

СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ МИТОХОНДРИЙ В КУЛЬТИВИРУЕМЫХ КЛЕТКАХ ЧЕЛОВЕКА ПРИ ОКИСЛИТЕЛЬНОМ СТРЕССЕ

Д. В. Лойчиц, Е. И. Кузнецова, С. В. Глушен, И. В. Семак

При ингибировании цепи транспорта электронов (ЦТЭ) и вызванного этим окислительного стресса наблюдается изменение формы митохондрий [1]. В интактных клетках митохондрии преимущественно имеют удлиненную форму, тогда как в условиях стресса они становятся кольцевидными и округлыми.

Проводя аналогичные исследования митохондрий клеток человека, мы обратили внимание на то, что наблюдаемые при окислительном стрессе морфологические изменения касаются не только их формы, но также размеров и взаимного расположения. В связи этим нами предлагается статистический подход к оценке изменений митохондрий в живых клетках на основе текстового анализа.

Объектом исследования служила перевиваемая культура клеток эмбриональной почки человека НЕК 293Т. Визуализация митохондрий обеспечивалась флуоресцентным зондом родамин 123 (Р123) в концентрации 10 мкг/мл, время загрузки 1 час. Для индукции окислительного стресса за 20 минут до отмывки к клеткам добавляли гидропероксид

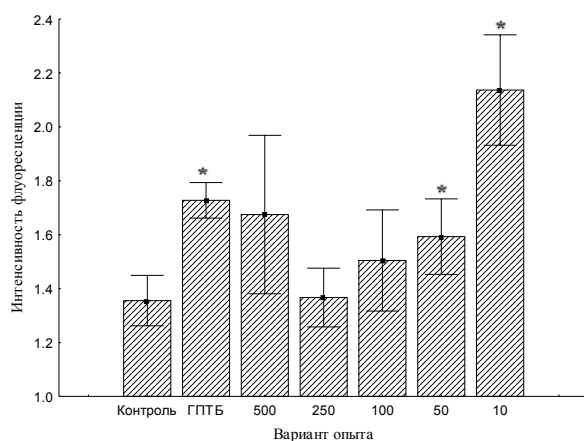


Рис. 1. Интенсивность флуоресценции Р123 (средняя интенсивность флуоресценции клеток) в культуре НЕК 293Т после воздействия ГПТБ (200 мкМ) отдельно и совместно с мелатонином в концентрациях 500, 250, 100, 50 и 10 мкМ соответственно (звездочкой отмечены достоверно отличные от контроля варианты опыта).

терт-бутила (ГПТБ) в концентрации 200 мкМ. В вариантах с купированием стресса за 15 минут до отмывки добавляли мелатонин в различных концентрациях. Цитологические препараты исследовали с помощью микроскопа Eclipse 50i (Nikon). Текстовые параметры клеток на микрофотографиях измеряли с помощью программы CellProfiler [2]. Р123 применялся в режиме с гашением, когда интенсивность его флуоресценции обратно пропорциональна отрицательному заряду на внутренней мембране митохондрий [3, с. 98–115].

Как следует из представленных результатов, ГПТБ вызывает увеличение интенсивности флу-

оресценции зонда в обработанных им клетках по сравнению с контролем, что свидетельствует о деполяризации внутренней мембраны митохондрий (рис. 1). Мелатонин подавляет этот эффект ГПТБ (за исключением концентрации 10 мкМ).

При визуальном наблюдении в микроскоп видно, что митохондрии в контрольной культуре формируют скопления, которые располагаются по периферии клетки, тогда как при вызванном ГПТБ окислительном стрессе они распределяются по всей цитоплазме. Клетки, одновременно обработанные ГПТБ и мелатонином, содержат митохондрии в виде плотных гранулярных скоплений аналогично контрольной культуре.

Для объективной оценки распределения митохондрий в цитоплазме был использован компьютерный анализ изображений клеток. Он выполнялся с помощью программы CellProfiler, которая позволяет вычислить ряд текстурных параметров на основе матрицы взаимной вероятности уровней серого. В таблице представлены результаты дисперсионного анализа текстурных параметров варианта опыта с полным подавлением окислительного стресса мелатонином в концентрации 250 мкМ.

Таблица

Результаты текстурного анализа клеток в варианте опыта с полным подавлением окислительного стресса мелатонином (250 мкМ)

Текстурный параметр:	Angular Second Moment (ASM)	Contrast	Correlation	Difference Entropy	Difference Variance	Entropy	Inverse Difference Moment (IDM)	SumAverage	SumEntropy	SumVariance	Variance
Контроль	0.136 ±0.004	0.165 ±0.009	0.969 ±0.002	0.431 ±0.009	0.133 ±0.003	2.350 ±0.03	0.918 ±0.004	7.029 ±0.1	2.235 ±0.01	12.746 ±0.5	3.228 ±0.12
ГПТБ	0.139 ±0.001	0.128 ±0.002	0.980 ±0.001	0.379 ±0.001	0.111 ±0.001	2.298 ±0.01	0.936 ±0.002	6.654 ±0.1	2.209 ±0.01	13.695 ±0.4	3.456 ±0.11
ГПТБ + мелатонин	0.132 ±0.002	0.130 ±0.005	0.981 ±0.001	0.382 ±0.001	0.112 ±0.003	2.345 ±0.01	0.935 ±0.002	7.103 ±0.1	2.254 ±0.01	15.377 ±0.5	3.877 ±0.13
p-уровень	0.179	0.091	0.804	0.175	0.123	0.001	0.912	0.202	0.598	0.110	0.637

Из данных таблицы следует, что к морфологическим изменениям митохондрий в живых клетках в условиях окислительного стресса наиболее чувствителен текстурный параметр Entropy, который интерпретируется как мера неупорядоченности текстуры изображения. В нашем случае значение данного параметра оценивается с позиции степени гранулярности митохондрий. Чем ниже значение энтропии, тем меньше гранулярность и, соответственно, больше степень повреждений вызванных воздействием стрессора.

Таким образом, полученные с помощью текстурного анализа результаты показывают, что окислительный стресс сопровождается морфологическими изменениями митохондрий. Они также подтверждают, что при определенных условиях мелатонин способен предотвращать окислительный стресс, вызванный нарушениями в ЦТЭ.

Литература

1. *T. Ahmad [et al.]* Computational classification of mitochondrial shapes reflects stress and redox state // Cell Death and Disease. – 2013. – № 4, e461; doi:10.1038/cddis.2012.213
2. *L. Kametsky [et al.]* Improved structure, function, and compatibility for CellProfiler: modular high-throughput image analysis software // Bioinformatics. – 2011. – doi: PMID: 21349861 PMID: PMC3072555
3. *S.W. Perry [et al.]* Mitochondrial membrane potential probes and the proton gradient: a practical usage guide // BioTechniques. – 2011. – № 50. – С. 98–115.

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ЭФФЕКТИВНОСТИ РАЗЛИЧНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ ИЗУЧЕНИЯ НОВОГО МАТЕРИАЛА НА УРОКАХ БИОЛОГИИ (НА ПРИМЕРЕ ТЕМЫ «КЛАСС ЗЕМНОВОДНЫЕ, ИЛИ АМФИБИИ»)

Н. А. Неборская, М. Л. Минец

Со временем цели и содержание образования меняются, появляются новые средства и технологии обучения. Но какие бы не свершались реформы, урок остается вечной и главной формой обучения. На нем держалась традиционная и стоит современная школа. Любой урок имеет огромный потенциал для решения новых задач. Но решаются эти задачи зачастую теми средствами, которые не могут привести к ожидаемому положительному результату, что ограничивает возможности выпускников школ в самореализации и успешной деятельности. Создание благоприятных условий для саморазвития, самосовершенствования и реализации личности ученика – вот что должно давать образование учащимся, чтобы войти в наш быстроменяющийся и столь проблемный мир. Проблема выбора наиболее эффективной технологии изучения нового материала остается наиболее актуальной и на сегодняшний день. Таким об-