

ОПТИМИЗАЦИЯ МЕТОДОВ ВЫДЕЛЕНИЯ МИТОХОНДРИЙ ИЗ РАЗНЫХ ТКАНЕЙ МЫШИ

А. П. Гуреев, А. В. Кокина, М. Ю. Сыромятников, В. Н. Попов

Воронежский государственный университет

Поступила в редакцию 22.06.15 г.

Аннотация. Исследованы два принципиально различных метода выделения митохондрий из различных органов мыши. Показано, что митохондрии из печени и почек, выделенные без использования градиентного центрифугирования, обладают устойчивым мембранным потенциалом и большим дыхательным контролем по сравнению с митохондриями мозга. Митохондрии мозга, выделенные центрифугированием в градиенте Перколл, более функциональны, предположительно, из-за меньшей контаминации митохондриальной фракции миелином и синаптосомами.

Ключевые слова: митохондрии, центрифугирование, Перколл, мембранный потенциал, дыхательный контроль.

Abstract. We studied two fundamentally different methods for the mitochondria isolation from a variety of mice organs. We showed that livers' and kidneys' mitochondria isolated without gradient centrifugation have a stable membrane potential and highest respiratory control as compared with brains' mitochondria. The brains' mitochondria isolated with centrifugation in Percoll gradient are more functional, perhaps, due to less myelin and synaptosome contamination of mitochondrial fraction.

Keywords: mitochondria, centrifugation, Percoll, membrane potential, respiratory control

Митохондрии играют важнейшую роль в патогенезе большого числа заболеваний в различных тканях и органах. В частности, митохондриальные дисфункции в клетках головного мозга являются причиной широкого спектра нейродегенеративных заболеваний, таких как болезни Хандингтона, Альцгеймера и Паркинсона, амниотический латеральный склероз и т.д. [1]. В печени митохондриальные повреждения вызывают жировой гепатоз и метаболический неалкогольный стеатогепатит [2]. Некоторые почечные заболевания, такие как хронические болезни почек и почечная гликозурия так же связаны с нарушением функционирования митохондрий [3].

Изолированные препараты митохондрий с хорошо сопряженной электронно-транспортной цепью являются удобным объектом, позволяющим моделировать различные метаболические состояния *in vitro*. Они позволяют исследовать влияние того или иного химического соединения на раз-

личные компоненты ЭТЦ, выяснить его про/анти-оксидантную, ингибирующую или разобщающую роль [4]. При этом существенную сложность представляет собой процесс выделения чистой митохондриальной фракции. Основным показателем функциональности интактных митохондрий является их способность к окислительному фосфорилированию [5].

Наиболее распространенным методом количественного анализа функциональной активности митохондрий является оценка митохондриального дыхательного контроля. Дыхательный контроль представляет собой отношение скорости потребления кислорода энергизованными митохондриями (при наличии субстратов и АДФ – состояние 3 по Чансу) к скорости потребления кислорода при наличии субстратов без добавления АДФ (состояние 4 по Чансу). Высокое значение дыхательного контроля предполагает, что митохондрии имеют высокую эффективность окисления субстратов и работы АТФазы, а так же низкий уровень утечки H^+ через внутреннюю мембрану митохондрий [6].

Мембранный потенциал ($\Delta\Psi_m$) напрямую зависит от окислительного фосфорилирования и характеризует функциональную активность митохондрий. Способность митохондрий генерировать $\Delta\Psi_m$ зависит от целостности внутренней мембраны митохондрий, которая нередко повреждается в процессе получения чистой митохондриальной фракции [7].

Наиболее популярным объектом исследования являются митохондрии печени и почек, поскольку методы их выделения являются наиболее простыми. Это объясняется размерами органов и особенностями ткани, которые позволяют получить большое количество изолированных митохондрий. Классические методы выделения проходят в два этапа: дифференциальное центрифугирование на низких оборотах (для осаждения неразрушенных клеток и их крупных фрагментов) и на высоких оборотах (для получения осадка, содержащего митохондрии) [8]. Наибольшую сложность представляет выделение чистой митохондриальной фракции из мозга. Головной мозг представляет собой наиболее гетерогенную ткань, как по функциональной, так и по метаболической активности. Поэтому, как правило, для выделения митохондрий из мозга добавляют дополнительный этап градиентного центрифугирования [9]. Целью данной работы являлось сравнение двух принципиально различных способов выделения митохондрий для различных тканей, а так же оптимизация методов оценки их функциональности *in vitro*.

МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТА

Условия эксперимента и состав сред. В эксперименте использовались самцы мышей линии C57BL/6. Все работы выполнялись при $t +4^\circ\text{C}$, декапитация, последующая диссекция животных проводилась на льду. Дезинтеграция тканей печени и почек осуществлялась по методике, описанной Nedergaard [10], использовалось 300 мг печени и обе почки. Дессекция черепа и извлечение обоих полушарий переднего мозга осуществлялись согласно Chinoroulos [7].

Среда для выделения митохондрий содержала следующие компоненты: 220 мМ маннитол; 100 мМ сахарозу; 1 мМ ЭГТА; 20 мМ HEPES; свободного от жирных кислот БСА в концентрации 2 мг/мл; все компоненты были растворены в Milli-Q воде; pH 7.4.

Среда для промывки митохондрий содержала следующие компоненты: 220 мМ маннитол; 100

мМ сахарозу; 1 мМ ЭГТА; 20 мМ HEPES; все компоненты были растворены в Milli-Q воде; pH 7.4.

100% Перколл содержал следующие компоненты: 220 мМ маннитол; 100 мМ сахарозу; 1 мМ ЭГТА; 20 мМ HEPES; все компоненты были растворены в 100% Перколле; pH 7.4. 23% раствор Перколла был приготовлен из 100% Перколла путем его растворения в среде для промывки митохондрий.

Выделение митохондрий без градиентного центрифугирования. Метод 1. Ткани промывались в среде выделения и гомогенизировались в стеклянном Dounce-гомогенизаторе в 15 мл среды выделения при температуре $+4^\circ\text{C}$. Полученный гомогенат переносили в охлажденную центрифужную пробирку и доводили до нужного объема средой выделения. Гомогенат центрифугировали 5 мин при 600 g. Супернатант переносили в чистую пробирку, доводили до нужного объема средой промывки. Проводили центрифугирование в течение 10 мин при 10000 g. Полученный осадок тщательно ресуспендировали в 1 мл охлажденного до $+4^\circ\text{C}$ раствора среды промывки и проводили повторное центрифугирование в течение 10 мин при 10000 g. Осадок, содержащий митохондрии, ресуспендировали в 50 мкл среды промывки.

Выделение митохондрий методом градиентного центрифугирования. Метод 2. Ткани промывали в среде выделения и гомогенизировали в стеклянном Dounce-гомогенизаторе в 6 мл среды выделения при температуре $+4^\circ\text{C}$. Гомогенат переносили в пробирку объемом 1.7 мл и доводили до нужного объема средой выделения. Гомогенат центрифугировали в течение 5 мин при 600 g. Полученный супернатант переносили в чистые пробирки и доводили до нужного объема средой промывки. Осаждение фракций свободных митохондрий и синаптосом осуществляли при помощи центрифугирования в течение 10 мин при 14000 g. Полученный супернатант удаляли, а осадок ресуспендировали в 200 мкл среды промывки. После этого осадок перекомбинировали в одну чистую пробирку и аккуратно наносили по 200 мкл сверху на 23% раствор Перколла. Центрифугирование в градиенте Перколла проводили в течение 15 мин при 23000 g при ускорении центрифуги равном 6. После центрифугирования наблюдалось разделение на 3 фазы. Аккуратно удаляли верхний и плотный средний слой. Нижний слой ресуспендировали и добавляли среду промывки до объема 1.7 мл. Следующую промывку осуществляли путем центрифугирования в течение 10 мин при 18000

g (ускорение 9). Супернатант удаляли, осадок ресуспендировали и перекомбинировали в одну пробирку и центрифугировали при 14000 g 5 мин. Супернатант удаляли, а осадок ресуспендировали в 20 мкл среды промывки.

Измерение скорости дыхания митохондрий.

Скорость потребления кислорода изолированными митохондриями оценивали при помощи оксиграфа («Hansatech Instruments», Великобритания). Измерение скорости дыхания митохондрий проводилось в 1 мл среды для выделения с добавлением 4мМ фосфата калия и субстратов I комплекса: 10 мМ малата и 10 мМ глутамата (4 состояние по Чансу), и последующим добавлением 200 мкМ АДФ (3 состояние по Чансу). Значение дыхательного коэффициента рассчитывали, как отношение скорости потребления кислорода в 3 состоянии к 4 состоянию по Чансу.

Измерение мембранного потенциала. Измерение мембранного потенциала митохондрий проводили на спектрофлуориметре (Hitachi F-7000, Япония) в 1 мл среды выделения с добавлением 10 мМ малата и 10 мМ глутамата. О величине мембранного потенциала судили по уменьшению относительной флюоресценции сафранина O (5 мкМ) при добавлении митохондрий, и последующему увеличению флюоресценции при разобщении внутренней мембраны митохондрий 50 мкМ 2,4-ДНФ. Измерения проводились при длине волны экстинкции 495 нм и длине волны эмиссии 585 нм.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Выделение митохондрий из мозга с использованием разных методов выявило существенные различия в качестве препаратов изолированных митохондрий. Мы обнаружили, что митохондрии мозга, выделенные методом дифференциального центрифугирования в градиенте Перколла (метод 2) хорошо сопряжены, что подтверждается резким снижением флюоресценции сафранина O на рис. 2 по сравнению с митохондриями мозга, выделенным по 1 методу. Статистически значимых различий в скорости дыхания митохондрий мозга, выделенных разными методами, не наблюдалось. Но после стимулирования дыхания с помощью АДФ у митохондрий мозга, выделенных по 2 методу, наблю-

дилось значительное увеличение скорости дыхания (с 4 ± 1.2 нМ/мин/мг до 57.2 ± 3.4 нМ/мин/мг). Таким образом, значение дыхательного контроля митохондрий мозга, выделенных по 2 методу, почти в 4 раза превосходит значение дыхательного контроля митохондрий мозга. При этом митохондрии из печени и почек, выделенные по 1 методу, демонстрировали устойчивый мембранный потенциал и значительно больший дыхательный контроль по сравнению с митохондриями печени и почек, выделенными с дополнительным центрифугированием в градиенте Перколла.

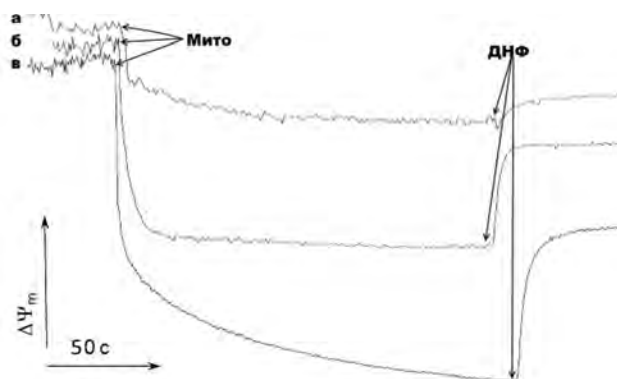


Рис. 1. Относительная флюоресценция сафранина O при добавлении митохондрий, выделенных по методу 1: а) мозга; б) почек; в) печени

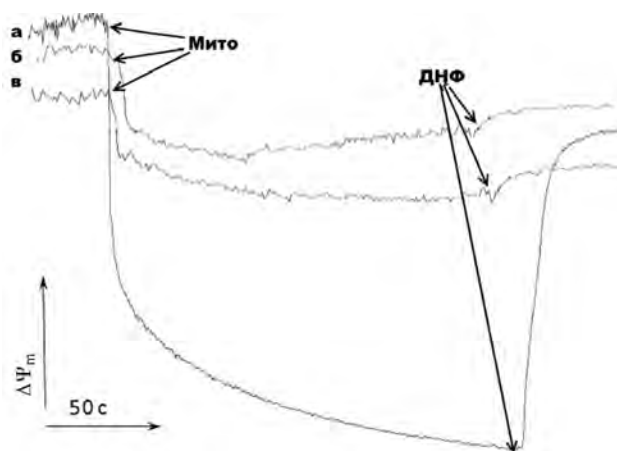


Рис. 2. Относительная флюоресценция сафранина O при добавлении митохондрий, выделенных по методу 2: а) мозга; б) почек; в) печени

Причиной слабого дыхательного контроля митохондрий мозга, выделенных по 1 методу, веро-

Таблица 1.

Скорость дыхания митохондрий из тканей головного мозга, печени и почек различными методами. В качестве субстратов использовались малат+глутамат. Значения скорости дыхания представлены в нМ/мин/мг белка.

Метод \ Орган	Метод 1			Метод 2		
	Сост. 4	Сост. 3	ДК	Сост. 4	Сост. 3	ДК
Мозг	2.2 ± 0.8	8.1 ± 1.8	3.7	4 ± 1.2	57.2 ± 3.4	14.3
Печень	7.2 ± 1.2	52 ± 7.4	7.2	4.2 ± 2.1	8.8 ± 2.1	2.1
Почки	5 ± 1.4	20.5 ± 2.3	4.1	1.3 ± 0.4	1.8 ± 0.9	1.8

ятно, являлась контаминация с другими межклеточными компонентами нервной ткани. Известно, что при центрифугировании 10000 g в течение 10 минут вместе с митохондриями оседают миелин – оболочка аксонов и синапсосомы – изолированные синаптические окончания нейронов [9, 11]. При этом синапсосомы тоже содержат в себе митохондрии. Описаны методики, в которых центрифугирование с использованием двухступенчатого градиента сахарозы [12], Фиколла [13, 14] и Перколла [7] позволяет получить разделенные фракции синапсосомальных и свободных, т.е. не синапсосомальных митохондрий. В нашем эксперименте (метод 2) были выделены свободные несинапсосомальные митохондрии, так как после стадии градиентного центрифугирования в 23% Перколле были удалены верхняя фаза, содержащая главным образом раствор миелина, и средняя фаза, содержащая синапсосомы с синапсосомальными митохондриями. Мы использовали нижнюю фракцию, которая содержала только свободные митохондрии, которые, как правило, происходят из тела нейронов и глиальных клеток. Мы оптимизировали методику выделения свободных митохондрий, так как литературные данные указывают, что синапсосомальные митохондрии обладают меньшей метаболической активностью компонентов дыхательной цепи по сравнению со свободными митохондриями [13], кроме того более чувствительны поступлению экзогенного кальция, который приводит к потере мембранного потенциала [15].

Митохондриальные фракции из печени и почек, выделенные по 1 методу, возможно, содержат в себе дополнительные примеси лизосом [16], однако они не оказывают существенного влияния на дыхательный контроль, так как оценка функциональной активности митохондрий проводилась непосредственно после их выделения.

Работа выполнена при поддержке Минобрнауки России в рамках гос. задания ВУЗами в сфере научной деятельности на 2014-2016 годы (Проект №1035) и гранта 5346ГУ1/2014

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Alternative mitochondrial electron transfer as a novel strategy for neuroprotection / Y. Wen [et. al] // *Journal of Biological Chemistry*. — 2011. — Vol. 286, № 18. — P. 16504-16515.
2. Defective hepatic mitochondrial respiratory chain in patients with nonalcoholic steatohepatitis / M. Perez-Carreras [et. al] // *Hepatology*. — 2003. — Vol. 38, № 4. — P. 999-1007.
3. Munnich A. Clinical spectrum and diagnosis of mitochondrial disorders / A. Munnich, P. Rustin // *American journal of medical genetics*. — 2001. — Vol. 106, № 1. — P. 4-17.
4. Wallace K.B. Mitochondrial targets of drug toxicity / K.B. Wallace, A.A. Starkov // *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. — 2000. — Vol. 40, № 1. — P. 353-388.
5. Hartwig S. Isolation and Quality Control of Functional Mitochondria / S. Hartwig, J. Kotzka, S. Lehr // *Mitochondrial Medicine: Probing Mitochondrial Function*. — 2015. — Vol. 1264. — P. 9-23.
6. Brand M. Assessing mitochondrial dysfunction in cells / M. Brand, D. Nicholls // *Biochem. J*. — 2011. — Vol. 435. — P. 297-312.
7. Isolation and functional assessment of mitochondria from small amounts of mouse brain tissue / C. Chinopoulos [et. al] // *Neurodegeneration*. — 2011. — Vol. 793. — P. 311-324.
8. Pallotti F. Isolation and subfractionation of mitochondria from animal cells and tissue culture lines / F. Pallotti, G. Lenaz // *Meth. Cell Biol*. — 2001. — Vol. 65. — P. 1-35.
9. Rapid isolation of metabolically active mitochondria from rat brain and subregions using Percoll density gradient centrifugation / N.R. Sims // *Journal of neurochemistry*. — 1990. — Vol. 55, № 2. — P. 698-707.
10. Nedergaard J. Overview—Preparation and properties of mitochondria from different sources / J. Nedergaard, B. Cannon // *Methods in enzymology*. — 1979. — Vol. 55. — P. 3-28.
11. Sims N.R. Isolation of mitochondria from rat brain using Percoll density gradient centrifugation / N. R. Sims, M. F. Anderson // *Nature Protocols*. — 2008. — Vol. 3, № 7. — P. 1228-1239.
12. Neidle A. The heterogeneity of rat brain mitochondria isolated on continuous sucrose gradients / A. Neidle, C. J. Berg, A. Grynbaum // *Journal of neurochemistry*. — 1969. — Vol. 16, № 2. — P. 225-234.
13. Structural and functional aspects of the respiratory chain of synaptic and nonsynaptic mitochondria derived from selected brain regions / M. Battino [et al] // *Journal of bioenergetics and biomembranes*. — 1991. — Vol. 23, № 2. — P. 345-363.
14. Coenzyme Q content in synaptic and nonsynaptic mitochondria from different brain regions in the ageing rat / M. Battino [et al] // *Mechanisms of ageing and development*. — 1995. — Vol. 78, № 3. — P. 173-187.

15. Brown M. R. Synaptic mitochondria are more susceptible to Ca^{2+} overload than nonsynaptic mitochondria / M. R. Brown, P. G. Sullivan, J. W. Geddes // *Journal of Biological Chemistry*. – 2006. – Vol. 281, № 17. – P. 11658-11668.

16. Phospholipid composition of highly purified mitochondrial outer membranes of rat liver and *Neurospora crassa*. Is cardiolipin present in the mitochondrial outer membrane? / A. I. de Kroon [et al] // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*. – 1997. – Vol. 1325, № 1. – P. 108-116.

Воронежский государственный университет
Гуреев А. П., магистр кафедры генетики, цитологии и биоинженерии
E-mail: gureev@bio.vsu.ru
Тел: 89204124320

Voronezh State University
Gureev A. P., master of the department of genetics, cytology and bioengineering
E-mail: gureev@bio.vsu.ru
Ph.: 89204124320

Кокина А. В., магистр кафедры генетики, цитологии и биоинженерии

Kokina A. V., master of the department of genetics, cytology and bioengineering

Сыромятников М. Ю., канд. биол. наук, преподаватель кафедры генетики, цитологии и биоинженерии

Syromyatnikov M. Yu. – PhD (biological science), lecturer of the department of genetics, cytology and bioengineering

Попов В. Н., доктор биол. наук, заведующий кафедрой генетики, цитологии и биоинженерии

Popov V. N., Doctor of biology, head of the department of genetics, cytology and bioengineering