

К ВОПРОСУ О ФЕНОМЕНЕ МИТОХОНДРИАЛЬНОГО “АФК-ИНДУЦИРОВАННОГО ВЫБРОСА АФК”

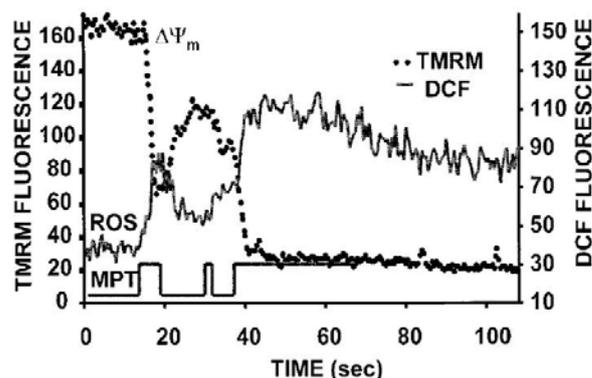
И.Р. Абдрахимова¹, Ф.А. Абдрахимов²

¹ ФГАОУ ВПО Казанский (Приволжский) федеральный университет, Институт фундаментальной медицины и биологии, кафедра биохимии и биотехнологии, Казань, e-mail: yoldez.abdrahimo@kpfu.ru

² ФГБУН Институт биохимии и биофизики КазНЦ РАН, Казань, e-mail: abdrakhimov@mail.knc.ru

Научный интерес к проблеме внутриклеточной генерации активных форм кислорода (АФК или ROS) и их метаболизму не снижается в течение почти полвека, беря свое начало от работ научной школы основателя редокс-биологии В.Chance на выделенных органоидах, ставших уже классическими (Boveris et al., 1972; и др.). На рубеже веков исследования субклеточно-локализованных процессов производства АФК получили “второе дыхание” благодаря прорывному развитию имиджинговых технологий в микроскопии, направленных на увеличение пространственно-временного разрешения, которое позволило наблюдать динамические процессы в живых клетках в режиме реального времени. Одними из таких явились исследования Д.Б. Зорова с соавт. (Zorov et al., 2000, и др.), которые на уровне отдельных митохондрий кардиомиоцитов обнаружили скоординированную противофазность изменений интенсивности флуоресценции специфических красителей – TMRM и DCF, отражающих флуктуации трансмембранного потенциала ($\Delta\psi$) и АФК, соответственно (рис. 1). Фотоактивация флуоресцентных красителей при сканировании образцов лазером вызывала, по мнению авторов, короткую «вспышку» (5-10 с) образования “триггерных” АФК (см первый пик флуоресценции DCF на рис. 1). Это индуцировало, в данном случае через 20 с, большее по амплитуде и длительности увеличение флуоресценции DCF, за что и получило название митохондриального АФК-индуцированного высвобождения АФК (‘ROS-induced ROS release’, RIRR) (Zorov et al., 2000). Связанные с RIRR “зеркальные” изменения $\Delta\psi$, а именно его необратимое падение, было обусловлено, судя по входу в митохондрии инертного флуоресцентного индикатора кальцеина (~620 Да), с открытием митохондриальных мегаканалов или мегапор (MPT, или ‘mitochondrial permeability transition’, на рис. 1). Авторы заключили об обусловленности феномена RIRR индукцией MPT, причем, что представляется важным, был отмечен ее обратимый характер в кластере соседствующих митохондрий (Zorov et al., 2000). Как известно, MPT характеризуется высоко- и низкопроводящим состояниями, которые отличаются, в первую очередь, обратимостью открывания мегаканала в ответ на индуцирующие факторы, в т. ч. АФК. В настоящее время постулируется существование и третьего, промежуточного, состояния MPT, которое обуславливает транзиторные динамические события, наблюдаемые как высокоамплитудные флуктуации интенсивности флуоресценции АФК-детектирующих систем в митохондриях, получивших название “митофлешей” (‘mitoflashes’) (Wang et al., 2008; 2016; Hou et al., 2014).

Рис. 1. Скоординированные изменения интенсивности флуоресценции TMRM ($\Delta\psi$) и DCF (АФК) в митохондриях кардиомиоцитов крысы (по: Zorov et al., 2000).



Вместе с тем в литературе последних лет разгорелась жаркая дискуссия по поводу природы митофлешей (Wang et al., 2008,2016; Schwarzländer et al., 2011; Santo-Domingo et al., 2013; Hou et al., 2014; и др.). Основным аргументом противников признания АФК-обусловленной природы “митофлешей” является высокая чувствительность к

изменениям pH, а именно защелачиванию, матрикса митохондрий флуоресцентных белков, в первую очередь cpYFP (circularly permuted yellow fluorescent protein) (Santo-Domingo et al., 2013) (рис. 2).

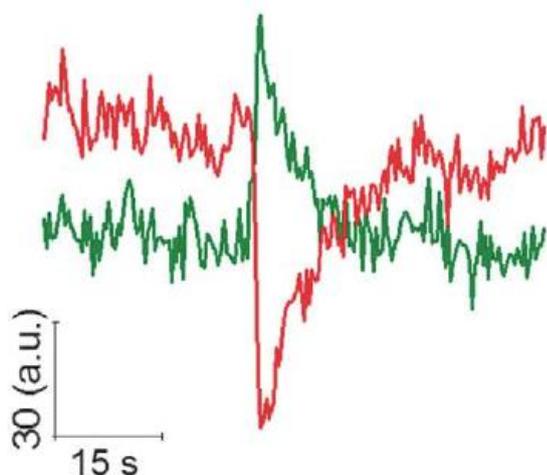


Рис. 2. «Зеркальность» обратимых флуктуаций $\Delta\psi$ и ΔpH матрикса митохондрий клеток HeLa по флуоресценции TMRM (красная кривая) и Mito-SypHer (зеленая), соответственно (по Santo-Domingo et al., 2013).

Нами изучались динамические события с использованием TMRM и DCF, исходя из факта относительной нечувствительности этих синтетических красителей к изменениям pH в диапазоне от 6,0 до 9,5. В качестве объектов исследований были использованы этиолированные проростки озимой пшеницы (*Triticum aestivum* L., сорт Мироновская 808), выращенные гидропонным способом (23–25 °C, 3 сут) в темноте. Образцы после двойного окрашивания 0,5 μM TMRM and 10 μM DCF просматривали в Zeiss CLSM META 510 с последующим мультитрековым анализом, что позволило визуализировать “вспышки” как высокоамплитудные флуктуации интенсивности флуоресценции используемых красителей (рис. 3).

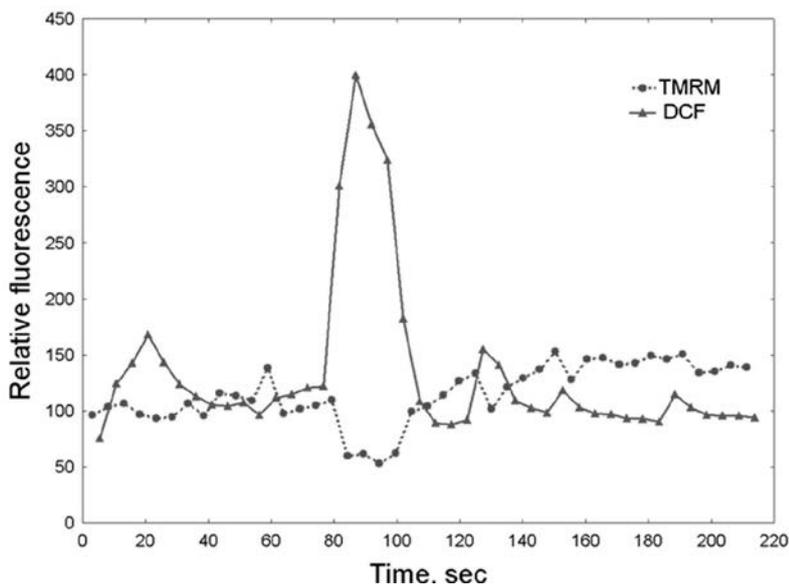


Рис. 3. Динамика изменений флуоресценции TMRM и DCF в индивидуальной митохондрии клетки coleoptilia пшеницы.

Следует отметить, что наблюдаемые динамические события не были связаны с взаимодействием индикаторов между собой и другими побочными эффектами, поскольку детектировались и при их использовании по отдельности. Анализ полученных данных показал, что несмотря на преимущественно “зеркальный” характер транзиторных изменений $\Delta\psi$ и АФК в митохондриях, случаи асинхронности данных процессов тоже были нередки (см. рис. 3). Обращает также внимание на себя тот факт, что относительная интенсивность флуоресценции DCF при этом может изменяться более чем в 3–4 раза, тогда как таковые TMRM были не столь драматичными (см.рис. 3).

Мультитрековый анализ показал, что линейный коэффициент корреляции г-Пирсона между изменениями флуоресценции DCF и TMRM в индивидуальных пульсациях варьирует от -0,95 ($P < 0,05$) до менее чем -0,1 (отсутствие корреляции). Последнее позволяет заключить, что обнаруженные нами динамические события, а именно транзиторные высокоамплитудные флуктуации $\Delta\psi$ и генерации АФК, детектируемые по изменениям интенсивности флуоресценции соответствующих индикаторов на уровне индивидуальных митохондрий, не ограничены разными состояниями МРТ.

Литература

Boveris A., Oshino N., Chance B. The cellular production of hydrogen peroxide // *Biochem. J.* – 1972. – V. 128. – P. 617–630.

Hou T., Wang X., Ma Q. et al. Mitochondrial flashes: new insights into mitochondrial ROS signaling and beyond // *J Physiol.* – 2014. – V. 592. – P. 3703–3713.

Santo-Domingo J., Giacomello M., Poburko D. et al. OPA1 promotes pH flashes that spread between contiguous mitochondria without matrix protein exchange // *The EMBO Journal.* – 2013. – V. 32. – P. 1927–1940.

Schwarzländer M., Logan D.C., Fricker M.D. et al. The circularly permuted yellow fluorescent protein cpYFP that has been used as a superoxide probe is highly responsive to pH but not superoxide in mitochondria: implications for the existence of superoxide ‘flashes’ // *Biochem. J.* – 2011. – V. 437. – P. 381–387.

Wang W., Fang H., Groom L. et al. Superoxide flashes in single mitochondria // *Cell.* – 2008. – V. 134. – P. 279–290.

Wang W., Gong G., Wang X. et al. Mitochondrial Flash: Integrative Reactive Oxygen Species and pH Signals in Cell and Organelle Biology // *Antiox. Redox Signal.* – 2016. – V. 25. – P. 534–549.

Zorov D.B., Filburn C.R., Klotz L.O. et al. Reactive oxygen species (ROS)-induced ROS release: a new phenomenon accompanying induction of the mitochondrial permeability transition in cardiac myocytes // *J. Exp. Med.* – 2000. – V. 192. – P. 1001–1014.