

# МЕТОДЫ ИЗМЕРЕНИЯ МИТОХОНДРИЙ И ОКИСЛИТЕЛЬНО-ВОССТАНОВИТЕЛЬНОГО ПОТЕНЦИАЛА ПРИ ИШЕМИЧЕСКОМ ИНСУЛЬТЕ

Ойва Арвола, Ананд Рао, Крид М. Стари

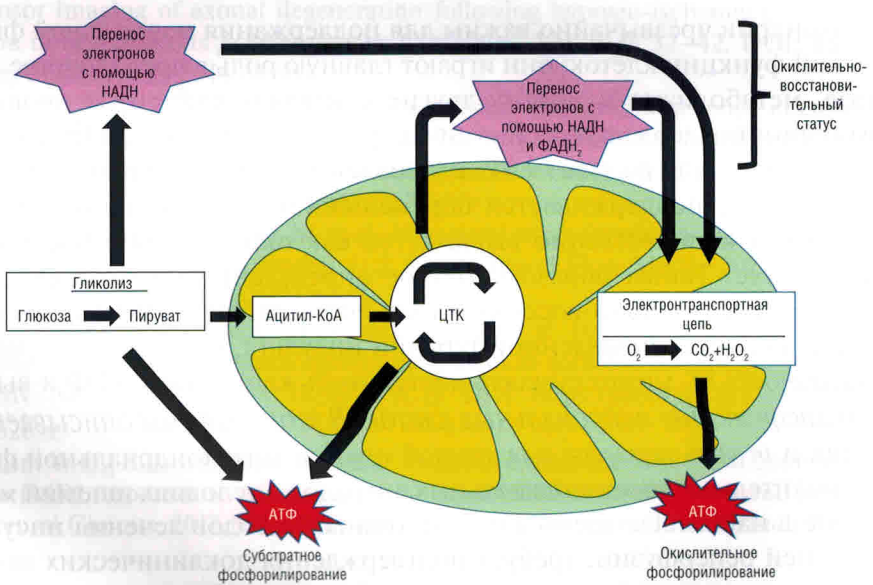
## Аннотация

Митохондрии чрезвычайно важны для поддержания нормальной физиологической функции клеток: они играют главную роль в производстве АТФ, апоптозе, метаболизме и многих других ключевых клеточных процессах. Митохондрии поддерживают динамическую потребность в АТФ, связывая электрохимический градиент с восстановлением молекулярного кислорода; этот процесс поддерживается перемещением электронов от носителя к рецептору и количественно выражается как окислительно-восстановительный статус. Таким образом, точное определение митохондриальной функции и окислительно-восстановительного статуса — центральное направление для целенаправленной терапии инсульта, когда даже временная недостаточность  $O_2$  может снизить доступность клеточного АТФ и вызвать гибель и дисфункцию нейрональных клеток. В этой главе мы описываем как *in vivo*, так и *in vitro* подходы для точной оценки митохондриальной функции и окислительно-восстановительных сигналов в условиях ишемии мозга. Отсутствие в настоящее время альтернативных методов лечения инсульта, кроме ранней реперфузии, требует подтверждения доклинических данных с помощью конгруэнтных параллельных показателей результатов, чтобы лучше гарантировать воспроизводимость и надлежащую интерпретацию данных.

**Ключевые слова:** биоэнергетика, АТФ, никотинамидадениндинуклеотид восстановленный (НАДН), никотинамидадениндинуклеотид (НАД), дыхание, респирометрия, окислительное фосфорилирование, флюорометрия, флюоресценция.

### 5.1. Введение

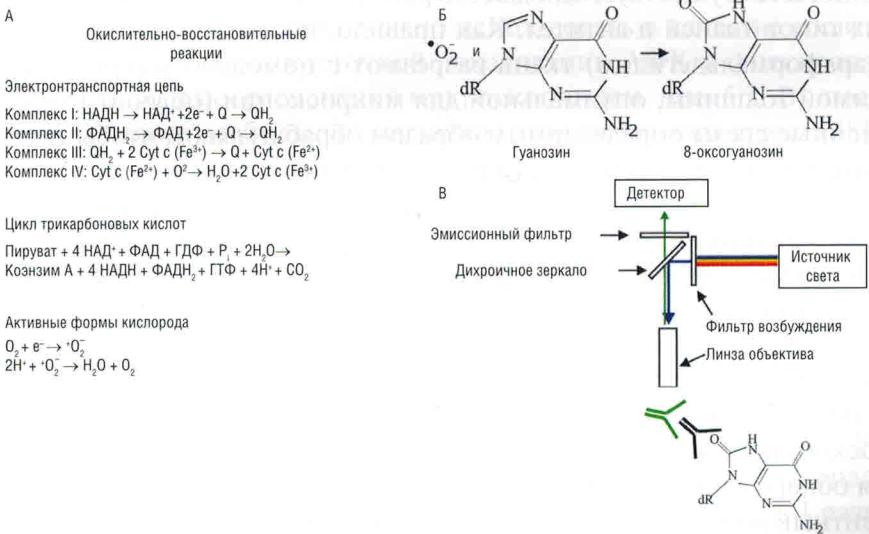
АТФ — высокоэнергетическая молекула, играющая главную роль в поддержании жизнеспособности клетки. Поддержание адекватной доступности АТФ имеет первостепенное значение для выживания клеток как в нормальном физиологическом состоянии, так и в ответ на ишемию мозга. Клеточное дыхание в митохондриях основано на окислительно-восстановительных реакциях, связанных с гликолизом, циклом трикарбоновых кислот (циклом Кребса) и электронтранспортной цепью (цепью переноса электронов), которые управляют окислительным фосфорилированием через переносчиков электронов — НАДН и флавинадениндинуклеотид (ФАДН<sub>2</sub>) (рис. 5.1). Окислительно-восстановительные реакции описывают переносом электронов от одного химического фрагмента (атома, иона или молекулы) к другому: химическое вещество, теряющее электроны, окисляется, а полученное в результате переноса электронов вещество восстанавливает-



**Рис. 5.1.** Общая схема биоэнергетических процессов в клетке. В результате гликолиза и цикла трикарбоновых кислот (ЦТК) посредством субстратного фосфорилирования образуется аденозинтрифосфат (АТФ); эти же процессы поставляют в электронтранспортную цепь электроны для образования АТФ посредством восстановления никотинамидадениндинуклеотида (НАДН) и флавинадениндинуклеотида (ФАДН<sub>2</sub>). Посредством хемиосмотического связывания электронтранспортная цепь запускает окислительное фосфорилирование и синтез АТФ, что приводит к восстановлению молекулярного кислорода (O<sub>2</sub>) до CO<sub>2</sub> и H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Так называемый окислительно-восстановительный статус клетки — это относительный баланс восстановленных и окисленных форм электронтранспортных молекул, таких как НАДН и ФАДН<sub>2</sub>. Таким образом, окислительно-восстановительный статус молекул НАДН и ФАДН<sub>2</sub> определяет скорость образования АТФ

ся. Таким образом, термином «окислительно-восстановительный статус» клетки обычно описывают общий относительный баланс между окисленным и восстановленным состоянием молекул. Энергия, выделяемая в цикле Кребса и электронтранспортной цепи, обеспечивает генерацию протонного градиента в межмембранном пространстве, который впоследствии используется для фосфорилирования аденозиндифосфата (АДФ) и получения АТФ. В физиологических условиях 0,2–2% молекул O<sub>2</sub> не полностью восстанавливаются в митохондриях, что приводит к переносу одного электрона от электронтранспортной цепи [1].

Активные формы кислорода (АФК) образуются как нормальный побочный продукт в результате восстановления молекулярного кислорода, однако дисфункция комплексов электронтранспортной цепи может привести к чрезмерному производству АФК и последующему окислительному повреждению клетки. Нарушение мозгового кровотока приводит к вызванному ишемией окислительному стрессу нейронов, поскольку нарушения происходят в электронтранспортной цепи на молекулярном уровне. Это приводит к увеличению уровней окисленного геномного материала, тако-го как ядерная ДНК, митохондриальная ДНК и РНК, а также окисленных



**Рис. 5.2.** Окислительно-восстановительные реакции и флуоресцентные индикаторы. Окислительно-восстановительные реакции характеризуют перенос электрона от донорной части к акцепторной. Перенос электронов приводит к окислительному фосфорилированию, которое, в свою очередь, приводит к образованию активных форм кислорода как побочного продукта восстановления молекулярного кислорода (А). 8-гидроксилизоксигуанозин — стабильный побочный продукт образования активных форм кислорода (Б). Его можно визуализировать с помощью флуоресцентной иммуногистохимии (В)



фосфолипидов и белков. Нейроны обладают множеством эндогенных механизмов для противодействия окислителям и независимого восстановления окислительных повреждений, но, кроме этого, в такой ситуации их могут защитить местные глиальные клетки. Эту реакцию на окислительный стресс можно визуализировать с помощью флюоресценции с использованием соответствующих ИГХ-маркеров и/или количественно оценить с помощью иммуноферментного анализа. Схемы окислительно-восстановительных реакций и образования АФК приведены на рис. 5.2.

---

## **5.2. Иммуногистохимические маркеры окислительного стресса и окислительно-восстановительных путей передачи сигналов**

### **5.2.1. Иммуногистохимия**

Обнаружение белков в фиксированных клетках или тканях с помощью антител, конъюгированных с флюорофорами или ферментами, — основной принцип ИГХ. Существует множество рабочих протоколов для окрашивания разных типов тканей и антител. Как правило, после фиксации (парафином или параформальдегидом) ткань разрезают с помощью микротомы до необходимой толщины, оптимальной для микроскопии (обычно 15–50 мкм). Полученные срезы определенным образом обрабатывают, чтобы пермеабилезировать клетки, ингибировать эндогенную пероксидазу и предотвратить неспецифическое связывание антител с клетками. Затем используют одно или несколько (если они не связываются перекрестно) первичных антител, которые с высокой аффинностью связываются с представляющими интерес белками; несвязавшиеся антитела отмывают. После первичных специфичных к белкам-мишеням антител добавляют вторичные антитела, помеченные флюорофором или другими красителями, которые можно визуализировать с помощью флюоресцентной микроскопии или методов светлопольной микроскопии, чтобы определить место локализации белка-мишени.

Для обнаружения белков в жидком образце обычно используют иммуноферментный анализ, в основе которого лежит аналогичный подход с применением антител. При этом отдельные белки-мишени из образца жидкости связываются с предварительно подготовленными планшетами для иммуноферментного анализа, дно которых покрыто антителами, специфичными к этим белкам. Затем добавляют вторичное антитело, связанное с ферментом, который можно визуализировать после добавления соответствующего субстрата. Определяют интенсивность окрашивания раствора в результате ферментативных преобразований; в качестве альтернативы можно исполь-

зовать флюоресцентный краситель. Таким образом, изменение интенсивности сигнала прямо пропорционально присутствию и количеству антигена, что позволяет определить уровень белка-мишени.

### 5.2.2. 8-гидроксидезоксигуанозин

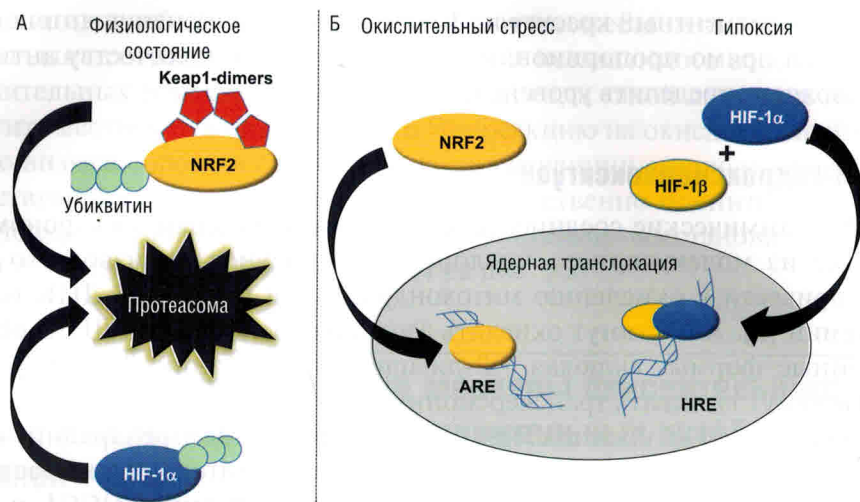
АФК — химические соединения с одним неспаренным электроном, полученные из молекулярного кислорода. Чрезмерное производство АФК может привести к окислению митохондриальной и ядерной ДНК во время ишемии [2]. АФК могут окислять азотистые основания в ДНК, образуя окисленные формы, включая 7,8-дигидро-8-оксогуанин (8-оксогуанин), которые могут вызывать трансверсионные мутации [3, 4]. Для поддержания целостности генома у клеток есть механизмы быстрой репарации; кроме того, вновь образованный 8-оксогуанин в ядрах и митохондриях распознается 8-оксогуанин-ДНК-гликозилазой, кодируемой геном *OGG1*, и целенаправленно удаляется [5]. Относительно стабильный конечный продукт, 8-гидроксидезоксигуанозин (8-ОНдГ) (см. рис. 5.2, Б), транспортируется из клетки и выводится почками [6, 7]. Уровень 8-ОНдГ можно определить количественно с помощью проточной цитофлуориметрии диссоциированных клеток, а также с помощью иммуноферментного анализа крови или мочи. Более того, 8-ОНдГ можно использовать в качестве косвенного маркера для определения клеточной локализации АФК в фиксированной ткани с помощью флюоресцентной микроскопии (см. рис. 5.2, В), поскольку 8-ОНдГ считают стабильным маркером окислительного стресса [8].

### 5.2.3. Транскрипционный фактор NRF2

Белок NRF2 (от англ. nuclear factor erythroid 2-related factor 2) — член семейства белков с «лейциновой молнией», центральное звено одного из основных защитных механизмов клетки от окислительного стресса [9]. В физиологических условиях NRF2 связывается с белком Keap1 и с элементами цитоскелета внутри клетки [10].

При незначительном уровне окислительного стресса комплекс NRF2/Keap1 подвергается убиквитинилированию и протеасомной деградации (рис. 5.3) [11]. При окислительном стрессе комплекс NRF2/Keap1 разрушается и NRF2 перемещается в ядро, где он образует гетеродимеры с белками семейства Maf [12]. Эти гетеродимеры связываются с определенной последовательностью ДНК, известной как ARE (от англ. antioxidant response elements — элементы антиоксидантного ответа), и способствуют активации транскрипции антиоксидантных ферментов и ферментов 2-й фазы детоксикации, в том числе защитных белков, участвующих в ответе на окислительный стресс [13, 14]. Протеинкиназа С оказывает как прямое влияние





**Рис. 5.3.** Факторы NRF2 и HIF-1. NRF2 и HIF-1α — факторы транскрипции, способные реагировать на стрессовые факторы, такие как чрезмерное производство оксидантов или снижение доступности кислорода соответственно. В состоянии покоя NRF2 связан с димерами белка Keap1 и молекулами убиквитина, которые совместно направляют комплекс NRF2/Keap1 на протеосомную деградацию; HIF-1α при этом связан с убиквитином сам по себе, что также приводит к его целенаправленной протеосомной деградации (А). В ответ на окислительный стресс Keap1 и убиквитин перестают связываться с NRF2, в результате он перемещается в ядро и связывается с участком ДНК, известным как ARE, что приводит к активации транскрипции цитопротекторных генов (Б). Точно так же HIF-1α при гипоксии перестает связываться с убиквитином, а вместо этого связывает кофактор HIF-1β, что приводит к его транслокации в ядро и активации транскрипции цитопротекторных генов

на Keap1, так и косвенное — через NRF2, посредством фосфорилирования [15]. Уровень NRF2 можно определить с помощью ИФА и ИГХ, что позволяет оценить содержание NRF2 в клетках и тканях после повреждения [16].

#### 5.2.4. HIF-1α

Центральное звено клеточного механизма ответа на гипоксию и регулирования окислительно-восстановительного статуса клетки — фактор HIF-1 (от англ. hypoxia-inducible factor 1 — индуцируемый гипоксией фактор 1) [17]. HIF-1 — гетеродимерный комплекс, состоящий из двух субъединиц: α-субъединицы с молекулярной массой 120 кД и β-субъединицы с молекулярной массой 91–94 кД [18]. HIF-1α конститутивно транслируется, но впоследствии разрушается убиквитин-протеасомным путем (см. рис. 5.3). В ответ на гипоксию убиквитинирование HIF-1α значительно снижается, что приводит к повышению клеточного уровня HIF-1α [19]. Окислительный стресс также способствует стабилизации HIF-1α в условиях гипоксии [20]. Стабилизированный HIF-1α связывается с другими субъединицами и регу-

лирует множество индуцируемых гипоксией генов-мишеней, таких как гены эритропоэтина, переносчиков глюкозы и VEGF, что позволяет клетке противостоять как клеточной, так и системной гипоксии, а также окислительному стрессу [21–23]. Однако гипоксия также служит петлей отрицательной обратной связи для HIF-1 $\alpha$ , поскольку этот фактор отрицательно регулирует пролил-4-гидроксилазы [24]. HIF-1 $\alpha$  способствует смягчению связанных с АФК повреждений головного мозга после церебрального ишемического инсульта; было показано, что дефицит HIF-1 $\alpha$  усиливает повреждение головного мозга [25], а экспериментальные лекарственные препараты на основе HIF-1 $\alpha$  увеличивают устойчивость к ишемии мозга [26, 27]. HIF-1 $\alpha$  можно визуализировать с помощью ИГХ, таким образом можно определить его локализацию после ишемии и реперфузии [28].

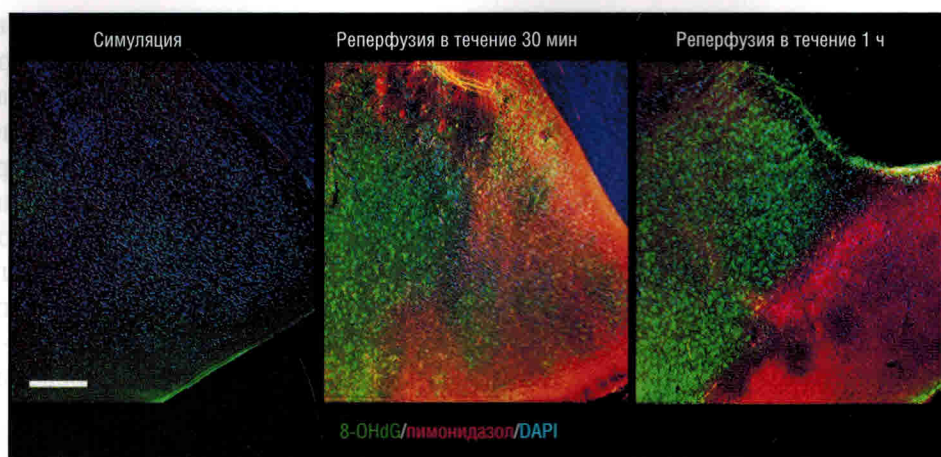
### 5.2.5. DJ-1

DJ-1 — это повсеместно встречающийся белок, противодействующий АФК [29], который реагирует на H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, чувствителен к окислению и восстановлению и действует как антиоксидант [30]. DJ-1 связан с каскадом клеточной смерти [31]: во время ишемического инсульта DJ-1 перемещается на внутреннюю мембрану митохондрий и защищает комплекс I электронтранспортной цепи от воздействия АФК [29]. Изменения уровня DJ-1 после ишемического инсульта головного мозга можно оценить с помощью иммуноблоттинга [32], а также визуализировать с помощью ИГХ.

### 5.2.6. Пимонидазол

Пимонидазола гидрохлорид (Гипоксипроб<sup>®</sup>) — коммерчески доступный индикатор гипоксии, который проникает через гематоэнцефалический барьер и необратимо связывается с тиолсодержащими белками в гипоксических тканях. Благодаря особенностям его фармакокинетики у мышей его можно использовать для моделей острой ишемии, таких как преходящая СМА, когда его вводят внутривенно до травмы [33]. Поскольку период полураспада пимонидазола в плазме всего около 20 мин, его уровень можно надежно оценить через несколько периодов полураспада после инъекции без заметного фона гипоксии тканей, вызванной сбором образцов. Наша лаборатория разработала флуоресцентный ИГХ-подход для независимой оценки продукции АФК в ишемическом ядре по сравнению с полутенью после окклюзии СМА у мышей с использованием индикатора АФК 8-ОНдГ в комплексе с индикатором гипоксии пимонидазолом (рис. 5.4). Протокол комплексообразования пимонидазола гидрохлорида с 8-ОНдГ для локализации ишемических областей и продукции АФК после окклюзии СМА приведен ниже.





**Рис. 5.4.** Генерация активных форм кислорода в ишемическом ядре и полутени после окклюзии средней мозговой артерии. После внутривенной инъекции индикатора гипоксии пимонидазола (красный) животных подвергали фиктивной или часовой окклюзии средней мозговой артерии и умерщвляли через 30 мин или 2 ч реперфузии. Фиксированный мозг окрашивали одновременно индикатором активных форм кислорода 8-гидрокси-2'-дезоксигуанозином (8-OHdG, зеленый) и ядерным красителем 4',6-диамидино-2-фенилиндолом (DAPI). Существенное повышение выработки активных форм кислорода сохраняется в полутени как при 30-минутной, так и 2-часовой реперфузии. Совместное окрашивание пимонидазолом и 8-OHdG в ишемическом ядре проявляется через 30 мин, но не через 2 ч. Масштабный отрезок — 100 мкм

### **Методика: образование комплекса пимонидазола гидрохлорид и 8-гидрокси-2'-дезоксигуанозина**

#### **Последовательность действий.**

1. Гипоксипроб ресуспендируют в стерильном 0,9% растворе натрия хлорида; концентрация получившегося раствора должна быть 30 мг/мл.
2. Мышей взвешивают, анестезируют и внутривенно вводят пимонидазола гидрохлорид из Гипоксипроб (номер по каталогу НР1-1000) в дозе 60 мг/кг массы тела за 5 мин до окклюзии СМА.
3. Пимонидазол циркулирует *in vivo* в полном объеме в течение 5 мин, затем проводят окклюзию СМА в течение 60 мин. Период последующего наблюдения — 30 мин, затем мышей умерщвляют в соответствии с протоколом, утвержденным IACUC. Мозг фиксируют перфузией 4% раствора параформальдегида.
4. Промытый физиологическим раствором и фиксированный мозг удаляют и помещают для дальнейшей фиксации в параформальдегид на 48 ч при 4 °С.
5. С помощью вибротома или микротома делают срезы мозга толщиной до 50 мкм.



6. Срезы обрабатывают для флюоресцентной ИГХ следующим образом.
  - А. Срезы промывают и пермеабелизуют в фосфатно-солевом буфере PBS-t дважды в течение 5 мин.
  - Б. Блокируют неспецифическое связывание в блокирующем ИГХ-буфере в течение 1 ч при комнатной температуре или в течение ночи при 4 °С.
  - В. Блокируют эндогенные аутофлюоресцентные молекулы, инкубируя срезы с H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> от 30 мин до 2 ч.
  - Г. Промывают буфером PBS-t три раза по 5 мин каждый.
  - Д. Добавляют первичные антитела (мышинные антимиโคนидазол и козы анти-8-ОНdG), разведенные в соотношении 1:200; инкубируют при 4 °С в течение ночи при легком перемешивании.
  - Е. Промывают буфером PBS-t три раза по 5 мин каждый.
  - Ж. Добавляют вторичные антитела (антикозы и антимышинные ослиные антитела), разведенные в соотношении 1:200, и DAPI, разведенный в соотношении 1:5000; инкубируют при 4 °С в течение ночи при осторожном перемешивании.
3. Трижды промывают буфером PBS-t, накрывают предметным стеклом.
- И. Получают изображения на прямом флюоресцентном микроскопе при длинах волн эмиссии флюоресценции 350 нм (синий), 488 нм (зеленый) и 594 нм (красный).

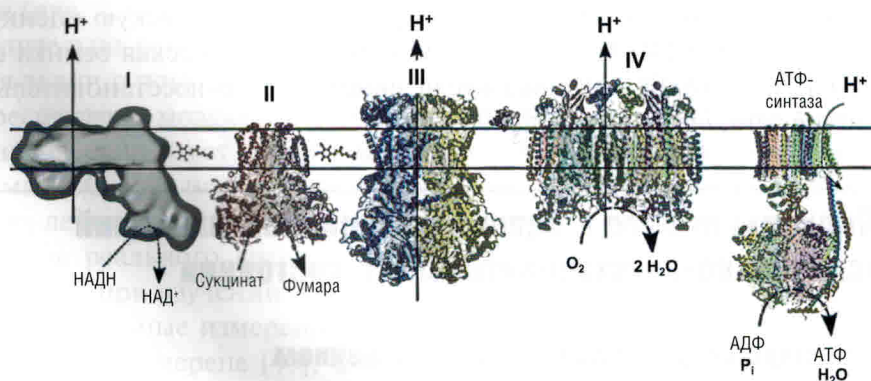
#### Реагенты.

- Набор «Гипоксипроб» (100 мг пимонидазола–HCl и 1,0 мл мышинных антител 4.3.11.3) (Нурохупробе™, HP1-100Kit).
- PBS (Sigma-Aldrich, каталожный номер P-4417).
- Козы анти-8-ОНdG антитела (Abcam, ab10802).
- Ослиные антикозы IgG H&L (Alexa Fluor® 488; Abcam, ab150129).
- Ослиные антимышинные Ig GH&L (Alexa Fluor® 594; Abcam, ab150108).
- ТритонX-100 (Sigma-Aldrich, T8787).
- Защитное покрытие для стекла ProLong™ (Invitrogen, P36980).
- DAPI (Invitrogen, D1306).
- Нормальная козья сыворотка (Invitrogen, 10000C).
- Слайды (Thermo Fisher Scientific, 12-550-15).
- Стекла с микропокрытием (VWR International, 48393-106).

#### Растворы.

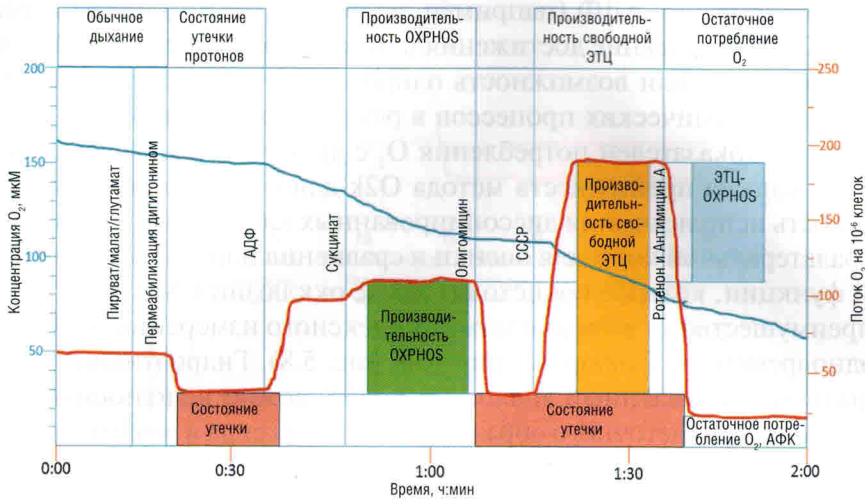
- Блокирующий ИГХ-буфер (5% нормальная козья сыворотка в PBS): 500 мкл сыворотки в 10 мл PBS.
- Буфер PBS-t (0,1% Тритон X-100 в PBS): 100 мкл Тритона X-100 в 100 мл PBS.
- 0,9% раствор натрия хлорида: растворяют 0,9 г натрия хлорида (NaCl) в 100 мл деионизованной воды.

ции. Ишемия мозга приводит к митохондриальной дисфункции, ведущей к гибели нейрональных клеток. Таким образом, подходы, которые позволяют точно определить механизмы, приводящие к митохондриальной дисфункции, можно использовать для разработки митохондриальной целевой терапии после инсульта. Респирометр Oroboros™ O2k состоит из двух закрытых камер объемом 2 мл с регулируемой температурой, в которых стоят полярографические датчики кислорода для измерения концентрации кислорода в реальном времени [45]. Можно анализировать как клеточные культуры, так и диссоциированные клетки из образцов тканей. Клетки обычно проницаемы для экзогенного АДФ, субстратов и комплексных ингибиторов — все эти вещества могут проникать в клетки. Затем используют протокол «субстрат—разобшитель—ингибитор—титрование» для оценки нефосфорилирующей стадии дыхания (известной как состояние 4, или состояние LEAK), производительности окислительного фосфорилирования и емкости электронтранспортной цепи (рис. 5.7). АДФ и сукцинат насыщают для изучения влияния ввода электронов через комплексы I и II, количественно определяя емкость окислительного фосфорилирования. Сложные разобшители (например, р-трифторметоксикарбонилцианидфенилгидразон, известный как FCCP, или карбонилцианид м-хлорфенилгидразин, известный как CCCP) используют для определения максимальной емкости электронтранспортной цепи. Уровень потребления  $O_2$  за пределами дыхательных путей определяют ингибированием комплексов I и III ротеноном и антимицином А, блокированием НАДН-дегидрогеназы (комплекс I) и предотвращением окисления НАДН, а также окислением сукцината в комплексе III, что приводит



**Рис. 5.6.** Электронтранспортная цепь митохондрий. НАДН и ФАДН<sub>2</sub>, образующиеся в цикле трикарбоновых кислот, переносят электроны в комплексы I и II электронтранспортной цепи соответственно. Комплексы I, III и IV преобразуют энергию в электродвижущую силу, перемещая протоны через внутреннюю мембрану митохондрий, чтобы создать протонодвигательный градиент. Затем протонодвижущая сила заставляет хемиосмотический фермент АТФ-синтазу фосфорилировать АДФ до АТФ в качестве основного источника энергии для всех эукариотических клеток





**Рис. 5.7.** Иллюстрация респираторных состояний, измеренных респирометром Oroboros O<sub>2</sub>k. Перед введением любого дополнительного субстрата записывают обычное дыхание. После насыщения комплекса I субстратами и пермеабиллизации клеток индуцируется нефосфорилирующее состояние покоя (состояние утечки протонов без аденилатов). Добавляя АДФ и сукцинат, измеряют производительность стимулированного окислительного фосфорилирования (OXPHOS, зеленая рамка). Ингибирование системы фосфорилирования на уровне АТФ-синтазы с помощью олигомицина вызывает другое состояние — LEAK (состояние утечки протонов с аденилатами). Во время состояний утечки протонов (розовые прямоугольники) поток кислорода сводится к минимуму. При стимуляции установленными протонфорами карбонилцианид м-хлорфенилгидразоном (СССР) или карбонилцианид-4-(трифторметокси)фенилгидразоном (СССР) можно измерить эталонное состояние производительности свободной электрон-транспортной цепи (оранжевые и синие прямоугольники)

к полному ингибированию дыхания. **Важный момент:** скорость потребления кислорода должна быть нормирована на объем ткани или количество клеток (оценивают с помощью цитометрии).

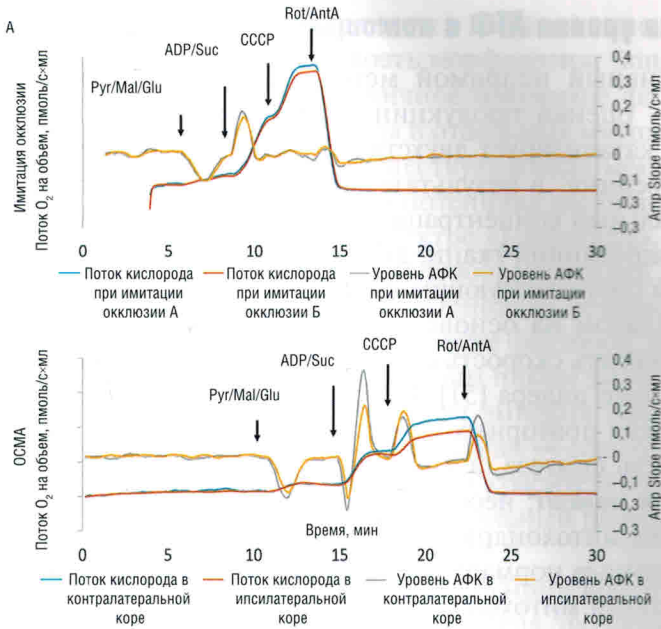
#### 5.4.2. Комплексное респирометрическое и флюориметрическое исследование

Разрешение традиционных методов оценки окислительного фосфорилирования по техническим причинам было ограничено. Раньше для прямой оценки уровня потребления O<sub>2</sub> и концентрации АТФ были необходимы отдельные независимые измерения, добавляющие варибельность между образцами; при этом оценка потребления O<sub>2</sub> при известном уровне концентрации АДФ в качестве субстрата для окислительного фосфорилирования ограничена в динамическом диапазоне и не учитывает другие источники

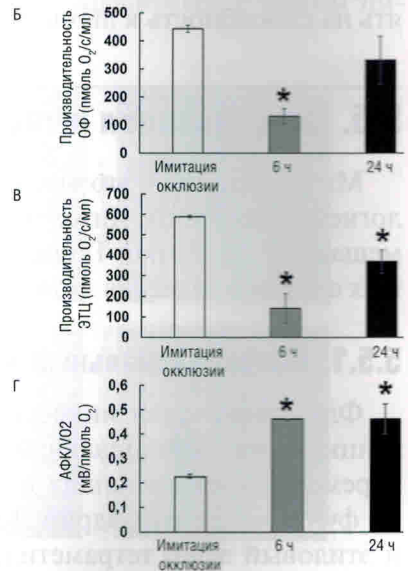
рефосфорилирования АДФ (например, из фосфокреатинкиназы /креатинкиназы). Однако недавние достижения в методах флюоресцентной визуализации резко улучшили возможность одновременного наблюдения внутриклеточных биохимических процессов в режиме реального времени за счет объединения показателей потребления  $O_2$  с другими биологическими процессами. Одно из преимуществ метода O2k для исследования инсульта — возможность использования диссоциированных клеток из ипсилатеральной и контралатеральной коры для оценки и сравнения нарушения митохондриальной функции, которое происходит после окклюзии СМА (рис. 5.8). Еще одно преимущество — возможность комплексного измерения АФК с помощью одновременной флюорометрии (см. рис. 5.8). Гидроэтидин или митохондриально-направленный аналог Mito-SOX можно использовать для обнаружения внутриклеточного образования супероксида в реальном времени. Несмотря на недостаток в обнаружении внутриклеточного образования супероксида в образцах ткани только с помощью флюоресцентной микроскопии, Mito-SOX — наиболее часто используемый зонд для обнаружения АФК для количественного внутриклеточного измерения оксидантов [46]. Еще одна система, позволяющая объединить респирометрию и флюорометрию, — это анализатор внеклеточного потока Seahorse FX. По сравнению с управляемым оператором двухкамерным O2k автоматический анализатор внеклеточного потока Seahorse XF может выполнять высокопроизводительный анализ 96-луночного планшета. Обе системы могут оценивать данные о митохондриальном дыхании в режиме реального времени в изолированных митохондриях и культивируемых клетках. **Важный момент:** ограничения SeahorseXF — высокая стоимость оптимизации, проведения анализов и флюоресцентных планшетов, а также потенциальное вмешательство в инъекционные соединения и флюоресценцию сенсора [47, 48].

Более поздний комплексный подход для оценки эффективности окислительного фосфорилирования был разработан [49] в проницаемых волокнах скелетных мышц с использованием ферментативного связывания. Ферментативное связывание АТФ в качестве субстрата для НАДФ<sup>+</sup> и одновременная оценка снижения биолюминесценции НАДФ<sup>+</sup> (НАДФН) и потребления молекулярного  $O_2$  позволяют измерить сродство окислительного фосфорилирования к АДФ в физиологических стационарных условиях. Этот подход, в котором фиксируются концентрации АДФ и АТФ, обеспечивает измерение эффективности окислительного фосфорилирования с высоким разрешением за счет: (1) уменьшения межпробной изменчивости с одновременным измерением потребления  $O_2$  и НАДФН; (2) повышения точности измерений с помощью повторных измерений в рамках одного эксперимента. Теоретически этот подход можно применять к первичным культурам клеток головного мозга.





**Рис. 5.8.** Комплекс респирометрии и флуорометрии с высоким разрешением для оценки функции митохондрий и образования активных форм кислорода после окклюзии средней мозговой артерии (ОСМА). А — отслеживание скорости потребления O<sub>2</sub> (поток O<sub>2</sub>/VO<sub>2</sub>, пмоль O<sub>2</sub> в секунду на миллилитр) и скорости продукции активных форм кислорода (АФК) (флуоресценция гидроэтидина, объем в секунду на миллилитр) в диссоциированных клетках коры головного мозга фиктивных животных (см. выше) и ипсилатеральной и контралатеральной коры через 24 ч после окклюзии средней мозговой артерии (см. ниже) во время титрования субстрата-разобщителя-ингибитора: субстрат комплекса I (Pyr/Mal/Glu) для определения утечки протонов; субстрат комплекса II (АДФ/Suc) для определения емкости окислительного фосфорилирования (ОФ), комплексный разобщитель (СССР) для определения максимальной емкости электронтранспортной цепи (ЭТЦ); ингибиторы комплекса I и III (Rot/AntA) для определения потребления O<sub>2</sub> за пределами дыхательных путей. Б — количественная оценка емкости окислительного фосфорилирования. В — количественная оценка максимального потока электрон-транспортной цепи. Г — количественная оценка образования активных форм кислорода на единицу потребления O<sub>2</sub>. Звездочкой показана значимая (p < 0,05) разница по сравнению с имитацией окклюзии. Обозначения: pyr — пиррипуват; mal — малат; glu — глутамат; СССР — карбонилцианид м-хлорфенилгидразин; Rot — ротеон; AntA — антимицин А



Б — количественная оценка емкости окислительного фосфорилирования. В — количественная оценка максимального потока электрон-транспортной цепи. Г — количественная оценка образования активных форм кислорода на единицу потребления O<sub>2</sub>. Звездочкой показана значимая (p < 0,05) разница по сравнению с имитацией окклюзии. Обозначения: pyr — пиррипуват; mal — малат; glu — глутамат; СССР — карбонилцианид м-хлорфенилгидразин; Rot — ротеон; AntA — антимицин А

### 5.4.3. Оценка уровня АТФ с помощью биолюминесценции

Альтернативный непрямой метод для характеристики функции митохондрий — оценка продукции АТФ с помощью биолюминесценции. Люцифераза катализирует двухстадийную АТФ-зависимую реакцию окисления люциферина, в результате которой генерируется световой сигнал, пропорциональный концентрации АТФ [50, 51]. Митохондрии, выделенные из гомогенизированной ткани, дышат и вырабатывают АТФ, когда им предоставляются соответствующие субстраты. В сочетании с коммерчески доступным анализом на основе рекомбинантной люциферазы эта реакция позволяет измерять скорость синтеза АТФ с использованием люцинометра или планшетного ридера [51]. Скорость синтеза АТФ рассчитывают на основе нескольких повторных измерений; при этом наклон кривой характеризует скорость синтеза, а концентрация представлена как функция времени. **Важный момент:** необходимо нормализовать данные в соответствии с содержанием митохондрий или изменениями митохондриального состава. Обычно данные нормализуют на количество митохондриального белка, количество копий митохондриальной ДНК или активность цитратсинтазы [51]. Неправильная гомогенизация может повредить митохондрии и повлиять на способность к дыханию.

---

## 5.5. Визуализация живых клеток

Митохондрии — это высокодинамичные органеллы с различной морфологией. Более того, митохондрии распадаются, сливаются и активно перемещаются по клетке. Таким образом, визуализация митохондрий и связанных с ними процессов — ценный источник информации.

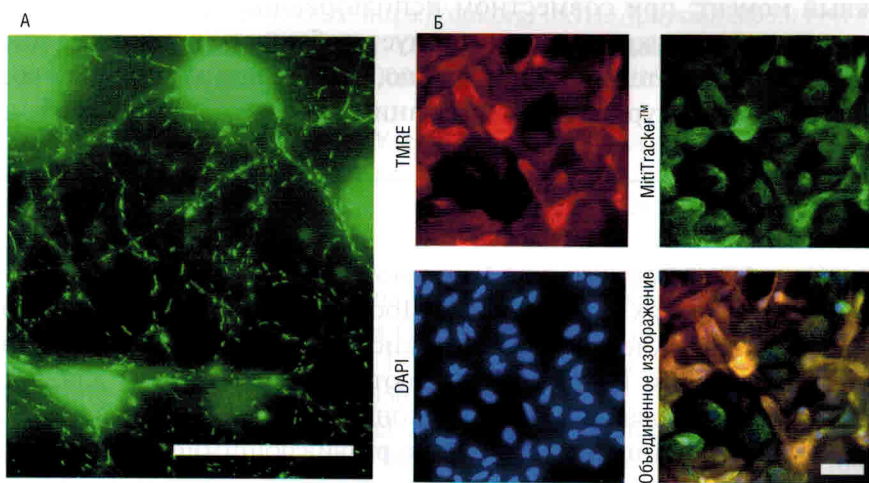
### 5.5.1. Митохондриальный мембранный потенциал

Флюоресцентная микроскопия — мощный инструмент для оценки потенциала митохондриальной мембраны и, таким образом, оценки влияния переменных, отражающих токсичность, болезнь и травму, которые влияют на функцию митохондрий. Красители и реагенты, такие как родамин 123 и этиловый эфир тетраметилродамина, используют для визуализации митохондрий, а также для анализа потенциала митохондриальной мембраны (рис. 5.9). Это обратимые зонды, которые окрашивают митохондрии, и интенсивность этого окрашивания зависит от потенциала митохондриальной мембраны. Другие красители, такие как MitoTracker™, встраиваются и накапливаются в активных митохондриях вторично по отношению к трансмембранному потенциалу. Красители, не чувствительные к мембранному потенциалу, такие как CellLight™, можно комбинировать с потенциалзависимыми



красителями для измерения флуоресценции с двойной эмиссией, что помогает исследователям учесть изменчивость морфологии. Зонды с двойной эмиссией, такие как JC-1<sup>TM</sup>, имеют различное излучение флуоресценции в зависимости от мембранного потенциала в отдельных митохондриях. При низком мембранном потенциале JC-1 существует в виде мономера, флуоресцирующего в зеленом диапазоне. Когда потенциал увеличивается, JC-1<sup>TM</sup> образует флуоресцирующие в красном спектре «J-агрегаты». Таким образом, соотношение между зеленой и красной флуоресценцией JC-1<sup>TM</sup> можно использовать для измерения мембранного потенциала независимо от плотности, длины и морфологии митохондрий, а также факторов, которые могут повлиять на вышеупомянутые красители с одним пиком эмиссии [52]. В качестве альтернативы красители с одним пиком эмиссии можно использовать вместе. Один из примеров такого окрашивания — совместное окрашивание этиловым эфиром тетраметилродамина и красителем MitoTracker<sup>TM</sup>. Эта комбинация позволяет оценить митохондриальный потенциал со стандартизацией по плотности митохондрий.

**Важные моменты.** На интенсивность флуоресценции красителей с одной длиной волны может влиять концентрация красителя, фотообесцвечивание и движение. При использовании двух или более красителей с одним пи-



**Рис. 5.9.** Флуоресцентное изображение митохондриальной функции живых клеток. А — первичная культура корковых нейронов, окрашенная MitoTrackerGreen<sup>TM</sup>. Б — первичная культура корковых астроцитов, окрашенная индикатором потенциала митохондриальной мембраны этиловым эфиром тетраметилродамина (TMRE, красный). Ядерный краситель DAPI (синий) позволяет оценить количество клеток для стандартизации сигнала TMRE. MitoTracker Green<sup>TM</sup> аналогичным образом позволяет стандартизировать плотность митохондрий. Объединенные изображения также можно использовать для оценки и сравнения клеточно-специфического потенциала митохондриальной мембраны.

Масштабный отрезок — 15 мкм

ком эмиссии может потребоваться последовательное окрашивание (то есть сначала окрашивают первым красителем, отмывают излишек красителя, а только затем окрашивают следующим красителем) для предотвращения конкурентного связывания красителей или других побочных эффектов, влияющих на интенсивность сигнала флюоресценции [53].

### 5.5.2. Митохондриальный кальций

Определенный уровень кальция внутри клетки — неотъемлемое условие функционирования клеток, а митохондрии играют центральную роль в буферизации кальция для поддержания гомеостаза. Буферную способность митохондрий можно измерить с помощью производного родамина — RHOD-2<sup>TM</sup> — положительно заряженного индикатора кальция, способного проходить через клеточную мембрану и окрашивать митохондрии в живых клетках. При использовании RHOD-2<sup>TM</sup> митохондрии обычно видны только после поглощения кальция. В результате такого окрашивания, в сочетании с потенциалнезависимым митохондриальным красителем, можно получить ценную информацию относительно расположения митохондрий и их пространственной связи с местами высвобождения и депонирования внутриклеточного кальция.

**Важный момент:** при совместном использовании RHOD-2<sup>TM</sup> с другими митохондриальными красителями следует соблюдать осторожность и использовать последовательную инкубацию, чтобы минимизировать возможные эффекты от конкурентного связывания.

---

## 5.6. Выводы

Острая необходимость в разработке новых альтернативных методов лечения инсульта до сих пор остается. Достижения в области методов визуализации живых клеток, оценка окислительного фосфорилирования в реальном времени и ИГХ обеспечивают новую платформу для создания подходов, ориентированных на митохондрии, специфичные для клеток и органов. Объединение этих методов с развивающимися инновационными технологиями в области визуализации в реальном времени, такими как двухфотонная прижизненная микроскопия, магнитно-резонансная спектроскопия или оптическое измерение O<sub>2</sub> через затухание фосфоресценции, будет способствовать повышению точности измерений и углублению нашего понимания фундаментальной механики митохондриальной биоэнергетики. Мультимодальное комплексообразование — это один из подходов к получению параллельных критериев эффективности для доклинических испытаний новых лекарств, необходимость в которых растет в наш



век трансляционных неудач для новых методов лечения инсульта. Развитие и применение этих методов к другим типам живых клеток будет способствовать дальнейшему выявлению универсальных, специфичных для клеток и органов путей, регулирующих функцию митохондрий и окислительно-восстановительное состояние, тем самым проясняя роль митохондрий как при нормальном физиологическом состоянии, так и в эволюции повреждений после инсульта.

## Благодарность

Финансирование: при поддержке Финского культурного фонда, грант № 00171200, выданный О.А. и грант Американской кардиологической ассоциации 14FTF19970029 для С.М.С.

## Литература

1. Madamanchi N.R., Runge M.S. Mitochondrial dysfunction in atherosclerosis // *Circ. Res.* 2007. Vol. 100, N 4. P. 460–473.
2. Turrens J.F. Mitochondrial formation of reactive oxygen species // *J. Physiol.* 2003. Vol. 552. Pt 2. P. 335–344. DOI: <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2003.049478>
3. Greco N.J., Sinkeldam R.W., Tor Y. An emissive C analog distinguishes between G, 8-oxoG, and T // *Org. Lett.* 2009. Vol. 11, N 5. P. 1115–1118. DOI: <https://doi.org/10.1021/ol802656n>
4. Kubo N., Morita M., Nakashima Y. et al. Oxidative DNA damage in human esophageal cancer: clinicopathological analysis of 8-hydroxydeoxyguanosine and its repair enzyme // *Dis. Esophagus.* 2014. Vol. 27, N 3. P. 285–293. DOI: <https://doi.org/10.1111/dote.12107>
5. Iida T., Furuta A., Nakabeppu Y. et al. Defense mechanism to oxidative DNA damage in glial cells // *Neuropathology.* 2004. Vol. 24, N 2. P. 125–130.
6. Ba X., Aguilera-Aguirre L., Rashid Q.T. et al. The role of 8-oxoguanine DNA glycosylase-1 in inflammation // *Int. J. Mol. Sci.* 2014. Vol. 15, N 9. P. 16975–16997. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms150916975>
7. Mazurek A., Berardini M., Fishel R. Activation of human MutS homologs by 8-oxo-guanine DNA damage // *J. Biol. Chem.* 2002. Vol. 277, N 10. P. 8260–8266. DOI: <https://doi.org/10.1074/jbc.M111269200>
8. Chiou C.C., Chang P.Y., Chan E.C. et al. Urinary 8-hydroxydeoxyguanosine and its analogs as DNA marker of oxidative stress: development of an ELISA and measurement in both bladder and prostate cancers // *Clin. Chim. Acta.* 2003. Vol. 334, N 1–2. P. 87–94. S0009898103001918 [pii]
9. Liu Y., Zhang L., Liang J. Activation of the Nrf2 defense pathway contributes to neuroprotective effects of phloretin on oxidative stress injury after cerebral ischemia/reperfusion in rats // *J. Neurol. Sci.* 2015. Vol. 351, N 1–2. P. 88–92. S0022-510X(15)00125-2 [pii]