

## МИТОРАЗНООБРАЗИЕ

© 2015 В.А. Попков<sup>1</sup>, Е.Ю. Плотников<sup>2</sup>, К.Г. Лямзаев<sup>2</sup>,  
Д.Н. Силачев<sup>2</sup>, Л.Д. Зорова<sup>3</sup>, И.Б. Певзнер<sup>2</sup>, С.С. Янкаускас<sup>2</sup>,  
С.Д. Зоров<sup>1</sup>, В.А. Бабенко<sup>1</sup>, Д.Б. Зоров<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup> Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова,  
факультет биоинженерии и биоинформатики, 119991 Москва

<sup>2</sup> Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова,  
НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского,  
119991 Москва; факс: +7(495)939-0338,  
электронная почта: zorov@genebee.msu.ru

<sup>3</sup> Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова,  
Международный учебно-научный лазерный центр, 119991 Москва

Поступила в редакцию 11.01.15

После доработки 15.01.15

Мы дополняем недавно введенный нами термин «митобиота» еще одним термином «миторазнообразие», означающим разную степень гетерогенности фенотипа и генотипа митохондрий в пределах одной клетки или органа. Такая гетерогенность, как следует из наших данных по значениям трансмембранного потенциала митохондрий *in situ* и *in vitro* в норме и после ишемии/реперфузии органа, особенно сильно проявляется в условиях патологии. При этом даже в патологических условиях сохраняется часть популяции митохондрий с величинами потенциала, характерными для нормального состояния, что, вероятно, может служить базой для разработки путей обращения патологического состояния в норму. Показана прямая корреляция между значениями мембранного потенциала изолированных митохондрий и боковым светорассеянием, отражающим внутреннюю структуру митохондрий. Проведен анализ возможных трактовок значений мембранного потенциала митохондрий, полученных с использованием флуоресцентных зондов. Делается предположение о возможном механизме удержания флуоресцентных зондов в клетке и митохондрии.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** митохондрии, гетерогенность, разнообразие, хондриом, популяционный анализ, мембранный потенциал, ишемия, патология, повреждение.

В последнее время митохондрии привлекают все большее внимание научного сообщества. Разнообразие внутриклеточных функций ставит митохондрии по важности в центр регуляции процессов как энергообразующих, или энергопреобразующих, так и неэнергетических – сигнальных или синтетических [1, 2]. На текущий момент стало ясно, что нарушение ряда митохондриальных функций является основой патологических процессов в клетке [3].

Многообразие митохондриальных функций позволяет рассуждать о некотором распределении части этих функций внутри митохондриальной популяции в клетке или ткани, т.е. предположить частичную внутриклеточную специализацию разных митохондрий в хондриоме. Для клеток эта специализация, видимо, возможна, прежде всего, там, где хондриом представлен не

единым образованием [4, 5], а состоит из отдельных митохондрий [6], пусть даже осуществляющих взаимный обмен за счет известного процесса слияния и фрагментации [7, 8]. Наверное, обязательным требованием доказательства частичного распределения функций между членами митохондриального сообщества является доказательство морфологической и функциональной гетерогенности митохондрий, особенно в пределах одной клетки или одного органа. Также мы допускаем, что такая специализация частично соответствует распределению функций у социальных видов животных (например, пчел или колоний грызунов), у которых она приводит к изменению фенотипа животного, сопровождаемому изменением качества жизни.

Понимание того, что не существует совершенно одинаковых биологических структур, постепенно приходит к исследователям, как и понимание того, что не существует совершенно одинаковых патологий. Обоснование индивидуализации/персонализации биологии и медици-

Принятые сокращения: TMRE – этиловый эфир тетраметилродамина, мтДНК – митохондриальная ДНК.

\* Адресат для корреспонденции.

ны все больше звучит как призыв изменить традиционный подход *универсального* представления о сложных биологических структурах, таких как органелла, клетка или орган.

Один из авторов данной работы (Д.Б. Зоров) в свое время, изучая роль митохондрий при диабете, столкнулся с проблемой, которая логически предполагала гетерогенность клеточной и митохондриальной популяций в органе. Измерение уровня ионов кальция в митохондриях кардиомиоцитов нормальных и диабетических животных при активации сократительной деятельности этих клеток показало, что в среднем концентрации ионов кальция повышались у диабетических животных не столь значительно, как у нормальных животных [9]. Это соответствовало представлению о невозможности в кардиомиоците диабетического животного осуществить необходимую  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимую активацию митохондриальных дегидрогеназ для усиленного синтеза АТФ в условиях повышенных энергозатрат. Для получения достоверного результата в виде статистически значимого различия между кальций-транспортирующими системами нормальных и диабетических клеток потребовался анализ значительного количества кардиомиоцитов. В этом статистическом анализе оказались скрытыми частные результаты, показывавшие, что концентрации ионов кальция у больных животных изредка были не только не меньше, но равны, а иногда и превышали значения, определяемые у контрольных животных. Это означало, что в диабетическом сердце сохранялась малая популяция здоровых клеток. Вывод напрашивался простой: в данном случае диабетическая патология — это болезнь, затрагивающая не все сердце, а лишь основную часть клеток, в конечном счете придающая сердцу патологический фенотип. Такой вывод является очень важным для будущих стратегий борьбы с разными патологиями, учитывая возможную сохранность части здоровой популяции, от которой представляется теоретически возможным провести возврат в общий нормальный фенотип. Вероятно, существует определенный порог соотношения популяции больных клеток к общему числу клеток в органе для проявления патологического фенотипа органа.

Такой же принцип был нами недавно разработан при анализе митохондриальной популяции, в результате чего мы, по аналогии с термином «микробиота», ввели термин «митобиота» как содружество разных по структуре и функциям митохондрий в клетке или органе [10]. Поразительное разнообразие митохондриальных структур и функций, особенно в патологической клетке, подтверждает гетерогенность мито-

хондрий с предположительным порогом для фенотипического проявления митохондриальной болезни при увеличении доли патологических митохондрий (или мтДНК) в общем пуле митохондрий в популяции [11].

Существует обширная литература, подтверждающая гетерогенность митохондриальной популяции, основанная на данных о различных физико-химических свойствах отдельных митохондрий и их белковом составе. В обзоре, опубликованном в 2009 г., приведена сводная таблица данных, подтверждающих гетерогенность митохондрий [12]. Давно утвердилось деление митохондрий в клетке скелетной мышцы на две популяции: субсарколеммальные и интерфиллярные митохондрии [13], хотя постоянно появляются данные о наличии субпопуляций митохондрий и в других тканях [14–16]. В силу легкости методических подходов (использование витальных флуоресцентных красителей для определения мембранного потенциала) особое внимание уделялось гетерогенности трансмембранного потенциала митохондрий [17], но другие митохондриальные параметры — изоэлектрическая точка [18],  $\text{Ca}^{2+}$ -сигналинг, основанный на взаимодействии с ретикуломом [19], содержание кардиолипина [20] и различных белков, включая ключевой элемент митохондриального транспорта TOM22 [21], — оказались распределены неодинаково между членами митохондриальной популяции. Эти различия в свойствах митохондрий наблюдались как *in vitro*, так и *in situ*. Важный анализ гетерогенности митохондриального мембранного потенциала в одной клетке был проведен в группе Черняка [22], где митохондрии дискриминировались по значению мембранного потенциала с интерпретацией наличия разного уровня генерации эндогенных активных форм кислорода, которые в основном производились малой фракцией деэнергизованных митохондрий. Гетерогенность митохондрий по степени базовой и амплифицированной генерации активных форм кислорода в клетках прослеживалась и в других работах [23, 24].

Понимая, что присутствие популяции низкоэнергизованных митохондрий в клетке может в большей части случаев отражать низкое качество клетки, мы предложили фракционировать клетки по величине среднего значения трансмембранного потенциала митохондрий [25]. Позже по этому же принципу аналогичное фракционирование было предложено для выделения наиболее жизнеспособной популяции клеток сперматозоидов [26].

В последние годы стало ясным, что гетерогенность митохондрий в частности определяется

двумя сопряженными процессами – митохондриальной динамикой (фрагментация и слияние митохондрий) [27] и аутофагией (митофагией) [12, 28]. Данные по митохондриальной гетерогенности были усилены использованием самых современных микроскопических методов исследований [29–31], все больше укрепляя предположение о митохондриальном разнообразии в клетке.

В 2007 г., исследуя состояние митохондрий в переживающих срезах почки, подверженной ишемии/реперфузии, мы обнаружили существенную вариацию митохондриального трансмембранного потенциала, измеренного по интенсивности флуоресценции митохондриального зонда, этилового эфира тетраметилпродамина (TMRE) [32]. Тогда анализ такой митохондриальной гетерогенности не был произведен, равно как и не был понятен ее смысл и механизм. В данной работе мы представляем новый подход для оценки гетерогенности митохондриальной популяции в почке *in situ* и *in vitro*, сравнивая эти значения в двух условиях: в норме и при ишемическом повреждении, и высказываем предположение о механизмах и самой сущности митохондриальной вариабельности.

## МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

**Моделирование ишемического повреждения.** Для моделирования ишемического повреждения почки была выбрана широко применяемая в мировой практике модель ишемии/реперфузии. Крыс наркотизировали хлоралгидратом (300 мг/кг внутривенно), после чего выполняли разрез брюшной стенки. Сосудистый пучок почки освобождали от прилежащей жировой ткани, после чего пережимали на 40 мин микрососудистым зажимом. Отсутствие кровотока оценивали визуально по изменению цвета почки. Затем микрососудистые зажимы удалялись, и в течение 10 мин почка находилась в состоянии реперфузии.

После окончания периода ишемии/реперфузии почку выделяли и помещали в среду инкубации (стандартный раствор Хенкса для клеточных культур с добавлением 10 мМ Nерес-NaOH, рН 7,4) для отмывки от крови. После отмывки делались срезы корковой зоны толщиной 10–15 мкм. Срезы промывали средой инкубации (все манипуляции и инкубация срезов проводились при 25°). Далее срезы корковой зоны почки окрашивали TMRE. Срезы инкубировали в течение 10 мин в среде инкубации, содержащей 200 нМ TMRE, затем их отмывали средой инкубации от излишков TMRE.

**Конфокальная микроскопия.** Микроскопическое изучение витальных срезов почки производилось на лазерном сканирующем конфокальном микроскопе LSM510 («Carl Zeiss», Германия) с фирменным программным обеспечением. Для возбуждения флуоресценции использовался HeNe лазер (полоса излучения 543 нм), флуоресцентное излучение проходило через систему стандартных запирающих фильтров и регистрировалось в диапазоне выше 560 нм. Изображение получали с помощью компьютера путем усреднения результатов четырех сканирований. Скорость сканирования, уровень усиления сигнала и разрешение получаемого изображения были одинаковы для всех экспериментов каждой серии. Толщина конфокальной плоскости составляла ~1,5 мкм (pinhole 150 мкм).

**Выделение митохондрий.** Митохондрии почек крысы выделяли методом дифференциального центрифугирования. После проведения всех хирургических манипуляций и окончания периода ишемии/реперфузии почки немедленно извлекали и помещали в охлажденную (2°) среду выделения: 0,25 М сахароза, 10 мМ Tris-HCl, 1 мМ ЭГТА, 0,1% БСА, 0,5 мМ дитиотреитол, рН 7,5. Капсула, покрывающая почки, и почечная лоханка удалялись. Почки измельчали на фрагменты 2–4 мм, дважды промывали холодной средой выделения и гомогенизировали в гомогенизаторе Поттера (стекло–тефлон) в 10× объеме среды выделения на 1 г массы исходной ткани в течение 5 мин при 4°. Гомогенат центрифугировали 10 мин при 800 г и 4°. Супернатант центрифуговали 10 мин при 10 000 г и 4°. Осадок суспендировали в среде выделения, не содержащей БСА, ЭДТА и ДТТ, в 10× объеме с тем же соотношением на 1 г ткани и осаждали при 12 000 г в течение 10 мин при 4°. Полученный осадок суспендировали в среде выделения, не содержащей БСА, ЭДТА и ДТТ, в объеме 100–200 мкл с конечным содержанием белка 20–40 мг/мл. Содержание белка определяли с помощью бицинониновой кислоты. Для контроля качества изолированных митохондрий измерялась величина дыхательного контроля, в опытах использовали митохондрии со значениями дыхательного контроля выше 3.

**Проточная цитофлуориметрия.** Проточная цитофлуориметрия проводилась с помощью прибора Cytomics FC 500 («Beckman Coulter», США). Для регистрации флуоресценции TMRE использовался канал FL2, лазер с полосой излучения 488. Среда инкубации содержала 120 мМ KCl, 3 мМ Nерес, 1 мМ EGTA, 5 мМ K<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 100 нМ TMRE и субстраты дыхания (5 мкМ пируват, 5 мкМ малат), рН 7,2–7,4; конечная концентрация митохондриального белка в исследуемом образце

составляла 200 мкг/мл. Оценивали интенсивность флуоресценции TMRE, отражающую величину трансмембранного потенциала митохондрий, прямое светорассеяние, отражающее размер частиц, и боковое светорассеяние, отражающее неоднородность внутреннего содержимого.

**Анализ изображений.** Анализ и обработка изображений проводились в программе Fiji [33]. Для выделения элементов (канальцев и отдельных клеток) использовался подход «анализ частиц». Этот подход имеет преимущество перед «ручным» выделением объектов в том, что он исключает субъективность при обработке данных: все изображения автоматически проходят одни и те же преобразования с одинаковыми настройками и не требуют участия исследователя.

Было проанализировано более 20 изображений из каждой группы. Изображения конвертировались в бинарные (определение порога проводилось алгоритмом, использующим метод треугольника [34]), затем с помощью алгоритма watershed (<http://bigwww.epfl.ch/sage/soft/watershed>) размечались границы отдельных частиц. После этого с помощью модуля analyze particles определялись координаты отдельных частиц, ограниченные по площади сверху и снизу. Выходными данными работы алгоритмов являлся набор координат отдельных небольших однородных объектов (клеток или маленьких канальцев) в среднем в количестве 500–1000 в зависимости от размера среза. Далее анализировалась интенсивность флуоресценции этих объектов на исходном изображении (не прошедшем все вышеописанные обработки). Полученные значения экспортировались и обрабатывались в программе MS Excel. Коэффициент эксцесса высчитывался для всех пикселей изображения с использованием алгоритма выравнивания фона (Rolling Ball Background Subtraction) и определением порога по методу Shanbhag [35].

#### **Использованные статистические коэффициенты.**

Коэффициент вариации случайной величины — мера относительного разброса случайной величины; он показывает, какую долю среднего значения этой величины составляет ее средний разброс; исчисляется в процентах и вычисляется только для количественных данных. В отличие от среднего квадратического или стандартного отклонения он определяет не абсолютную, а относительную меру разброса значений признака в статистической совокупности и равняется среднеквадратичному отклонению, деленному на математическое ожидание.

Коэффициент эксцесса — мера остроты пика распределения случайной величины. Он равняется четвертому центральному моменту случайной величины, деленному на квадрат дисперсии

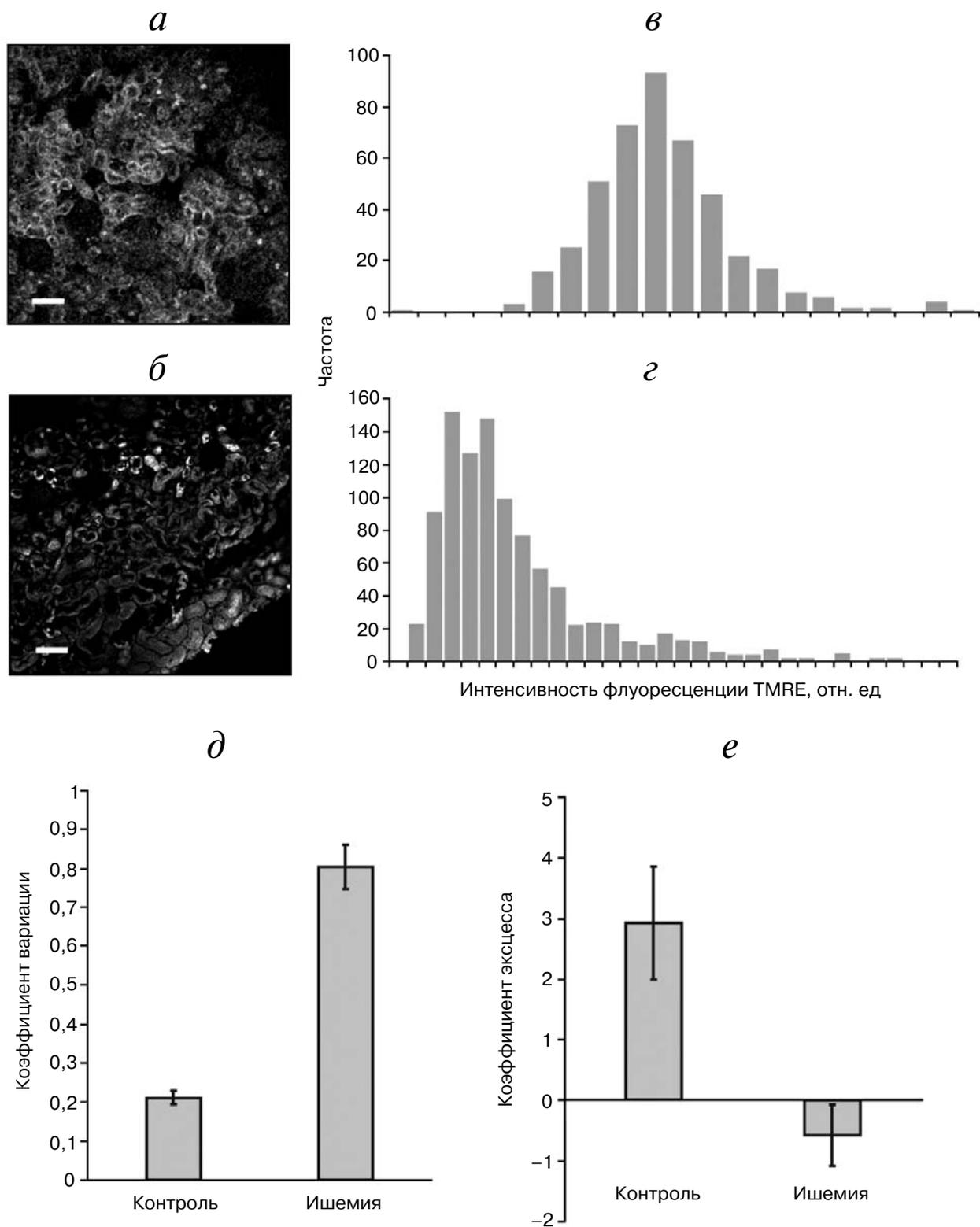
с поправкой на значение этого выражения для нормального распределения, благодаря чему коэффициент эксцесса выше 0 означает более «острое» по сравнению с нормальным распределением, ниже 0 — более «пологое». Значения ниже  $-1,2$  часто указывают на мультимодальное распределение.

Коэффициент корреляции — мера линейной зависимости двух случайных величин. Он равняется ковариации этих величин, деленной на среднеквадратичные отклонения каждой из величин. Меняется в пределах от 1 до  $-1$ , где крайние значения отражают прямую или обратную линейные зависимости соответственно.

Для сравнения парных выборок использовался критерий Манна–Уитни.

## **РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ**

Анализ конфокальных изображений срезов почек, окрашенных TMRE, выявил значительный разброс в интенсивности флуоресценции митохондрий клеток. На рис. 1, а и б приведены репрезентативные изображения срезов контрольной и ишемичной почки (контрастность изображений была изменена для облегчения их восприятия), а также распределение интенсивностей флуоресценции объектов на этих срезах (рис. 1, в, г). На срезе ишемичной почки заметны как ярко флуоресцирующие каналы, так и почти утратившие флуоресценцию, тогда как в контроле интенсивность флуоресценции всех канальцев одинакова. Распределение интенсивности флуоресценции объектов на срезе ишемичной почки шире, чем в контроле, что также указывает на большую гетерогенность клеток и их митохондрий в ткани. Для количественной оценки этой гетерогенности были применены два широко используемых в математической статистике коэффициента: вариации и эксцесса. Первый отражает долю, которую составляет разброс относительно среднего значения, второй нужен для оценки «остроты» (выше нуля) или «пологости» (ниже нуля) распределения относительно нормального. Коэффициент вариации интенсивности флуоресценции срезов почек, перенесших ишемию/реперфузию, был значительно выше, чем в контроле, что говорит о гораздо большем разбросе значений интенсивности флуоресценции, а значит, о гетерогенности исследуемых изображений (рис. 1, д). Коэффициент эксцесса распределения интенсивности флуоресценции на срезах в случае ишемии (рис. 1, е), напротив, гораздо ниже и уходит в отрицательные значения (отрицательные значения этого коэффициента могут даже указывать



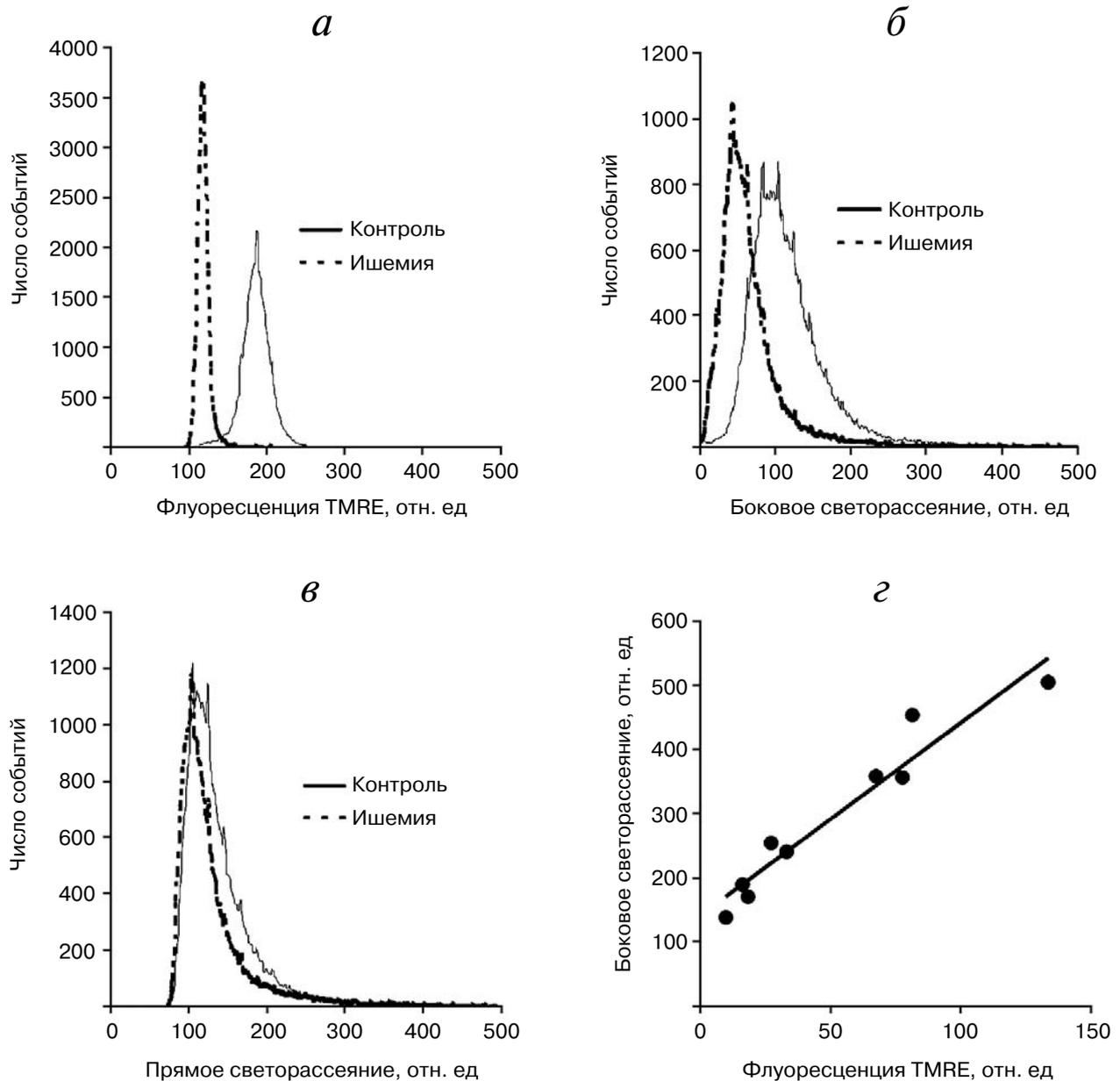
**Рис. 1.** Конфокальные изображения витальных срезов контрольной (а) и подвергнутой ишемии/реперфузии (б) почки, окрашенных зондом TMRE (масштабная линейка – 50 мкм), а также распределение интенсивности свечения объектов на этих срезах соответственно (в и г); д – коэффициент вариации распределения интенсивности флуоресценции TMRE на срезах контрольной (n = 29) и ишемичной (n = 26) почки; е – коэффициент эксцесса распределения интенсивности флуоресценции на тех же срезах.  $p \leq 0,01$

на мультимодальное распределение), что указывает на более пологое распределение интенсивности и также является свидетельством большей гетерогенности.

Анализ данных проточной цитофлуориметрии выделенных почечных митохондрий, инкубированных с TMRE, показал, что ишемия/реперфузия снижает среднюю интенсивность флуоресценции митохондрий (рис. 2, а), при этом приводя к увеличению коэффициента ва-

риации интенсивности флуоресценции (данные не представлены). Это выражается в сдвиге пика флуоресценции TMRE в сторону низких значений интенсивности и увеличении доли разброса интенсивности относительно ее среднего значения (рис. 2, а), несмотря на уменьшение абсолютного значения отклонения.

Анализ бокового светорассеяния выявил существенный сдвиг его интенсивности в сторону низких значений после ишемии/реперфузии



**Рис. 2.** Интенсивность флуоресценции TMRE митохондрий, выделенных из почки контрольного животного и животного, подверженного ишемии/реперфузии, по данным проточной цитофлуориметрии (а). Интенсивность бокового (б) и прямого (в) светорассеяния этих же образцов. г – График, отражающий корреляцию между средним по образцу ( $n = 9$ ) боковым светорассеянием митохондрий и средней интенсивностью флуоресценции TMRE (коэффициент корреляции 0,96)

почки (рис. 2, б), что указывает на уменьшение неоднородности внутреннего содержимого митохондрий. В то же время показатель прямого светорассеяния практически не изменялся после ишемии почки (рис. 2, в) и не коррелировал с интенсивностью флуоресценции TMRE. Это, по всей видимости, указывает на то, что размер изолированных митохондрий почки не связан напрямую с их функционированием. Такое утверждение, очевидно, несправедливо для нативных митохондрий в клетке, поскольку процесс выделения митохондрий из ткани может влиять на оба эти параметра.

Также наблюдалась выраженная прямая зависимость (коэффициент корреляции 0,96) между интенсивностью флуоресценции TMRE в митохондриях и их боковым светорассеянием (рис. 2, г): на графике, отражающем эту зависимость, средние значения данных параметров для каждого образца точно ложатся на одну прямую с углом наклона 30°.

В выделенных после ишемии митохондриях почки во всех опытах наблюдалась четко дискриминируемая субпопуляция с низкой интенсивностью флуоресценции TMRE с низкими значениями бокового светорассеяния, но различными показателями прямого светорассеяния, что, опять же, указывает на корреляцию сниженной флуоресценции TMRE с неоднородностью внутреннего содержимого, но не с размерами митохондрий. Следует отметить, что в случае митохондрий контрольной почки популяция с такими характеристиками всех перечисленных параметров не наблюдалась, но выявлялась небольшая популяция митохондрий в области низких значений флуоресценции TMRE (рис. 2, а).

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Гетерогенность биологической системы, на верное, является неизбежным фактом, который надо учитывать при рассмотрении определений нормы и патологии. По всей вероятности, не существует одинаковых клеток или внутриклеточных органелл. Механизм такого разнообразия неясен, но он явно появляется очень рано в развитии организма. Последние данные указывают на то, что клеточная гетерогенность проявляется уже на стадии 2- и 4-клеточного эмбриона [36]. У митохондрий, учитывая их материнскую наследуемость и многочисленность в материнской яйцеклетке, такая гетерогенность присутствует с самого начала эмбрионального развития и характерна как для яйцеклетки, так и для эмбриона [37].

В данной работе о гетерогенности митохондрий почки мы судили в частности по значениям трансмембранного потенциала ( $\Delta\psi$ ) как одному из самых значимых параметров митохондриального метаболизма. Но надо признать, что полученные различия в значениях  $\Delta\psi$  требуют критического анализа, основанного на оценке возможных проблем, возникающих при измерении трансмембранного потенциала митохондрий в клетке при помощи проникающих флуоресцентных катионов. Видимая гетерогенность в интенсивности флуоресценции катионов, таких как TMRM, TMRE, родамин 123 и др., может быть обусловлена целым рядом причин (частичный анализ возможных артефактов приведен ранее [38]).

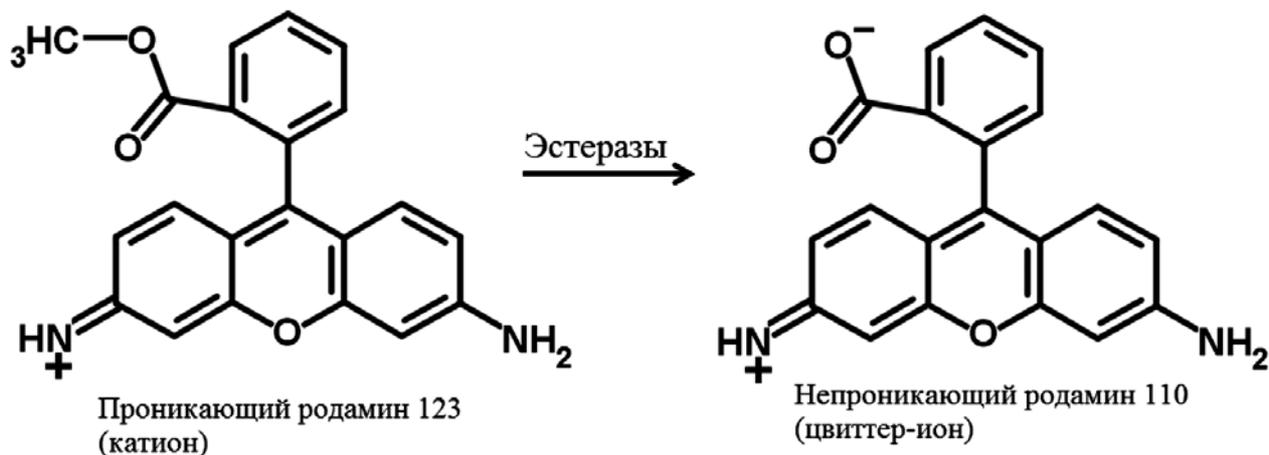
Причина 1. Оцениваемый с помощью флуоресцентных зондов  $\Delta\psi$  в митохондриях составляет хотя и основную, но все же часть протондвижущей силы ( $\Delta\mu\text{H}^+$ ). Другая составляющая  $\Delta\mu\text{H}$  также может варьировать, но при этом основной энергетический фактор  $\Delta\mu\text{H}^+$  может оставаться неизменным. Обычно для оценки максимального значения  $\Delta\psi$ , отражающего величину  $\Delta\mu\text{H}^+$ , используют нигерицин ( $\text{K}^+/\text{H}^+$ -обменник), который обеспечивает превращение  $\Delta\mu\text{H}$  в  $\Delta\psi$ .

Причина 2. Генерация  $\Delta\psi$  митохондриями конкурирует с энергопотребляющими реакциями (эндэргоническими реакциями, идущими с затратой АТФ), в результате чего установившийся стационарный уровень  $\Delta\psi$  не отражает степень генерации  $\Delta\psi$ . Для оценки уровня генерации потенциала обычно добавляют олигомицин, являющийся ингибитором протонного канала митохондриальной АТФазы и препятствующий использованию митохондриями АТФ.

Причина 3. При очень высоких значениях  $\Delta\psi$  флуоресценция закачивающегося в митохондрии красителя может подвергаться самотушению. Обычно эта проблема решается использованием малых концентраций зондов, что, конечно же, вызывает технические трудности при детекции флуоресценции.

Причина 4. Т.к. флуоресцентные катионы являются субстратами неспецифических помп, локализованных в клеточной мембране и откачивающих ксенобиотики из клетки, видимая гетерогенность митохондриальной поляризации между клетками может быть обусловлена различием в активности этих помп. Их учет или ингибирование — не слишком легкая задача, иногда исследователи применяют для этих целей верапамил, который тормозит активность этих помп.

Причина 5. В большинстве случаев митохондриальные флуоресцентные зонды (TMRE, TMRM, родамин 123) представляют собой сложные эфиры (рис. 3). Эти эфиры могут быть рас-



**Рис. 3.** Гипотетический механизм возможного удержания флуоресценции в клетке и митохондрии при окрашивании клеток флуоресцентным эфиром (в данном случае приведен родамин 123). Внутриклеточные эстеразы превращают проникающий делокализованный катион в непроникающий цвиттер-ион, таким образом задерживая последний внутри клетки

щеплены внутриклеточными и внутримитохондриальными эстеразами с образованием цвиттер-иона (рис. 3). В то время как катионные формы зондов обладают хорошей способностью проникать через фосфолипидные мембраны, соответствующие цвиттер-ионы плохо проходят через них, в результате чего они оказываются в клеточной или митохондриальной ловушке. На этом принципе работает ряд клеточных зондов в виде эфирных соединений типа X-AM, при отщеплении от которых эстеразами ацетоксиметильной группы (AM) происходит высвобождение зонда (X) в объем. В случае с митохондриальными зондами типа TMRM, TMRE или родамина 123 при наличии активности эстераз суммарная флуоресценция будет сочетать флуоресценцию катионной и цвиттер-ионной форм. В то время как накопление катионной формы в клетке и органелле будет следовать значению  $\Delta\Psi$  по уравнению Нернста, накопление нейтральной формы не будет следовать такому закону. Более того, видимо, по этой причине зачастую исследователи не наблюдают при полной деэнергизации потерю внутримитохондриальной и внутриклеточной флуоресценции зондов, сделанных на основе родаминов. Мы можем предположить, что обнаруженное длительное удержание флуоресценции при окрашивании опухолевых и мышечных клеток родамином 123, трактуемое как удержание именно этого катиона в этих клетках [39], является также результатом активности эстераз, превращающих родамин 123 в родамин 110.

Надо заключить, что обнаруживаемое гетерогенное распределение в клетке и ткани флуоресценции митохондриальных зондов на мемб-

ранный потенциал не слишком легко, а иногда и невозможно, интерпретировать как гетерогенность энергетики митохондрий. Отметим, что в уже упомянутой работе группы Черняка гетерогенность флуоресценции митохондриальных зондов сохранялась в присутствии нигерицина и олигомицина, что исключало из рассмотрения причины 1 и 2 [21]. В равной степени для подтверждения реальности наличия обнаруженной стадии митохондриальной гиперполяризации при открытии митохондриальной поры, измеряемой при помощи TMRM, были исключены причины 1–4 [40].

Наши данные конфокальной микроскопии позволяют утверждать, что митохондрии в одной ткани в разных клетках (вполне возможно, и в пределах одной клетки) неоднородны по своим энергетическим свойствам. Часть митохондрий оказывается более устойчивой к ишемическому повреждению, сохраняя достаточно высокий трансмембранный потенциал, тогда как другие митохондрии при таком повреждающем воздействии сильно деэнергизуются. В контроле подобная гетерогенность почти не наблюдается. Таким образом, разнообразие митохондрий (мы вводим термин «миторазнообразие») особенно заметно в критических условиях, когда в клетке возникает необходимость, прежде всего, обеспечить выживание (наверное, за счет сокращения затрат на поддержание клеточного гомеостаза, существующих в норме). Как мы замечаем, наблюдающееся изменение функционирования митохондрий в патологических состояниях все равно сопровождается сохранением популяции митохондрий, которая максимально приближена к норме. Видимо, по такой

же причине даже в условиях патологии в митохондриях остается некоторое количество ДНК дикого типа, при этом остальная ДНК претерпевает сильные структурные изменения.

Миторазнообразии может быть аргументом в пользу распределения функций в популяции митохондрий, учитывая большое разнообразие этих функций [1, 2]. Есть данные, что лишь часть митохондрий участвует в запуске апоптоза путем выхода цитохрома *c* [41, 42], т.е. существует популяция рабочих митохондрий, которые осуществляют энергетические, сигнальные или синтетические функции, а есть митохондрициды, которые обеспечивают физиологически необходимую или нежелательную функцию уничтожения клетки. В этом виде напрашивается некоторая аналогия митохондрий в клетке и пчел в улье.

Фенотипические проявления гетерогенности митохондрий выражаются, прежде всего, в разнообразии их ультраструктуры в пределах одной клетки и между клетками [10]. Из ультраструктурных исследований известно, что в деэнергизованных митохондриях матрикс переходит из ортодоксального в более плотное, конденсированное состояние [43, 44]. Наши данные косвенно подтверждают это, исходя из анализа соотношения уровня флуоресценции митохондриальных частиц, прямого светорассеяния (отражающего размер митохондрий) и бокового светорассеяния (отражающего неоднородность внутренней структуры митохондрий). Найденные более высокие показатели бокового светорассеяния у выделенных митохондрий с высоким трансмембранным потенциалом (более высокой флуоресценцией TMRE) согласуются с данными по изменению ультраструктуры митохондрий. Эта замечательная прямая зависимость неоднородности внутреннего содержимого митохондрий и трансмембранного потенциала не является артефактом исследования: добавление TMRE к пробе никак не влияло на распределение интенсивности бокового светорассеяния по сравнению с неокрашенными митохондриями (данные не представлены). Эту зависимость потенциально уже сейчас можно использовать как способ косвенной оценки потенциала митохондрий, если другие методы по каким-либо причинам недоступны.

Несомненным является факт уменьшения среднего трансмембранного потенциала митохондрий в результате ишемического воздействия на ткань. При этом во фракции выделен-

ных митохондрий (даже из почки, не подвергнутой ишемии/реперфузии) помимо основной массы митохондрий (со средними значениями флуоресценции TMRE, бокового и прямого светорассеяния) существует как популяция с высоким трансмембранным потенциалом, отличающаяся чуть большими размерами и заметно большей неоднородностью внутреннего содержимого, так и популяция слабо энергизованных митохондрий, более однородных по содержанию. Можно предположить, что митохондрии с низкой флуоресценцией TMRE – это «слабые» митохондрии, которые при ишемическом воздействии теряют свой трансмембранный потенциал в первую очередь.

У митохондрий, выделенных из ишемизированного органа, как и у митохондрий *in situ*, также наблюдалось увеличение гетерогенности – коэффициент вариации интенсивности свечения TMRE возростал. С другой стороны, гетерогенность популяции митохондрий *in vitro* наблюдалась и в контрольной группе. С учетом того, что выделение митохондрий само по себе является повреждающим воздействием, возможно, митохондрии контрольных почек исходно обладают разной устойчивостью к повреждению, что приводит к большему разбросу внутри популяции, который очень редко наблюдается на срезах контрольной почки.

Как известно, при воздействии ишемии/реперфузии немалый вклад в повреждающее воздействие вносит окислительный стресс, и представляется обоснованным предположить, что гетерогенность популяции митохондрий выражается в т.ч. в различной устойчивости к окислительному стрессу. Возможно, исследования в этой области смогут предложить новые стратегии защиты митохондрий от окислительного стресса, когда будут установлены различия, обеспечивающие устойчивость митохондрий к этому воздействию. Таким образом, разносторонние исследования миторазнообразия могут способствовать пересмотру стратегии терапии разных патологических процессов, в частности тех, что сопряжены с окислительным стрессом.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант 14-15-00147).

Авторы поздравляют В.П. Скулачева с юбилеем и желают долгих лет плодотворной деятельности на ниве отечественной и мировой науки.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Zorov, D.V., Krasnikov, V.F., Kuzminova, A.E., Vysokikh, M., and Zorova, L.D. (1997) Mitochondria revisited. Alternative functions of mitochondria, *Biosci. Rep.*, **17**, 507–520.
- Зоров Д.В., Исаев Н.К., Плотников Е.Ю., Зорова Л.Д., Стельмашук Е.В., Васильева А.К., Архангельская А.А., Хряпенкова Т.Г. (2007) Митохондрия как многоликий Янус. *Биохимия*, **72**, 1371–1384.
- Zorov, D.V. (1996) Mitochondrial damage as a source of diseases and aging: a strategy of how to fight these, *Biochim. Biophys. Acta*, **1275**, 10–15.
- Bakeeva, L.E., Chentsov, Yu.S., and Skulachev, V.P. (1978) Mitochondrial framework (reticulum mitochondriale) in rat diaphragm muscle, *Biochim. Biophys. Acta*, **501**, 349–369.
- Amchenkova, A.A., Bakeeva, L.E., Chentsov, Y.S., Skulachev, V.P., and Zorov, D.V. (1988) Coupling membranes as energy-transmitting cables. I. Filamentous mitochondria in fibroblasts and mitochondrial clusters in cardiomyocytes, *J. Cell Biol.*, **107**, 481–495.
- Smith, R.A., and Ord, M.J. (1983) Mitochondrial form and function relationships *in vivo*: their potential in toxicology and pathology, *Int. Rev. Cytol.*, **83**, 63–134.
- Wakabayashi, T., Asano, M., and Kurono, C. (1975) Mechanism of the formation of megamitochondria induced by copper-chelating agents. I. On the formation process of megamitochondria in cuprizone-treated mouse liver, *Acta Pathol. Jpn.*, **25**, 15–37.
- Vorobjev, I.A., and Zorov, D.V. (1983) Diazepam inhibits cell respiration and induces fragmentation of mitochondrial reticulum, *FEBS Lett.*, **163**, 311–314.
- Hansford, R.G., and Zorov, D. (1998) Role of mitochondrial calcium transport in the control of substrate oxidation, *Mol. Cell Biochem.*, **184**, 359–369.
- Зоров Д.В., Плотников Е.Ю., Силачев Д.Н., Зорова Л.Д., Певзнер И.Б., Зоров С.Д., Бабенко В.А., Янкаускас С.С., Попков В.А., Савина П.С. (2014) Микробиота и митобиота. Поставив знак равенства между митохондрией и бактерией, *Биохимия*, **79**, 1252–1268.
- Зоров Д.В., Исаев Н.К., Плотников Е.Ю., Силачев Д.Н., Зорова Л.Д., Певзнер И.Б., Моросанова М.А., Янкаускас С.С., Зоров С.Д., Бабенко В.А. (2013) Перспективы митохондриальной медицины, *Биохимия*, **78**, 1251–1264.
- Wikstrom, J.D., Twig, G., and Shirihai, O.S. (2009) What can mitochondrial heterogeneity tell us about mitochondrial dynamics and autophagy, *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **41**, 1914–1927.
- Palmer, J.W., Tandler, B., and Hoppel, C.L. (1977) Biochemical properties of subsarcolemmal and interfibrillar mitochondria isolated from rat cardiac muscle, *J. Biol. Chem.*, **252**, 8731–8739.
- Dolman, N.J., Gerasimenko, J.V., Gerasimenko, O.V., Voronina, S.G., Petersen, O.H., and Tepikin, A.V. (2005) Stable Golgi-mitochondria complexes and formation of Golgi Ca(2+) gradients in pancreatic acinar cells, *J. Biol. Chem.*, **280**, 15794–15799.
- Wikstrom, J.D., Katzman, S.M., Mohamed, H., Twig, G., Graf, S.A., Heart, E., Molina, A.J., Corkey, B.E., de Vargas, L.M., Danial, N.N., Collins, S., and Shirihai, O. (2007) Beta-cell mitochondria exhibit membrane potential heterogeneity that can be altered by stimulatory or toxic fuel levels, *Diabetes*, **56**, 2569–2578.
- Rizzuto, R., Pinton, P., Carrington, W., Fay, F.S., Fogarty, K.E., Lifshitz, L.M., Tuft, R.A., and Pozzan, T. (1988) Close contacts with the endoplasmic reticulum as determinants of mitochondrial Ca<sup>2+</sup> responses, *Science*, **280**, 1763–1766.
- Kuznetsov, A.V., and Margreiter, R. (2009) Heterogeneity of mitochondria and mitochondrial function within cells as another level of mitochondrial complexity, *Int. J. Mol. Sci.*, **10**, 1911–1929.
- Wolken, G.G., Kostal, V., and Arriaga, E.A. (2011) Capillary isoelectric focusing of individual mitochondria, *Anal. Chem.*, **83**, 612–618.
- Csordas, G., Várnai, P., Golenar, T., Roy, S., Purkins, G., Schneider, T.G., Balla, T., and Hajnoczky, G. (2010) Imaging interorganelle contacts and local calcium dynamics at the ER-mitochondrial interface, *Mol. Cell*, **39**, 121–132.
- Fuller, K.M., Duffy, C.F., and Arriaga, E.A. (2002) Determination of the cardiolipin content of individual mitochondria by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection, *Electrophoresis*, **23**, 1571–1576.
- Taylor, T.H., Frost, N.W., Bowser, M.T., and Arriaga, E.A. (2014) Analysis of individual mitochondria via fluorescent immunolabeling with Anti-TOM22 antibodies, *Anal. Bioanal. Chem.*, **406**, 1683–1691.
- Изюмов Д.С., Домнина Л.В., Непряхина О.К., Аветисян А.В., Гольшев С.А., Иванова О.Ю., Коротецкая М.В., Лямзаев К.Г., Плетюшкина О.Ю., Попова Е.Н., Черняк Б.В. (2010) Митохондрии как источники активных форм кислорода при окислительном стрессе. Исследование с помощью новых митохондриально-направленных антиоксидантов на основе «ионов Скулачевы», *Биохимия*, **75**, 149–157.
- Zorov, D.V., Filburn, C.R., Klotz, L.O., Zweier, J.L., and Sollott, S.J. (2000) Reactive oxygen species (ROS)-induced ROS release: a new phenomenon accompanying induction of the mitochondrial permeability transition in cardiac myocytes, *Exp. Med.*, **192**, 1001–1014.
- Belousov, V.V., Fradkov, A.F., Lukyanov, K.A., Staroverov, D.B., Shakhbazov, K.S., Terskikh, A.V., and Lukyanov, S. (2006) Genetically encoded fluorescent indicator for intracellular hydrogen peroxide, *Nature Methods*, **3**, 281–286.
- Хряпенкова Т.Г., Плотников Е.Ю., Коротецкая М.В., Сухих Г.Т., Зоров Д.В. (2008) Гетерогенность митохондриального потенциала как маркер для выделения чистой популяции кардиомиобластов, *Клеточные технологии в биологии и медицине*, **4**, 188–195.
- Sousa, A.P., Amaral, A., Baptista, M., Tavares, R., Caballero Campo, P., Caballero Peregrin, P., Freitas, A., Paiva, A., Almeida-Santos, T., and Ramalho-Santos, J. (2011) Not all sperm are equal: functional mitochondria characterize a subpopulation of human sperm with better fertilization potential, *PLoS One*, **6**, e18112.
- Chen, H.C., Chomyn, A., and Chan, D.C. (2005) Disruption of fusion results in mitochondrial heterogeneity and dysfunction, *J. Biol. Chem.*, **280**, 26185–26192.
- Dorn, G.W., 2nd, and Kitsis, R.N. (2015) The mitochondrial dynamism-mitophagy-cell death interactome: multiple roles performed by members of a mitochondrial molecular ensemble, *Circ. Res.*, **116**, 167–182.
- Jakobs, S., Stoldt, S., and Neumann, D. (2011) Light microscopic analysis of mitochondrial heterogeneity in cell populations and within single cells, *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.*, **124**, 1–19.
- Anand, R.K., and Chiu, D.T. (2012) Analytical tools for characterizing heterogeneity in organelle content, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **16**, 391–399.
- Jakobs, S., and Wurm, C.A. (2014) Super-resolution microscopy of mitochondria, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **20**, 9–15.
- Plotnikov, E.Y., Kazachenko, A.V., Vysokikh, M.Y., Vasileva, A.K., Tcvirkun, D.V., Isaev, N.K., Kirpatovsky, V.I.,

- and Zorov, D.B. (2007) The role of mitochondria in oxidative and nitrosative stress during ischemia/reperfusion in the rat kidney, *Kidney Int.*, **72**, 1493–1502.
33. Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., Tinevez, J.Y., White, D.J., Hartenstein, V., Eliceiri, K., Tomancak, P., and Cardona, A. (2012) Fiji: an open-source platform for biological-image analysis, *Nature Methods*, **9**, 676–682.
  34. Zack, G.W., Rogers, W.E., and Latt, S.A. (1977) Automatic measurement of sister chromatid exchange frequency, *J. Histochem. Cytochem.*, **25**, 741–753.
  35. Shanbhag, A.G. (1994) Utilization of information measure as a means of image thresholding, *Graph. Models Image Process*, Academic Press, **56**, 414–419.
  36. Biase, F.H., Cao, X., and Zhong, S. (2014) Cell fate inclination within 2-cell and 4-cell mouse embryos revealed by single-cell RNA sequencing, *Genome Res.*, **24**, 1787–1796.
  37. Van Blerkom, J., Davis, P., Mathwig, V., and Alexander, S. (2002) Domains of high-polarized and low-polarized mitochondria may occur in mouse and human oocytes and early embryos, *Hum. Reprod.*, **17**, 393–406.
  38. Zorov, D.B., Kobrinsky, E., Juhaszova, M., and Sollott, S.J. (2004). Examining intracellular organelle function using fluorescent probes: from animalcules to quantum dots, *Circ. Res.*, **95**, 239–252.
  39. Summerhayes, I.C., Lampidis, T.J., Bernal, S.D., Nadakavukaren, J.J., Nadakavukaren, K.K., Shepherd, E.L., and Chen, L.B. (1982) Unusual retention of rhodamine 123 by mitochondria in muscle and carcinoma cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 5292–5296.
  40. Zorov, D.B., Juhaszova, M., and Sollott, S.J. (2006) Mitochondrial ROS-induced ROS release: an update and review, *Biochim. Biophys. Acta*, **1757**, 509–517.
  41. D’Herde, K., De Prest, B., Mussche, S., Schotte, P., Beyaert, R., Coster, R.V., and Roels, F. (2000) Ultrastructural localization of cytochrome *c* in apoptosis demonstrates mitochondrial heterogeneity, *Cell Death Differ.*, **7**, 331–337.
  42. Krysko, D.V., Roels, F., Leybaert, L., and D’Herde, K. (2001) Mitochondrial transmembrane potential changes support the concept of mitochondrial heterogeneity during apoptosis, *J. Histochem. Cytochem.*, **49**, 1277–1284.
  43. Hackenbrock, C.R. (1968) Ultrastructural bases for metabolically linked mechanical activity in mitochondria. II. Electron transport-linked ultrastructural transformations in mitochondria, *J. Cell Biol.*, **37**, 345–369.
  44. Hackenbrock, C.R. (1972) Energy-linked ultrastructural transformations in isolated liver mitochondria and mitoplasts. Preservation of configurations by freeze-cleaving compared to chemical fixation, *J. Cell. Biol.*, **53**, 450–465.

## MITODIVERSITY

**V. A. Popkov<sup>1</sup>, E. Y. Plotnikov<sup>2</sup>, K. G. Lyamzaev<sup>2</sup>, D. N. Silachev<sup>2</sup>,  
L. D. Zorova<sup>3</sup>, I. B. Pevzner<sup>2</sup>, S. S. Jankauskas<sup>2</sup>, S. D. Zorov<sup>1</sup>,  
V. A. Babenko<sup>1</sup>, D. B. Zorov<sup>2\*</sup>**

<sup>1</sup> *M. V. Lomonosov Moscow State University, Faculty of Bioengineering and Bioinformatics, Moscow 119991, Russia*

<sup>2</sup> *M. V. Lomonosov Moscow State University, A. N. Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Moscow 119991, Russia; fax: +7(495)939-0338, E-mail: zorov@genebee.msu.ru*

<sup>3</sup> *M. V. Lomonosov Moscow State University, International Laser Center, Moscow 119991, Russia*

Received January 11, 2015

Revision received January 15, 2015

We complement the recently our introduced term «mitobiota» with another term, «mitodiversity», indicating various levels of heterogeneity of the phenotype and genotype of mitochondria within a single cell or organ. As follows from our data, such heterogeneity in values of transmembrane potential in mitochondria *in situ* and *in vitro* under normal conditions and after ischemia/reperfusion of an organ can be especially manifested under pathological conditions. However, even pathological cells contain some portion of the mitochondrial population with values of potential characteristic for a normal state, which can probably serve as a basis for developing ways of reversal of pathological phenotype to norm. A direct correlation between the values of the membrane potential of isolated mitochondria and side scattering, reflecting the internal structure of mitochondria is shown. The analysis of possible interpretations of the values of the mitochondrial membrane potential obtained using fluorescent probes is presented. A hypothesis on a possible mechanism of retention of some fluorescent probes in cells and mitochondria is put forth.

*Key words:* mitochondria, heterogeneity, diversity, chondriome, population analysis, membrane potential, ischemia, pathology, damage