

УДК 577.352.5

МОДУЛЯТОРИ ТРАНСМЕМБРАННОГО КАЛЬЦІЄВОГО ОБМІНУ В МІТОХОНДРІЯХ МІОМЕТРІЯ ЗМІНЮЮТЬ ЇХНІЙ ГІДРОДИНАМІЧНИЙ ДІАМЕТР

Н. В. КАНДАУРОВА, О. Ю. ЧУНІХІН, Л. Г. БАБІЧ,
С. Г. ШЛИКОВ, С. О. КОСТЕРІН

Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України, Київ;
e-mail: natanau@rambler.ru

Досліджено вплив модуляторів обміну іонів Са в мітохондріях – олігоміцину, Mg^{2+} та рутенієвого червоного (RuR) – на розмір та гранулярність цих субклітинних структур, одержаних із гладенького м'яза матки. Методом фотонної кореляційної спектроскопії показано, що середній гідродинамічний діаметр ізольованих мітохондрій становить 655 ± 14 нм ($n = 5$; контроль). Внесення олігоміцину (1 мкг/мл) – інгібітора F_0 -компонента АТР-синтази, вірогідно індукує збільшення середнього гідродинамічного діаметра мітохондрій до 913 ± 75 нм ($n = 5$), що на 39% більше від контролю. У присутності в середовищі інкубації як RuR (10 мкМ), який є блокатором Ca^{2+} -уніпортеру, так і іонів Mg (7 мМ), середній гідродинамічний діаметр мітохондрій вірогідно збільшується відносно контролю до 788 ± 28 ($n = 5$) та 788 ± 38 ($n = 5$) нм відповідно, що на 17% більше від контрольного значення. Методом проточної цитометрії встановлено, що олігоміцин (1 мкг/мл) спричинює збільшення бокового світлорозсіювання у суспензії ізольованих мітохондрій. Додавання RuR (10 мкМ) та Mg^{2+} (7 мМ) практично не призводить до суттєвих змін параметра бокового світлорозсіювання. Отже, гранулярність мітохондрій суттєво збільшується під впливом олігоміцину, але залишається майже незмінною за дії Mg^{2+} та RuR.

Ключові слова: міометрій, ізольовані мітохондрії, фотонна кореляційна спектроскопія, проточна цитометрія.

Мітохондріям належить важлива роль у забезпеченні функціонування клітин, зокрема, у контролі внутрішньоклітинних кальцієвих транзєнтів, термінації кальцієвих сигналів у цитозолі [1, 2].

Виникнення різноманітних патологічних станів супроводжується порушенням структурно-функціональних, а саме, Ca^{2+} -транспортних властивостей мітохондрій [2, 3]. Показано, що вони зазнають порушень у разі реперфузії та ішемії серця, мозку, нирок; їхні дисфункції мають місце при нейродегенеративних хворобах – Паркінсона, Альцгеймера, а також при кардіопатіях [4, 5]. Отже, дослідження змін структури та розміру мітохондрій можна використовувати як тест на наявність патологічних змін організмів. З іншого боку, не можна виключати, що зміни у трансмембранному обміні іонів Са в мітохондріях можуть супроводжуватися також зміною їхніх структурно-функціональних та фізико-хімічних, зокрема осмотичних властивостей.

Вивчення морфології мітохондрій здійснюють за допомогою різноманітних підходів. Найпоширенішими, поряд з електронною

мікроскопією, є дослідження їхньої структури та розміру за зміною бокового світлорозсіювання з використанням спектрофлуориметра [6, 7] або за зміною прямого світлорозсіювання з використанням спектрофотометра [8, 9]. У 2003 р. G. Mattiasson та колеги [10] запропонували використовувати для визначення розміру та об'єму мітохондрій метод проточної цитометрії [11]. Також дослідження гідродинамічного діаметра мітохондрій клітин міометрія проводили за допомогою методу фотонної кореляційної спектроскопії [12].

Мета цієї роботи – дослідження впливу модуляторів трансмембранного обміну іонів Са – олігоміцину, Mg^{2+} та RuR – на розмір та гранулярність мітохондрій міометрія шурів.

Матеріали і методи

Препарат ізольованих мітохондрій одержували з міометрія невагітних шурів за допомогою методу диференціального центрифугування [13]. Одержаний препарат суспендували у буфері такого складу: 10 мМ HEPES (рН 7,4), 250 мМ цукроза, 1 мМ EGTA (температура 4 °С).

Визначення концентрації протеїну фракції мітохондрій проводили за методом Бредфорд [14]. Вміст протеїну у пробі становив 50 мкг/мл.

Для електронно-мікроскопічних досліджень осад мітохондрій фіксували в розчині глутарового альдегіду та чотириокису осмію, потім обезводнювали в ацетоні. Препарати просочували та полімеризували в епоксидній смолі «Епон-Аралдит». Ультратонкі зрізи забарвлювали уранілацетатом, а потім свинцевим барвником за E. Reynolds [15]. Зрізи переглядали та фотографували за допомогою електронного мікроскопа H-600.

Функцію розподілу мітохондрій за розміром визначали методом фотонної кореляційної спектроскопії [16] за допомогою лазерного кореляційного спектрометра Malvern Instruments «ZetaSizer-3» (Велика Британія), обладнаного He-Ne-лазером ЛГН-111 (потужність $P = 25$ мВт, $\lambda = 633$ нм). Реєстрацію лазерного випромінювання, розсіяного ($RI = 1,33$) від суспензії мітохондрій, проводили одразу після внесення ефекторів протягом 60 сек при температурі $+22$ °С під кутом розсіювання 90° . Одержані результати вимірювань обробляли за допомогою комп'ютерної програми PCS-Size mode v1.61.

Дослідження бокового та прямого світлорозсіювання мітохондрій проведено на проточному цитометрі COULTER EPICS XL™ (Beckman Coulter) з аргонним лазером ($\lambda_{\text{буд.}} = 488$ нм). Результати цих експериментів аналізували за допомогою програми SYSTEM II™ Software (Beckman Coulter, США). Для досліджень використовували протокол аналізу зразків, як описано нами раніше [17]. У протокол вводили логічне обмеження для реєстрації зразків за прямим та боковим світлорозсіюванням, яке реєстрували одразу після внесення ефекторів. Аналіз проб припиняли в умовах реєстрації 10 000 подій у межах області вимірювання (15–20 сек).

Тестування чистоти фракції ізольованих мітохондрій міометрія за допомогою проточного цитометра проводили з використанням флуоресцентного маркера NAO (10-nonyl acridine orange) в концентрації 100 нМ ($\lambda_{\text{буд.}} = 488$ нм, $\lambda_{\text{фл.}} = 525$ нм), як описано нами раніше [17]. Введення у протокол експерименту логічного обмеження за NAO-позитивними частками дає можливість реєструвати зміни параметрів світлорозсіювання саме в мітохондріях. Усі проби мали більше ніж 95% «NAO-позитивних» подій, що підтверджує їхнє «мітохондріальне» походження.

Реєстрацію бокового та прямого світлорозсіювання в суспензії мітохондрій, а також їхнього гідродинамічного діаметра проводили в середовищі інкубації наступного складу: 20 мМ HEPES (pH=7,4), 250 мМ цукроза, 100 мкМ P_i (у вигляді K^+ -фосфатного буфера, pH =7,4), 0,5 мМ $MgCl_2$, 5 мМ сукцинат натрію (температура 22 °С).

У роботі використовували реактиви: D-(+) – цукрозу, NAO, HEPES, сукцинат натрію (Sigma, США), а також інші реактиви вітчизняного виробництва кваліфікації чда та хч.

Результати та обговорення

Фракцію ізольованих мітохондрій міометрія досліджували методом електронної мікроскопії. Електронна мікрофотографія (рис. 1) демонструє всі морфологічні ознаки інтактності мітохондрій у фракції: неушкоджені внутрішня та зовнішня мітохондріальні мембрани, наявність крист.

За результатами електронно-мікроскопічних досліджень оцінювали форму та характеристичні розміри мітохондрій в одержаних фракціях. Діаметр мітохондрій складав 500–700 нм, вони мали еліпсоїдальну форму з ексцентриситетом 0,8–1,0. Ретельніше охарактеризувати геометричні розміри ізольованих мітохондрій можна із використанням методу фотонної кореляційної спектроскопії, який дає можливість одержати функцію розподілу гідродинамічного діаметра мітохондрій (рис. 2). За допомогою лазерного кореляційного спектрометра показано, що найвірогідніший середній гідродинамічний діаметр ізольованих мітохондрій становить 655 ± 14 нм ($n = 5$), що корелює з даними електронної мікроскопії (рис. 1).

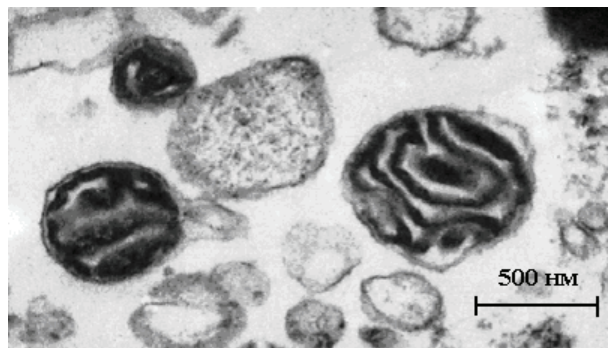


Рис. 1. Електронна мікрофотографія ізольованих мітохондрій міометрія. Збільшення в 20 000 разів, середній діаметр мітохондрій 600 нм

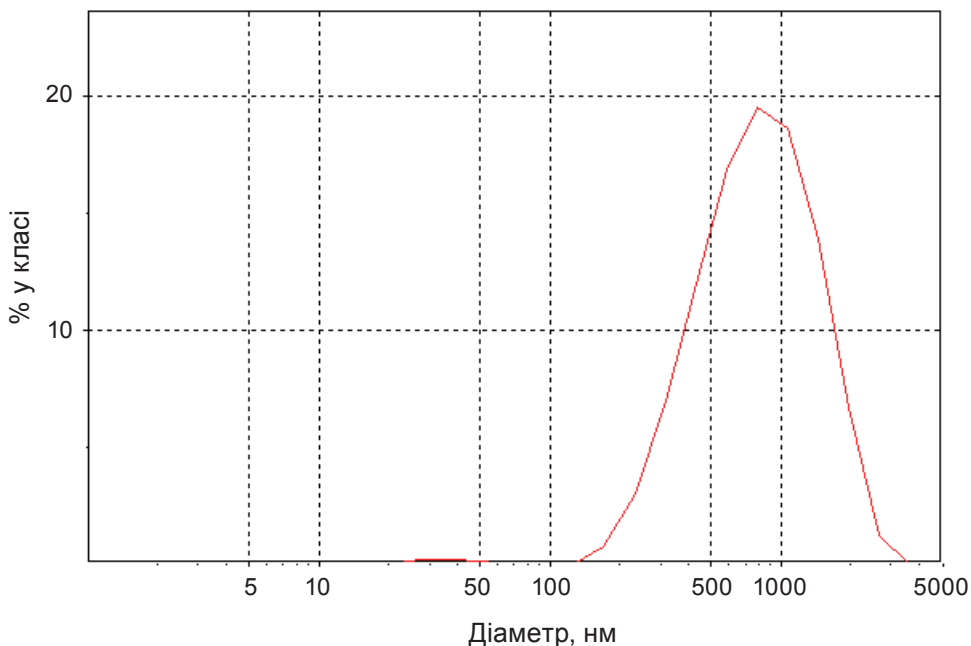


Рис. 2. Типова функція розподілу гідродинамічного діаметра мітохондрій міометрія

Раніше із використанням ізотопної ($^{45}\text{Ca}^{2+}$) та флуоресцентної техніки нами було продемонстровано, що ізольовані мітохондрії міометрія здатні накопичувати іони Ca; модулятори обміну іонів Ca через мітохондріальну мембрану (протонофор СССР, RuR, Mg^{2+} , олігоміцин) унеможлилювали цей процес [13, 18–20].

Додавання до ізольованих мітохондрій модуляторів – олігоміцину, RuR та Mg^{2+} – призводило до зміни середнього гідродинамічного діаметра субклітинних структур у порівнянні з контролем.

Дійсно, як можна бачити на рис. 3, під впливом олігоміцину (1 мкг/мл) – інгібітора постачання протонів до матриксу мітохондрій по каналу F_0 [21], відбувається вірогідне збільшення середнього гідродинамічного діаметра мітохондрій до 913 ± 75 нм ($n = 5$), що на 39% більше від контролю (стовпчики 2 та 1 відповідно).

Додавання 10 мкМ RuR та 7 мМ Mg^{2+} також призводить до вірогідного збільшення середнього гідродинамічного діаметра мітохондрій. У присутності в середовищі інкубації RuR та Mg^{2+} (рис. 3, стовпчики 3 та 4 відповідно) середній гідродинамічний діаметр мітохондрій становить 788 ± 38 та 788 ± 28 нм ($n = 5$) відповідно. Отже, обидва модулятори збільшують гідродинамічний діаметр мітохондрій на 16,8% відносно контролю (рис. 3, стовпчик 1).

З метою дослідження особливості структури мітохондрій в умовах дії модуляторів обміну Ca^{2+} застосували метод проточної цитометрії із вимірюванням показника бокового світлорозсіювання (side scatter – SS). Цей показник (розсіювання під кутом 90°) відображає оптичну неоднорідність клітин чи субклітинних структур, характер включення та гранулярність досліджуваного об’єкта.

Показано (рис. 4), що у відповідь на додавання олігоміцину (1 мкг/мл) до фракції

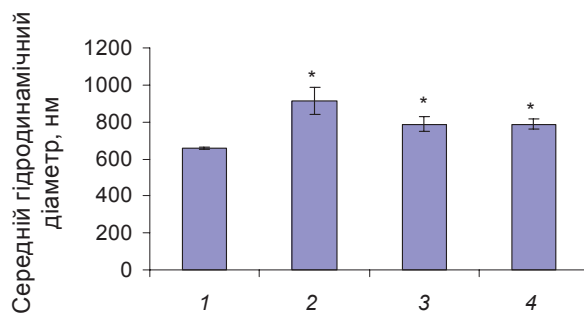


Рис. 3. Значення гідродинамічного діаметра ізольованих мітохондрій міометрія. Метод фотонної кореляційної спектроскопії ($M \pm m$, $n = 5$). 1 – стандартне середовище інкубації (контроль), 2 – за додавання олігоміцину (1 мкг/мл), 3 – за додавання RuR (10 мкМ), 4 – за додавання Mg^{2+} (7 мМ). *Різниця відносно контролю вірогідна ($P < 0,05$)

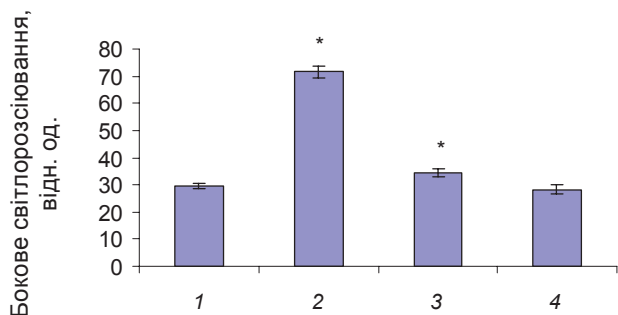


Рис. 4. Бокове світлорозсіювання ізольованих мітохондрій міометрія. Метод проточної цитометрії ($M \pm m$, $n = 5$). 1 – стандартне середовище інкубації (контроль), 2 – за додавання олігоміцину (1 мг/мл), 3 – за додавання RuR (10 мкМ), 4 – за додавання Mg^{2+} (7 мМ). *Різниця з контролем вірогідна ($P < 0,05$)

ізольованих мітохондрій реєструється вірогідне збільшення бокового світлорозсіювання (зсув вправо геометричного положення піка параметра SS) по відношенню до контролю (стовпчики 2 та 1 відповідно). В нашому випадку збільшення бокового світлорозсіювання під впливом олігоміцину свідчить про збільшення гранулярності мітохондрій.

Додавання 10 мкМ RuR та 7 мМ Mg^{2+} (стовпчики 3 та 4 відповідно), на відміну від олігоміцину (стовпчик 2), практично не призводить до змін параметра бокового світлорозсіювання в порівнянні з контролем (стовпчик 1).

Метод проточної цитометрії також використовується для дослідження розміру біологічних об'єктів. З цією метою реєструють такий параметр, як пряме світлорозсіювання (forward scatter – FS). Пряме (мале кутове) світлорозсіювання – це розсіювання світла від поверхні клітин чи субклітинних структур під малими кутами (1–19°), пропорційно діаметру досліджуваного об'єкта.

Проте вважають, що дослідження змін діаметра мітохондрій міометрія за параметром прямого світлорозсіювання FS проточного цитометра COULTER EPICS XL™ (Beckman Coulter) не є коректним. Це пов'язано, перш за все, з конструктивними особливостями прямого каналу [22], в якому розташована блокуюча діафрагма (Blocker Bar), що перешкоджає надходженню лазерного випромінювання до фотодетектора за відсутності або малим розміром частинок у зоні детекції. Тому варіації розміру мітохондрій, що мають діаметр близький до довжини хвилі збудження, не впливають на інтенсивність малокутового розсіювання.

Дійсно, в наших дослідженнях параметр FS залишається практично незмінним. Середнє значення параметра FS ізольованих мітохондрій (контроль) та в умовах додавання ефекторів (1 мкг/мл олігоміцину, 10 мкМ RuR, 7 мМ Mg^{2+}) не змінюється і становить близько 21.

Таким чином, ізольовані мітохондрії міометрія охарактеризовані нами за допомогою методів проточної цитометрії та фотонної кореляційної спектроскопії. Показано, що під впливом олігоміцину RuR та Mg^{2+} відбувається вірогідне збільшення гідродинамічного діаметра зазначених субклітинних структур. Проте гранулярність мітохондрій суттєво збільшується лише під впливом олігоміцину, RuR дуже незначно впливає на неї, а іони Mg практично не впливають.

Зазначені факти слід брати до уваги під час аналізу експериментальних результатів, одержаних у разі вивчення впливу модуляторів трансмембранного обміну іонів Ca на фізико-хімічні та структурно-функціональні властивості мітохондрій, зокрема на їхню іонно-осмотичну рівновагу.

Автори висловлюють вдячність к.б.н. Чернишову Володимирі Івановичу за допомогу у проведенні електронно-мікроскопічних досліджень.

Виконання цієї роботи підтримано програмами:

1. Державна цільова науково-технічна програма «Нанотехнології та наноматеріали», проект № 5.18.4.1-22/10.

2. Цільова комплексна міждисциплінарна програма наукових досліджень НАН України «Фундаментальні основи молекулярних та клітинних біотехнологій», проект №13/1(4)-31/10.

МОДУЛЯТОРЫ ТРАНСМЕМБРАННОГО КАЛЬЦИЕВОГО ОБМЕНА В МИТОХОНДРИЯХ МИОМЕТРИЯ ИЗМЕНЯЮТ ИХ ГИДРОДИНАМИЧЕСКИЙ ДИАМЕТР

Н. В. Кандаурова, А. Ю. Чунихин,
Л. Г. Бабич, С. Г. Шлыков, С. А. Костерин

Институт биохимии им. А. В. Палладина
НАН Украины, Киев;
e-mail: natanau@rambler.ru

Исследовано влияние модуляторов обмена ионов Ca в митохондриях – олигомицина, Mg^{2+} и рутениевого красного (RuR) – на размер и гранулярность этих субклеточных структур,

полученных из гладких мышц матки. Методом фотонной корреляционной спектроскопии показано, что средний гидродинамический диаметр изолированных митохондрий составляет 655 ± 14 нм ($n = 5$; контроль). Внесение олигомицина (1 мкг/мл) — ингибитора F_0 -компонента АТФ-синтазы — достоверно индуцирует увеличение среднего гидродинамического диаметра митохондрий до 913 ± 75 нм ($n = 5$), что на 39% больше контрольного значения. В присутствии в среде инкубации как RuR (10 мкМ), который является ингибитором Ca^{2+} -унипортера, так и Mg^{2+} (7 мМ), средний гидродинамический диаметр достоверно увеличивается по отношению к контролю до 788 ± 28 и 788 ± 38 нм ($n = 5$) соответственно, что на 17% больше контрольного значения. Методом проточной цитометрии показано, что олигомицин (1 мг/мл) вызывает увеличение бокового светорассеивания в суспензии изолированных митохондрий. Добавление RuR (10 мкМ) и Mg^{2+} (7 мМ) практически не приводит к существенным изменениям параметра бокового светорассеивания изолированных митохондрий. Таким образом, гранулярность митохондрий существенно увеличивается под влиянием олигомицина, но остается практически неизменной в присутствии Mg^{2+} и RuR.

Ключевые слова: миометрий, изолированные митохондрии, фотонная корреляционная спектроскопия, проточная цитометрия.

MODULATORS OF TRANSMEMBRANE CALCIUM EXCHANGE IN MYOMETRIUM MITOCHONDRIA CHANGE THEIR HYDRODYNAMIC DIAMETER

N. V. Kandaurova, A. Ju. Chunikhin, L. G. Babich, S. G. Shlykov, S. O. Kosterin

Palladin Institute of Biochemistry, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv; e-mail: natanau@rambler.ru

S u m m a r y

The influence of modulators of calcium exchange in mitochondria — oligomycin, Mg^{2+} and ruthenium red (RuR) — on the myometrium mitochondria size and granularity was studied in the work. The study of the mitochondria size was carried out using the photon correlation spectroscopy. It was shown that the average hydrodynamic diameter was 655 ± 14 nm ($n = 5$; control). The addition of oligomycin (1 μ g/ml) — the inhibitor of ATP-synthase F_0 -component, increases the

mitochondria average hydrodynamic diameter to 913 ± 75 nm ($n = 5$), that is by 39% more than the control. In the presence of RuR (10 μ M) (Ca^{2+} -uniporter inhibitor) and Mg^{2+} (7 mM) the mitochondria average hydrodynamic diameter increases to 788 ± 28 and 788 ± 38 nm ($n = 5$) respectively, that is by 17% more than the control. Using flow cytometry it was shown, that oligomycin (1 μ g/ml) causes the increase of side scattering of the mitochondria. Addition of RuR (10 μ M) and Mg^{2+} (7 mM) does not lead to significant changes in side scattering of the mitochondria. So it was shown that oligomycin significantly increases mitochondria granularity, but Mg^{2+} and RuR have no influence on this parameter

Key words: myometrium, isolated mitochondria, photon correlation spectroscopy, flow cytometry.

1. Костерин С. А. Транспорт кальция в гладких мышцах. — К.: Наук. думка, 1990. — 216 с.
2. Duchen M. R. // Mol. Aspects Med. — 2004. — 4. — P. 365–451.
3. Костюк П. Г., Костюк О. П., Лук'янець О. О. Иони кальцію у функції мозку — від фізіології до патології. — К.: Наук. думка, 2005. — 200 с.
4. Torneo D., Cena V., Gonzalez-Garcia G., Jordan J. // Rev. Neurol. — 2002. — 35, N 4. — P. 354–361.
5. Baloyannis S. J. // J. Alzheimers Dis. — 2006. — 9, N 2. — P. 119–26.
6. Friberg H., Connern C., Halestrap A. P., Wieloch T. // J. Neurochem. — 1999. — 72, N 6. — P. 2488–2497.
7. Korge P., Honda H. M., Weiss J. N. // Am. J. Physiol. Cell Physiol. — 2001. — 280, N 3. — P. 517–526.
8. Brustovetsky N., Dubinsky J. M. // J. Neurosci. — 2000. — 20, N 1. — P. 103–113.
9. Hansson M. J., Mansson R., Mattiasson G. et al. // J. Neurochem. — 2004. — 89, N 3. — P. 715–729.
10. Mattiasson G., Friberg H., Hansson M. et al. // Ibid. — 2003. — 87. — P. 532–544.
11. Mattiasson G. // Cytometry A. — 2004. — 60, N 2. — P. 145–154.
12. Пономаренко О. В., Бабіч Л. Г., Горчев В. Ф., Костерин С. О. // Укр. біохім. журн. — 2006. — 78, № 6. — С. 38–45.
13. Костерин С. А., Браткова Н. Ф., Курский М. Д. // Биохимия. — 1985. — 50, № 8. — С. 1350–1361.
14. Bradford M. M. // Anal. Biochem. — 1976. — 72. — P. 248–254.

15. Reynolds E. S. // J. Cell Biology. — 1963. — **17**. — P. 208–212.
16. Henk G. Merkus. Particle Size Measurements. Fundamentals, Practice, Quality. — Springer, 2009. — 533 p.
17. Бабіч Л. Г., Шликов С. Г., Наумова Н. В., Костерін С. О. // Укр. біохім. журн. — 2007. — **79**, № 6. — С. 34–41.
18. Бабіч Л. Г., Борисова Л. А., Шликов С. Г. и др. // Там само. — 2004. — **76**, № 5. — С. 52–61.
19. Бабіч Л. Г., Борисова Л. А., Шликов С. Г. и др. // Там само. — № 6. — С. 55–63.
20. Бабіч Л. Г., Шликов С. Г., Наумова Н. В., Костерін С. А. // Там само. — 2008. — **80**, № 4. — С. 51–58.
21. Вадзюк О. Б., Костерін С. О. // Там само. — 2003. — **75**, № 6. — С. 47–55.
22. Flow cytometry. A practical approach / Ed. Ormerod M. G. — OUP, 2000. — 297 p.

Отримано 08.09.2010