J.*1986. 50. 339-348
3. Флуоресцентные зонды в исследовании биологических мембран./ Ю.А. Владимиров, Г.Е. Добрецов – М.: Наука, 1980. - 318 с.
4. В.П. Скулачев. Явления запрограммированной смерти. Митохондрии, клетки и органы: роль активных форм кислорода // *Соросовский образовательный журнал.* 2001. № 6. С.4-10.
5. Ю.А. Владимиров. Свободные радикалы в живых системах // *Соросовский образовательный журнал.* 2000. № 6. С.13-19.

6. Johnson L.V., Walsh M.L., Chen L.B. Localization of mitochondria in living cells with rhodamine 123//Proc Natl Acad Sci USA. 1980. 77. 990.
7. Salvioli S., Ardizzoni A., Franceschi C., Cossarizza A. JC-1, but not DiOC₆(3) or rhodamine 123, is a reliable fluorescent probe to assess $\Delta\Psi$ changes in intact cells: implication for studies on mitochondrial functionality during apoptosis//FEBS Letters 1997. P. 77-82.
8. Diaz G., Setzu M.D., Zucca A., Isola R., Diana A., Murru R., Sogos V., Gremo F. Subcellular heterogeneity of mitochondrial membrane potential: relationship with organelle distribution and intercellular contacts in normal, hypoxic and apoptotic cells// Journal of Cell Science 1999.112, 1077-1084.
9. Diaz G., Falchi A., Gremo F., Isola R., Andrea D. Homogeneous longitudinal profiles and synchronous fluctuations of mitochondrial transmembrane potential//FEBS Letters 2000 475 218-224.
10. DiLisa F., Blank P.S., Colonna R., Gambassi G., Silverman H.S., Stern M.D., Hansford R.G. Mitochondrial membrane potential in single living adult rat cardiac myocytes exposed to anoxia or metabolic inhibition//Journal of physiology 1995. 486, 1. 1-13.
11. Канаева И.П., Карякин А.В., Аленичева Т.В., Бурмакова Г.А., Алимов Г.А. и др. //Цитология.1975. Т.17. с 545-551.
12. Connern C.P., Halestrap A.P. Recruitment of mitochondrial cyclophilin to the mitochondrial inner membrane under conditions of oxidative stress that enhance the opening of a calcium-sensitive non-specific channel//Biochem. J. 1994. 302, 321-324.
13. Imberti R., Nieminen A.L., Herman B., Lemasters J.J. Mitochondrial and glycolytic dysfunction in lethal injury to hepatocytes by t-butylhydroperoxide: protection by fructose, cyclosporin A and trifluoperazine //J. Pharmacol. Exper. Ther. 1993.265, 392-400.