

УДК 576.08; 576.311.347; 577.352.38

*Д. В. ЛОЙЧИЦ, О. В. МОЛЧАН, Е. Г. УСОВА,  
Е. И. КУЗНЕЦОВА, С. В. ГЛУШЕН*

**СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ  
МИТОХОНДРИЙ КЛЕТОК НЕК293 ПОД ВЛИЯНИЕМ  
АЛКАЛОИДОВ РАСТИТЕЛЬНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ**

*Белорусский государственный университет, Минск, e-mail: bsu@bsu.by*

*(Поступила в редакцию 14.04.2015)*

**Введение.** Алкалоиды – класс биологически активных соединений, значение которого трудно переоценить. Многие из них выделяют из растительного сырья и успешно используют в фармакологии в качестве основного действующего вещества. Среди терпеновых индольных алкалоидов особой фармакологической значимостью обладают аймалицин и винкамин. Аймалицин обладает гипотензивным действием, применяется как антиаритмический препарат, ингибирующий поглощение глюкозы митохондриями в клетках миокарда. Винкамин и его производные эффективны при лечении таких заболеваний, как артериальная гипертензия, цереброваскулярная недостаточность, неврогенная тахикардия, менингоэнцефалит и др. [6]. Постоянно идет поиск природных алкалоидов, изучаются их эффекты, проводятся исследования по химическому синтезу новых и химической модификации уже известных алкалоидов для усиления их полезных свойств или снижения негативных побочных эффектов [7].

К настоящему времени эффекты алкалоидов довольно хорошо изучены на организменном уровне, что особенно актуально при тестировании алкалоидов, применяющихся в фармакологии, на предмет их побочных воздействий. В частности, поступая в клетку и вовлекаясь в целый ряд метаболических процессов, алкалоиды могут оказывать влияние на внутриклеточный баланс свободных радикалов, вызывая смещения их нормальных физиологических концентраций [8, 9]. В то же время на клеточном уровне эффекты алкалоидов исследованы недостаточно.

Митохондрии являются центральной органеллой в развитии сценариев протекания окислительного стресса. При индукции окислительного стресса ингибиторами цепи транспорта электронов функционирование митохондрий и их структура могут подвергаться значительным изменениям. В этой связи представляет интерес недавно обнаруженная корреляция между морфологией митохондрий и генерацией ими активных форм кислорода [1]. Эти наблюдения указывают на перспективность исследований окислительного стресса на клеточном уровне с помощью современных методов количественной цитологии.

Цель данного исследования – разработка метода тестирования алкалоидов растительного происхождения, основанного на компьютерном анализе их микрофотографий, полученных с помощью специфического для митохондрий флуоресцентного зонда родамин 123, в плане их способности вызывать окислительный стресс в культивируемых клетках человека.

**Объекты и методы исследования.** Объектом исследования служила перевиваемая культура клеток эмбриональной почки человека НЕК293 (Американская коллекция типовых клеточных культур ATCC, № CRL-1573). Клетки культивировали в среде DMEM с 10 % эмбриональной

сыворотки при 37 °C и 5 % CO<sub>2</sub>. Все реагенты для культивирования клеток были производства фирмы Sigma-Aldrich.

Для визуализации и оценки активности митохондрий в живых клетках применялся флуоресцентный зонд родамин 123 (Acros Organics) в конечной концентрации 10 мкг/мл (около 26 мкМ). Время загрузки зонда составляло 40 мин. Затем клетки двукратно отмывали фосфатно-солевым буферным раствором (PBS). За 10 мин до отмывки к клеткам добавляли алкалоиды в концентрации 200 мкМ. В исследовании были использованы следующие алкалоиды: аймалицин, винкамин, серотонин и триптамин (Sigma-Aldrich, химическая чистота 98 %).

Для кратковременного культивирования клеток в процессе их тестирования были использованы одноразовые клеточные камеры собственной конструкции. Данные камеры представляют собой предметные стекла с микрокамерой диаметром 16 мм и толщиной 1 мм из двусторонней клеящей ленты, закрытой сверху покровным стеклом. Помещенную в микрокамеры клеточную суспензию исследовали с помощью микроскопа Eclipse 50i, снабженного телекамерой DigitalSpot-5Mc (Nikon). Для регистрации зеленой флуоресценции зонда использовали набор фильтров В1А с полосой возбуждения 470–490 нм и полосой пропускания более 520 нм. Компьютерный анализ микрофотографий выполняли с помощью программ ImageJ [10] и CellProfiler [6]. Для каждой экспериментальной точки измеряли не менее 100 клеток, все эксперименты проводили в трех повторностях. Статистическую обработку результатов выполняли в программе Statistica 7.0 (Statsoft).

**Результаты и их обсуждение.** Флуоресцентный зонд родамин 123 является одним из наиболее широко используемых маркеров митохондрий в живых клетках. Он широко используется для измерения митохондриального потенциала ( $\Delta\psi_m$ ), поскольку интенсивность его флуоресценции зависит от величины отрицательного заряда на внутренней мембране этой органеллы [2]. Изменения флуоресценции родамина 123 при деполяризации или гиперполяризации митохондрий зависят от условий его применения. Различают два режима использования этого зонда □ с гашением флуоресценции (quenching mode, QM) и без гашения (nonquenching mode, NQM). В режиме QM применяют относительно высокие концентрации зонда (от 50 нМ до нескольких микромолей), что вызывает эффект концентрационного гашения флуоресценции. Поэтому деполяризация митохондрий при окислительном стрессе вызывает выход части зонда из органоида и усиление флуоресценции оставшегося количества. В процессе дальнейшей деполяризации зонд может полностью выйти из митохондрий, при этом интенсивность его флуоресценции начинает падать. В режиме NQM используются низкие концентрации зонда (менее 30 нМ), при которых

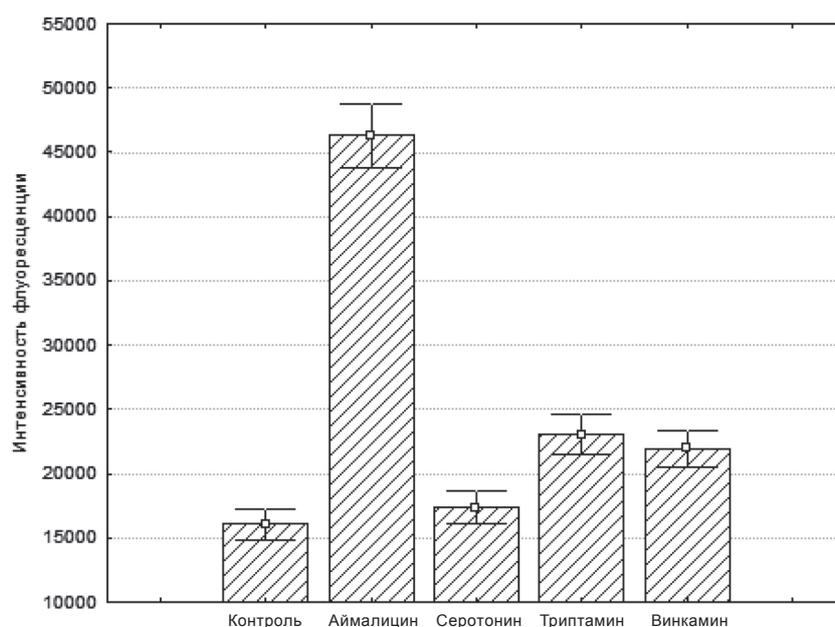


Рис. 1. Интенсивность флуоресценции зонда родамин 123 (средняя ± ошибка средней, усл. ед.) в культуре HEK293 после воздействия алкалоидов

концентрационного тушения не возникает. В этом режиме деполяризация митохондрий сопровождается не увеличением, а снижением интенсивности флуоресценции зонда [3].

Использованная нами концентрация зонда и схема эксперимента соответствовали режиму QM, который был выбран как более адекватный поставленной задаче – исследованию морфофизиологических изменений митохондрий при остром окислительном стрессе. Для оценки функционирования митохондрий в условиях окислительного стресса регистрировалась интенсивность флуоресценции зонда (параметр Integral Density). Как следует из полученных данных (рис. 1), алкалоид аймалицин вызывает острый окислительный стресс, который превосходит эффект даже таких сильных окислителей, как пероксид водорода и гидропероксид терт-бутила [5] в эквимольной концентрации. В то же время интенсивность флуоресценции зонда при действии серотонина достоверно не отличается от контрольной величины, что хорошо согласуется с данными литературы о его способности к нейтрализации свободных радикалов. Как следует из представленных данных, терпеновый индольный алкалоид винкамин и protoalkaloid триптамин вызывают легкий окислительный стресс, который устраняется нативными защитными системами клеток.

С помощью родамина 123 были изучены также морфологические особенности митохондрий в клетках НЕК293 при воздействии на них исследуемых соединений (рис. 2).

Митохондрии контрольной культуры формируют скопления, которые располагаются по периферии клетки (рис. 2, *a*). При вызванном аймалицином остром окислительном стрессе состояние митохондрий в клетке иное: они распределяются по всей цитоплазме, кроме той ее области, которая занята ядром (рис. 2, *b*). Этот алкалоид вызывает гибель до 20 % клеток. Следует отметить, что контуры митохондрий становятся при воздействии этого алкалоида менее контрастными, изменяются также их размеры и форма. В том случае, когда на клетки воздействует серотонин (рис. 2, *c*), видно, что структура митохондрий остается такой же, как и в контрольном образце.

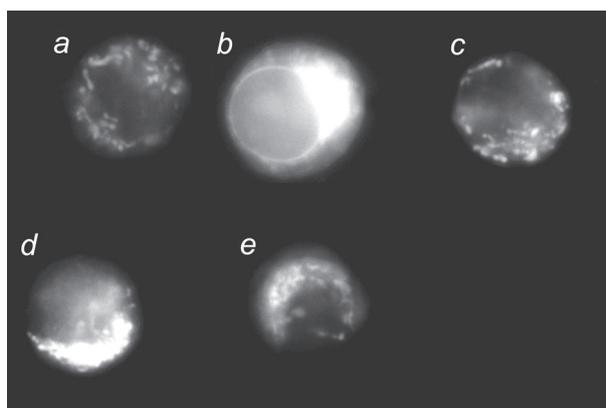


Рис. 2. Репрезентативные микрофотографии интактных (*a*) и обработанных аймалицином (*b*), серотонином (*c*), триптамином (*d*) и винкамином (*e*) клеток культуры НЕК293. Окраска родамином 123,  $\times 60$

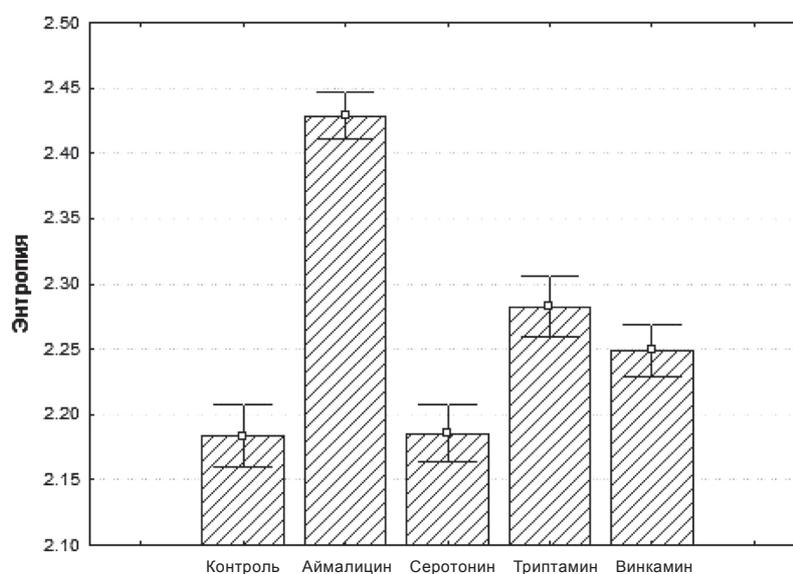


Рис. 3. Изменения текстурного параметра «энтропия», характеризующего структуру митохондрия в клетках НЕК293 после воздействия алкалоидов (усл. ед.  $\pm$  ошибка средней)

Триптамин (рис. 2, *d*) и винкамин (рис. 2, *e*), как было отмечено ранее, в использованных концентрациях вызывают лишь легкий окислительный стресс. Этот эффект выражается в снижении структурированности митохондрий, что является признаком деполяризации внутренней митохондриальной мембраны и выхода зонда из органеллы в гиалоплазму.

Для объективной оценки характера распределения митохондрий в клетках был использован компьютерный анализ изображений. Он выполнялся с помощью программы CellProfiler, которая позволяет измерить ряд текстурных параметров на основе матрицы взаимной вероятности уровней серого в изображении [4]. Представленные на рис. 3 данные, полученные по текстурному параметру «энтропия», который позволяет оценить неравномерность распределения флуоресцентного зонда в цитоплазме, подтверждают, что вызванный аймалицином острый окислительный стресс отличается менее упорядоченным распределением митохондрий в объеме цитоплазмы, в то время как при воздействии серотонина оно сохраняется на уровне контроля. При воздействии на клетки триптамина и винкамина, несмотря на небольшие отклонения в интенсивности флуоресценции, наблюдаются выраженные изменения структуры митохондрий, которые могут быть объективно зарегистрированы с помощью текстурных параметров. Эти наблюдения свидетельствуют о потенциальной ценности текстурного анализа как количественного метода исследования окислительного стресса на клеточном уровне, который позволяет получить более детальную характеристику внутриклеточных процессов.

**Заключение.** Полученные результаты свидетельствуют, что изученные нами растительные алкалоиды обладают определенным спектром биологической активности, которую можно регистрировать на клеточном уровне с помощью анализа изображений. Показано, что при вызванном алкалоидами окислительном стрессе наряду со снижением мембранного потенциала митохондрий наблюдаются также изменения морфологии этих органелл и их распределения в цитоплазме. В наибольшей степени этот эффект проявляется при воздействии на клетки аймалицина.

## Литература

1. Ahmad T., Aggarwal K., Pattnaik B. et al. // Cell Death and Dis. 2013. Vol. 4. P. e461.
2. Huang M., Camara A. K. S., Stowe D. F. et al. // Ann. Biomed. Eng. 2007. Vol. 35 (7). P. 1276–1285.
3. Perry S. W., Norman J. P., Barbieri J. et al. // BioTechniques. 2011. Vol. 50. P. 98–115.
4. Kamensky L., Jones T. R., Fraser A. et al. // Bioinformatics. 2011. doi. PMID: 21349861 PMID: PMC3072555.
5. Drahotá Z., Kriváková P., Cervinková Z. et al. // Physiol. Res. 2005. Vol. 54. P. 67–72.
6. Вышковский Г. А. и др. Регистрация лекарственных средств России / под общ. ред. Г. А. Вышковского. 11-е изд. М., 2004. – 195 с.
7. Wang Y., Dong X., Larock R. C. // J. of Org. Chem. 2003. Vol. 68 (8). P. 3090–3098.
8. Giuseppina Barrera // ISRN Oncol. 2012. Vol. 2012.
9. Racková L., Májejková M., Kost'álová D., Stefek M. // Bioorg. & Med. Chem. 2004. Vol. 12 (17). P. 4709–4715.
10. Collins T. J. // Biotechniques. 2007. Vol. 43 (Suppl. 1). P. 25–30.

*D. V. LOYCHITS, O. V. MOLCHAN, E. G. USOVA, E. I. KUZNETSOVA, S. V. GLUSCHEN*

## MORPHOPHYSIOLOGICAL CHANGES IN MITOCHONDRIA OF HEK293 CELLS UNDER ALKALOIDS TREATMENT

### Summary

The results of cytophysiological studies of HEK293 cells treated with plant alkaloids are present. It is shown that these natural compounds possess broad range of biological activity having both anti- and oxidative properties. Texture analysis method was implemented to quantitatively assess mitochondrion structure changes after the treatment. The results suggest a strong correlation between morphology and distribution of mitochondria in cell cytoplasm with changes in membrane potential level of these organelles during oxidative stress.