

ТКАНЕВАЯ ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНЦИЯ КАК МЕТОД ОЦЕНКИ СУПЕРОКСИД РАДИКАЛ-ПРОДУЦИРУЮЩЕЙ СПОСОБНОСТИ МИТОХОНДРИЙ

А. А. Джатдоева , А. М. Полимова, Е. В. Проскурнина, Ю. А. Владимиров

Кафедра медицинской биофизики, факультет фундаментальной медицины, Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова, Москва

Дисфункция митохондрий лежит в основе развития многих заболеваний человека, включая дегенеративные. Одно из следствий митохондриальной дисфункции — апоптоз функционально-активных клеток. На начальной стадии апоптоза отмечается усиление продукции супероксид анион-радикала (САР). Перспективным методом обнаружения САР в клетках и тканях является метод хемилюминесценции (ХЛ), прежде всего — в присутствии люцигенина, специфичного для САР химического активатора ХЛ. В исследовании был предложен способ усовершенствования метода, а также оценена его эффективность при определении уровня образования САР в переживающих тканях лабораторных животных при моделировании гипоксии и паркинсонизма. Предложенные для аэрации опытных образцов кислород-содержащая (O₂ — 15 %, CO₂ — 5 %, N₂ — 80 %) и бескислородная (CO₂ — 5 %, N₂ — 95 %) газовые смеси обеспечивали постоянство pH 7,4, необходимое для корректной регистрации ХЛ. С помощью изучаемого метода было показано достоверное увеличение уровня образования САР в ткани сердца крыс при циклах гипоксии длительностью 150 и 240 мин — в 1,8 и 2,0 раза. При паркинсонизме уровень образования САР в ткани мозга мышей, содержащей стриатум и черную субстанцию, через 12 ч после введения последней дозы пронеуротоксина оказался выше в 1,7 и 1,3 раза соответственно в сравнении с контролем.

Ключевые слова: митохондриальные заболевания, апоптоз, супероксид анион-радикал, супероксид радикал-продуцирующая способность, гипоксия, паркинсонизм, тканевая хемилюминесценция, люцигенин

Финансирование: работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант № 14-15-00375).

Благодарности: авторы благодарят Алексея Гришина, студента кафедры физиологии МГУ имени М. В. Ломоносова, за помощь в подборе состава газовых смесей.

 **Для корреспонденции:** Айшат Абдрахмановна Джатдоева
119192, г. Москва, Ломоносовский пр-т, д. 31, корп. 5; ayshatdj@gmail.com

Статья поступила: 01.10.2015 Статья принята к печати: 09.12.2015

TISSUE CHEMILUMINESCENCE AS A METHOD OF EVALUATION OF SUPEROXIDE RADICAL PRODUCING ABILITY OF MITOCHONDRIA

Dzhatdоеva AA , Polimova AM, Proskurnina EV, Vladimirov YuA


Faculty of Fundamental Medicine, Department of Medical Biophysics, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

Mitochondrial dysfunctions are an underlying cause of many human diseases including degenerative diseases. One of the consequences of mitochondrial dysfunctions is apoptosis of functionally active cells. During the initial stage of apoptosis, increased production of superoxide anion-radical (SAR) is observed. A promising method of SAR detection in cells and tissues is chemiluminescence (CL), primarily, in the presence of lucigenin, a SAR specific amplifier of CL. In this study a means of improving CL was proposed, and its effectiveness in detecting SAR level in living tissues of laboratory animals in hypoxia and parkinsonism models was evaluated. Aerobic (O₂ — 15 %, CO₂ — 5 %, N₂ — 80 %) and anaerobic (CO₂ — 5 %, N₂ — 95 %) gas mixtures proposed for samples aeration, maintained a constant pH of 7.4, necessary for accurate recording of CL. Using the studied method, a statistically significant increase (1.8 and 2.0 times) in SAR production level in rat heart tissue was detected with hypoxia duration of 150 to 240 minutes. In the parkinsonian model SAR production in mouse brain tissue samples of striatum and substantia nigra was 1.7 and 1.3 times higher after administration of the final dose of proneurotoxin, as compared to the control group.

Keywords: mitochondrial disorders, apoptosis, superoxide anion-radical, superoxide radical producing ability, hypoxia, parkinsonism, tissue chemiluminescence, lucigenin

Funding: this work was supported by the Russian Science Foundation (project no. 14-15-00375).

Acknowledgments: authors thank Aleksey Grishin, a student at the Department of Physiology, Lomonosov Moscow State University, for his help in choosing gas mixture components.

 **Correspondence should be addressed:** Aishat Dzhatdоеva
Lomonosovskiy prospekt, d. 31, korp. 5, Moscow, Russia, 119192; ayshatdj@gmail.com

Received: 01.10.2015 Accepted: 09.12.2015

Митохондрии, апоптоз и болезни человека

Митохондрии являются важной органеллой клетки: они выполняют множество функций, но прежде всего вырабатывают энергию путем окислительного фосфорилирования и регулируют процессы роста, старения и апоптоза клетки. Число описанных в научной литературе болезней митохондриального происхождения приближается к 400, и митохондриальная медицина получила развитие как самостоятельное научное направление.

Нарушение энергообеспечения клетки может быть причиной нейромышечных патологий [1]. Особо чувствительной к снижению энергетического обмена является нервная ткань [2]. Однако энергетическая дисфункция — возможно, не самое опасное нарушение работы митохондрий. Митохондрии являются главным источником образования внутриклеточных свободных радикалов [3], прежде всего — супероксид анион-радикала (САР). Накопление САР и его производных — активных форм кислорода — приводит к митохондриальному окислительному стрессу. Это чрезвычайно опасно для клетки, так как может запустить процесс ее запрограммированной гибели — апоптоз [4]. Существует два основных пути запуска апоптоза: внешний (рецепторный) и внутренний (митохондриальный) [5], — и большинство форм апоптоза у позвоночных реализуется по второму пути [6].

Показано, что окислительный стресс в митохондриях является этиологическим фактором или звеном патогенеза многих заболеваний: нейродегенеративных (болезнь Паркинсона [7], болезнь Альцгеймера [8], рассеянный склероз [9], боковой амиотрофический склероз и др.), нейроофтальмопатий, гломерулонефритов [10], инсулинорезистентности, — а также старения. Повышенный риск ряда заболеваний (рак, диабет [11], сердечнососудистые болезни) связывают с полиморфизмом антиоксидантных ферментов, марганец-зависимой супероксиддисмутазы (Mn-SOD) и глутатион-пероксидазы, которые купируют последствия митохондриального окислительного стресса. Также выявлена важная роль дисфункции митохондрий в развитии раковых заболеваний [5].

Нарушение работы митохондрий и накопление свободных радикалов в клетке происходят под влиянием неблагоприятных факторов. Один из таких факторов — генные мутации. В отличие от других органелл митохондрии имеют собственную дезоксирибонуклеиновую кислоту (мтДНК), которая кодирует некоторые субъединицы комплексов окислительного фосфорилирования. Именно мутации в мтДНК, а также генах ядерной ДНК, кодирующих митохондриальные белки, вызывают развитие наследственной атрофии зрительных нервов Лебера [12], синдрома NARP (нейропатия, атаксия, пигментный ретинит) [13], синдрома MERRF (миоклонус эпилепсия с «рваными» красными волокнами в скелетных мышцах), синдрома MELAS (митохондриальная энцефаломиопатия, лактат-ацидоз, инсультподобные эпизоды) [14], синдрома Кернса–Сейра (пигментный ретинит, наружная офтальмоплегия, блокада сердца, птоз, мозжечковый синдром) [15], синдрома Пирсона (поражение костного мозга, панкреатическая и печеночная дисфункции) [16] и др.

Митохондрии как источники свободных радикалов при апоптозе

Во время аэробного дыхания происходит утечка 1–2 % электронов с электронной транспортной цепи митохондрий,

которые восстанавливают кислород с образованием супероксид анион-радикала [17]. Основными центрами продукции активных форм кислорода являются комплекс I и комплекс III дыхательной цепи. В норме антиоксидантная система организма нейтрализует образующиеся свободные радикалы. Однако под влиянием неблагоприятных факторов уровень содержания свободных радикалов возрастает во много раз.

Сперва в митохондриях происходит блокирование переноса электронов [18], что приводит к угнетению дыхания, снижению синтеза аденозинтрифосфата (АТФ) и, самое главное, к увеличению образования митохондриями супероксид анион-радикала [19]. Затем под действием митохондриальной супероксиддисмутазы образуется пероксид водорода в матриксе. В дальнейшем происходит образование комплекса специфического митохондриального фосфолипида — кардиолипина с цитохромом с [20]. Как было показано в модельных экспериментах, этот комплекс обладает пероксидазной активностью [4] и в присутствии пероксида водорода окисляет органические субстраты, включая полиненасыщенные жирные кислоты, в результате чего образуются свободные радикалы липидов [21] и запускается цепная реакция липопероксидации [22]. Липопероксидация в мембранах митохондрий приводит к набуханию матрикса [23], разрыву наружной мембраны или по меньшей мере образованию в ней больших пор, через которые из митохондрий выходит цитохром с. Появление цитохрома с в цитоплазме приводит к запуску реакций апоптоза [24].

Методы оценки радикал-продуцирующей способности митохондрий в живой ткани

Для оценки радикал-продуцирующей способности митохондрий в живой ткани применяют различные методы, в том числе метод хемилюминесценции (ХЛ) [25]. ХЛ позволяет регистрировать не концентрацию радикалов (которая в живых системах крайне низкая), а скорость реакции, в которой они участвуют. Недавно был разработан метод регистрации тканевой ХЛ с использованием фотоумножителя [26], имеющий ряд преимуществ перед весьма трудоемким и дорогостоящим методом японских исследователей с использованием охлаждаемой фотоматрицы [27]. Предложенный метод оценки радикал-продуцирующей способности ткани [26] заключается в том, что в условиях термостатирования (37 °С) в систему, содержащую исследуемые образцы ткани и активатор люцигенин, подают через капилляр слабый поток воздуха от перистальтического насоса (рис. 1, А). Подобранный уровень расположения капилляра и скорость аэрации позволяют регистрировать образование супероксид анион-радикалов в переживающей ткани. Однако в исследовании [26] было показано нарастание ХЛ во времени, которое затрудняет анализ полученных кривых. Возможно, дополнительное усиление ХЛ связано с увеличением pH раствора среды во времени, а не с дополнительным образованием радикалов в ткани. Как известно, интенсивность свечения люцигенина зависит от водородного показателя среды [28]. Повышение pH среды способствует образованию катиона люцигенина, который и взаимодействует с САР с последующим испусканием кванта света.

Наше исследование включало два эксперимента. Целью первого эксперимента явилось определение оптимального состава газовой смеси для поддержания

постоянного уровня рН при аэрации опытных образцов с использованием изучаемого метода, второго — оценка уровня образования супероксид анион-радикалов при гипоксии и паркинсонизме в образцах тканей сердца крыс и мозга мышей изучаемым методом.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Схема установки

В опытах использовали хемилюминометр SmartLum-100 («ДИСофт», Россия), дополнительно оснащенный перистальтическим насосом Pumps 323 (Watson Marlow, Великобритания). К насосу были подключены резервуары, содержащие различные газовые смеси. Схема установки приведена на рисунке 1, А.

Расстояние от дна кюветы до кончика капилляра (l), по которому поступал газ в рабочий раствор, составляло 1,5 см (рис. 1, Б). Это способствовало быстрой диффузии газа к исследуемому образцу без нарушения его положения в пространстве. Срезы располагали на дне кюветы таким образом, чтобы сторона образца с наибольшей площадью была обращена к детектору (рис. 1, Б).

Животные и манипуляции над ними

В исследовании использовали сердце самцов белых крыс линии Wistar в возрасте 2–3 мес. и мозг мышей линии С57BL/6 в возрасте 2,5–3 мес. При работе с животными соблюдали регламент, установленный Приказом Минздрава СССР от 12.08.1977 г. № 755. Эксперименты были одобрены Комиссией по биоэтике МГУ имени М. В. Ломоносова. Животных содержали в условиях вивария, по 6 особей в стандартных клетках Т4 с регулируемым освещением (12 часов — ночь, 12 часов — день), со свободным доступом к кормам и воде.

Крысы. Все манипуляции по извлечению органов производили на глубоко наркотизированных хлоралгидратом животных (400 мг/кг). После извлечения органы

промывали в физиологическом растворе (NaCl 0,9 %). С помощью острого лезвия отрезали небольшой прямоугольный кусочек левого желудочка, не более 5 × 5 × 5 мм, и промывали его.

Мыши. Для моделирования ранней симптомной стадии паркинсонизма мышам четырехкратно с двухчасовым интервалом между инъекциями вводили подкожно пронеуротоксин 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридин (МФТП; Sigma, США) в дозе 12 мг/кг [29]. Контрольным животным по такой же схеме вводили физиологический раствор (NaCl 0,9 %). Через 12 ч после введения последней дозы пронеуротоксина мышам декапитировали (без наркоза) и выделяли мозг. С помощью вибратора (Vibratome 1000 Plus, США) получали тонкие фронтальные срезы толщиной 300 мкм. В срезах выделяли блоки ткани, содержащие черную субстанцию (место локализации тел дофаминергических нейронов) и стриатум (область проекции аксонов дофаминергических нейронов).

Для сохранения жизнеспособности тканей все манипуляции с ними проводили в охлажденном растворе Кребса-Рингера состава: 6,96 г NaCl, 0,36 г KCl, 0,22 г CaCl₂, 0,33 г MgSO₄•H₂O, 2,1 г NaHCO₃, 1,82 г D-глюкозы, 4,8 г HEPES, 1,0 л дистиллированной воды (с последующим доведением рН раствора до 7,4). В экспериментах использовали только свежеприготовленный раствор.

Определение оптимального состава газовой смеси для аэрации

Определение оптимального состава газовой смеси для аэрации проводили на образцах ткани сердца крыс. Для этого образец ткани помещали в кювету, содержащую 90 мкМ люцигенина в растворе Кребса-Рингера. Люцигенин был использован в качестве селективного зонда на САР. Хемилюминесценцию образцов ткани регистрировали в течение 125 мин в условиях термостатирования (37 °С) и аэрации при скорости вращения ротора насоса 6 об/мин. Такая скорость подачи газовой смеси позволяла сохранять достаточный темп насыщения раствора газами, перемешивать раствор и омывать образец, сохраняя его неподвижным на дне кюветы. Каждые 20 мин измеряли рН раствора.

Были изучены три газовых смеси следующего состава:

- атмосферный воздух: 21 % O₂, 0,03 % CO₂, 78 % N₂,
- карбоген: 95 % O₂, 5 % CO₂,
- выдыхаемый человеком воздух: 15 % O₂, 4 % CO₂, 74 % N₂, другие — 7 %.

Регистрация хемилюминесценции ткани при имитации гипоксии и при паркинсонизме

Основываясь на результатах эксперимента по определению оптимального состава газовой смеси для аэрации, приготовили технические смеси нового состава, которые использовали для регистрации хемилюминесценции при моделировании гипоксии и паркинсонизма:

- кислородсодержащая газовая смесь (КГС): 15 % O₂, 5 % CO₂, 80 % N₂,
- бескислородная газовая смесь (БГС): 5 % CO₂, 95 % N₂.

Моделирование гипоксии. Исследование проводили на образцах ткани сердца крыс с использованием трех моделей гипоксии. Для каждой модели регистрировали ХЛ одного образца. Для создания гипоксических условий

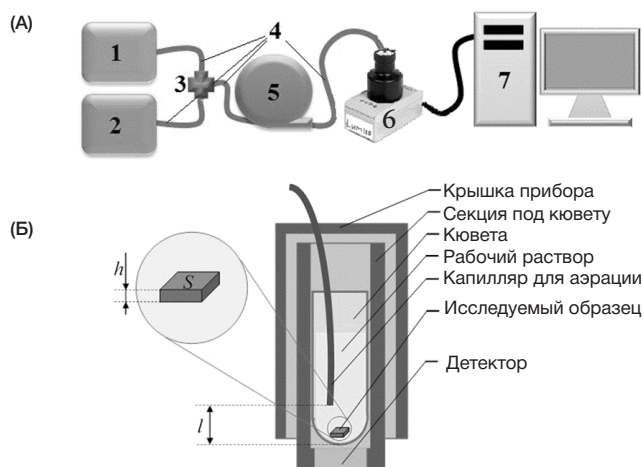


Рис. 1. (А) Схема экспериментальной установки. 1, 2 — резервуары для двух различных газовых смесей (кислородной и бескислородной); 3 — переключатель газовой смеси; 4 — трубки, по которым газовая смесь поступает в кювету хемилюминометра; 5 — перистальтический насос для подачи газовой смеси в систему; 6 — хемилюминометр SmartLum-100; 7 — персональный компьютер. (Б) Расположение исследуемого образца внутри хемилюминометра

через раствор, содержащий кусочек ткани, пропускали бескислородную газовую смесь, а для создания условий реоксигенации — кислородсодержащую газовую смесь. Было исследовано три модели гипоксии.

Модель 1 — гипоксия в течение 15 мин. Первые 30 мин регистрировали ХЛ при аэрации КГС, затем 15 мин — при аэрации БГС (гипоксия), после этого возобновляли аэрацию КГС в течение 30 мин (реоксигенация). Цикл гипоксии повторяли шесть раз. Общее время регистрации ХЛ составляло 400 мин.

Модель 2 — гипоксия в течение 150 мин. Первые 30 мин регистрировали ХЛ при аэрации КГС, затем 150 мин — при аэрации БГС (гипоксия), после этого возобновляли аэрацию КГС в течение 30 мин (реоксигенация). Циклы гипоксии повторяли дважды. Общее время регистрации ХЛ составляло 325 мин.

Модель 3 — гипоксия в течение 240 мин. Первые 30 мин регистрировали ХЛ при аэрации КГС, затем 240 мин — при аэрации БГС (гипоксия), после этого возобновляли аэрацию КГС в течение 30 мин (реоксигенация). Общее время регистрации ХЛ составляло 350 мин.

Изменение образования радикалов оценивали по параметру S/S_0 , где S — площадь под кривой ХЛ за 30 мин реоксигенации в конце эксперимента с моделью (отражает количество образовавшихся радикалов), а S_0 — площадь под кривой ХЛ за первые 30 мин регистрации свечения (отражает начальное количество радикалов). Единица измерения S — (имп/с) × мин.

Моделирование паркинсонизма. Исследование проводили на срезах мозга мышей. Регистрировали ХЛ трех срезов ткани области черной субстанции и трех срезов области стриатума мозга (как опытных, так и контрольных животных). Хемилюминесценцию регистрировали в течение 25 минут в условиях аэрации кислородсодержащей газовой смесью. Образование САР оценивали по параметру S/S_0 (за 20 мин аэрации), где S — площадь под кривой ХЛ ткани экспериментальных животных и S_0 — площадь под кривой ХЛ ткани контрольных животных.

Статистическую обработку данных проводили, используя программные пакеты Statistica 7.0 и MS Office Excel 2010. Результаты представлены в виде среднего значения и среднего квадратичного отклонения. Достоверность различия между группами определяли с помощью крите-

рия Манна–Уитни. Различия признавали статистически достоверными при уровне значимости $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Зависимость pH от состава газовой смеси для аэрации

Было проведено исследование влияния состава трех разных газовых смесей на pH раствора, содержащего образец ткани сердца. В условиях аэрации атмосферным воздухом происходило увеличение pH с 7,4 до 9,0 (рис. 2, А). Изменение водородного показателя влияло на интенсивность люцигенин-зависимой хемилюминесценции. Зарегистрированные изменения кинетики кривой ХЛ являлись прямым следствием защелачивания среды: динамика развития ХЛ и увеличение pH совпадали во времени (рис. 2).

Наоборот, аэрация смесями газов с повышенным содержанием CO_2 (карбоген и выдыхаемый воздух) не приводила к значимому изменению pH среды в ходе эксперимента. Свечение ХЛ оставалось на постоянном уровне (рис. 2, Б).

Таким образом, содержание в газовых смесях CO_2 на уровне 4–5 % является достаточным для удержания pH на уровне физиологической нормы (7,4). Поэтому для дальнейшей регистрации ХЛ образцов тканей была подготовлена техническая смесь газов, в которой процентное содержание основных компонентов было аналогично выдыхаемому воздуху, но отсутствовали примесные газы (КГС). Для создания условий гипоксии была использована бескислородная газовая смесь с высоким содержанием CO_2 (БГС).

Образование свободных радикалов в тканях сердца крыс при гипоксии

В условиях повторяющихся циклов гипоксии длительностью 15 мин значимый рост образования супероксид анион-радикала зафиксировано только в момент реоксигенации на 300-й минуте эксперимента: количество САР увеличилось в 1,5 раза по сравнению с исходным уровнем. В условиях более длительных циклов гипоксии (150 и 240

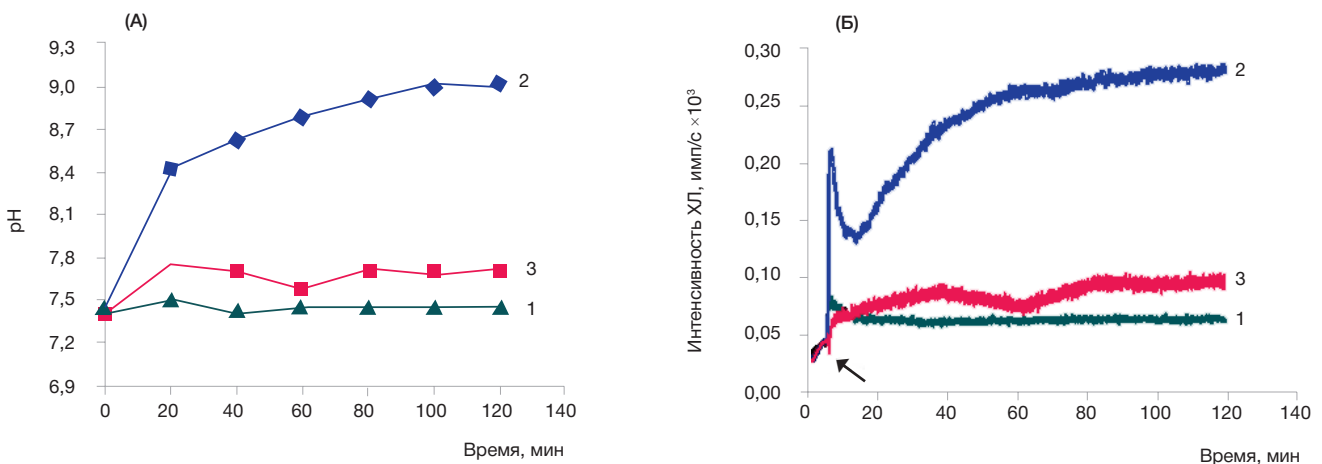


Рис. 2. (А) Изменение pH и (Б) развитие люцигенин-активированной хемилюминесценции в одном из образцов ткани сердца крыс при аэрации образцов газовыми смесями различного состава
 Обозначения: 1 — кривая для выдыхаемого воздуха (O_2 — 5 %, CO_2 — 4,3 %, N_2 — 74,0 %); 2 — кривая для атмосферного воздуха (O_2 — 21,0 %, CO_2 — 0,03 %, N_2 — 78,0 %); 3 — кривая для карбогена (O_2 — 95,0 %, CO_2 — 5,0 %). Стрелкой указан момент начала аэрации.

мин) также наблюдали достоверное увеличение ХЛ в конце эксперимента, при этом образование САР возросло в 1,8 и 2,0 раза соответственно (рис. 3, табл. 1).

Образование свободных радикалов в тканях мозга мышц при паркинсонизме

Смоделированная стадия паркинсонизма у мышей соответствует ранней симптомной стадии у людей, и на этой стадии у животных было зафиксировано увеличение образования супероксид анион-радикала. В случае со срезами ткани мозга, содержащей стриатум, произошло достоверное увеличение продукции САР в 1,7 раза. Для срезов

ткани мозга, содержащей черную субстанцию, значимых различий между опытными и контрольными животными не наблюдалось, но была выявлена тенденция к увеличению образования радикалов в 1,3 раза (рис. 4, табл. 2).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Люцигенин-активированная хемилюминесценция является перспективным инструментом для измерения уровня образования САР и оценки нарушений, происходящих в отдельных клетках и ткани в целом. Однако ее применение требует поддержания постоянства pH среды, равного 7,4. При аэрации образцов атмосферным воздухом происхо-

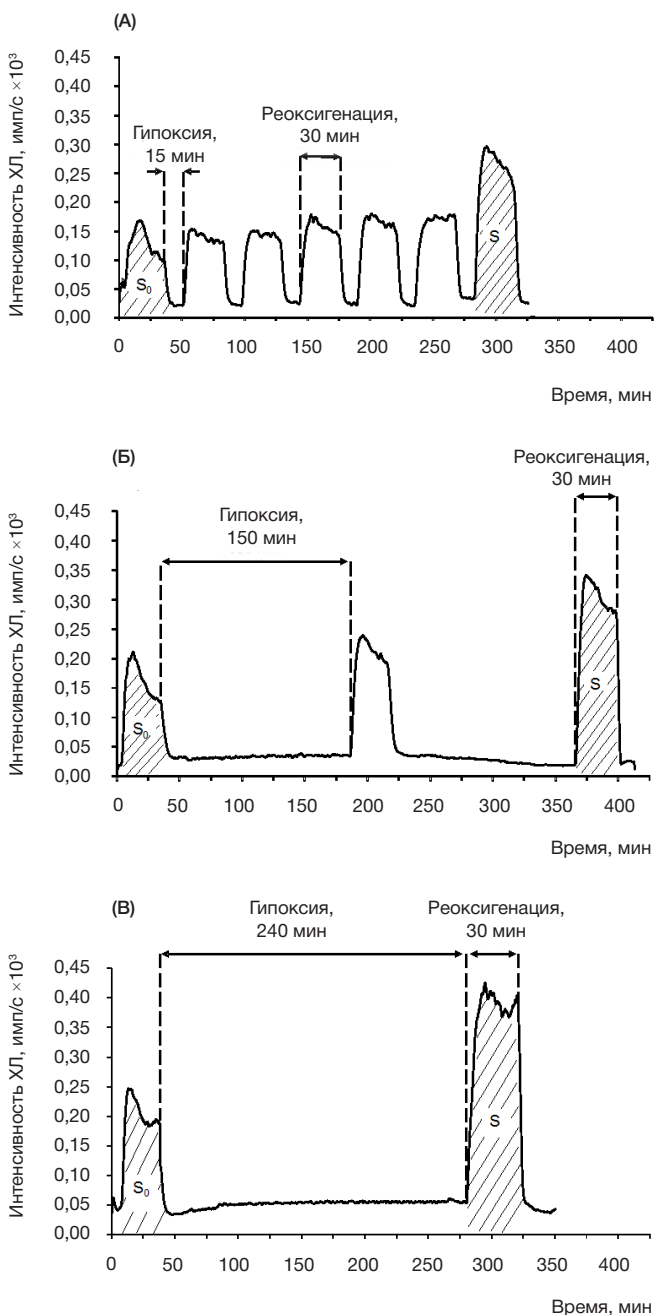


Рис. 3. Кривые люцигенин-активированной хемилюминесценции в одном из образцов ткани сердца крыс при различных моделях гипоксии. (А) Модель 1 (цикл гипоксии — 15 мин). (Б) Модель 2 (цикл гипоксии — 150 мин). (В) Модель 3 (цикл гипоксии — 240 мин)

Таблица 1. Влияние продолжительности гипоксии на образование супероксид анион-радикала в ткани сердца крыс, $M \pm m$ ($n = 5, p < 0,05$)

Показатель	Время гипоксии, мин		
	15	150	240
S/S ₀	1,49 ± 0,10	1,76 ± 0,20	2,04 ± 0,15

Таблица 2. Образование супероксид анион-радикала в ткани мозга мышей при моделировании паркинсонизма, $M \pm m$ ($n = 5, * — p < 0,05$)

Ткань	Показатель		
	S (паркинсонизм)	S ₀ (контроль)	S/S ₀
Стриатум	71,0 ± 5,0*	121,0 ± 15,0	1,7 ± 0,4
Черная субстанция	30,0 ± 10,0	40,0 ± 6,0	1,3 ± 0,5

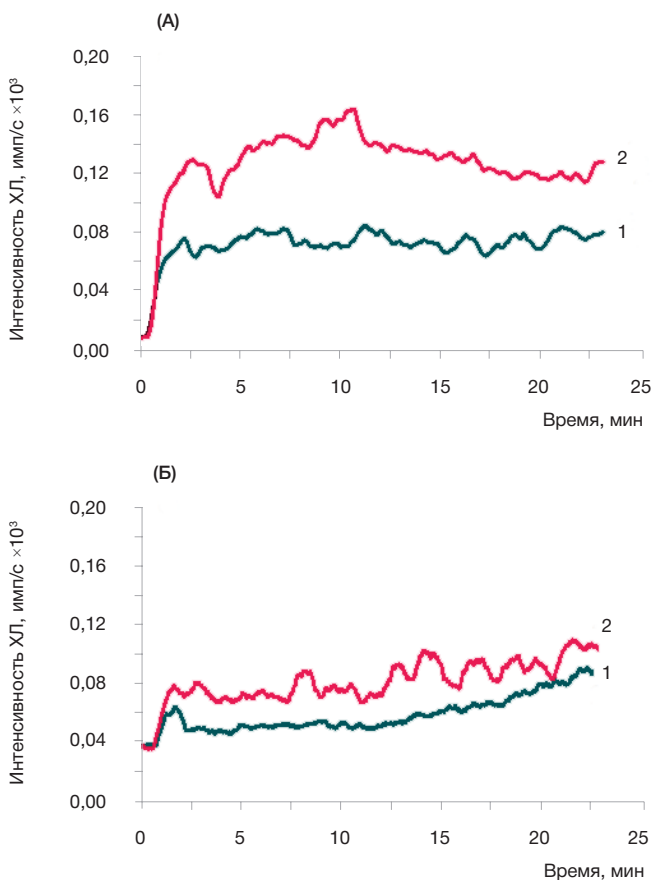
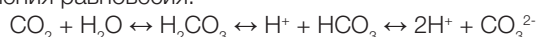


Рис. 4. Развитие люцигенин-активированной хемилюминесценции в срезах ткани мозга мышей, содержащей стриатум (А) и черную субстанцию (Б). Обозначения: 1 — кривая для контрольного образца, 2 — кривая для опытного образца.

дит изменение водородного показателя, и объема буферной системы Кребса–Рингера (2 мл на 1 мг ткани) оказывается недостаточно для стабилизации pH на уровне 7,4. С одной стороны, использование проточной системы может помочь решить выявленную проблему за счет постоянного обновления раствора, омывающего ткань. Но необходимое техническое дооснащение установки и увеличение расхода реактивов делают этот подход трудноосуществимым. С другой стороны, возможность изменения состава газовой смеси для аэрации раствора, а именно: увеличение содержания CO₂, — является более простым и доступным способом. Насыщение омывающего раствора углекислотой позволяет удерживать pH на постоянном уровне за счет растворения газа в воде и установления равновесия:



Нами было показано, что аэрация газовой смесью, содержащей 4–5 % углекислого газа, является оптимальной для использования метода.

Известно, что ключевую роль в инфарктных состояниях человека играет цикл гипоксии/реоксигенация. При этом наиболее сильные повреждения ткань получает при резком увеличении образования активных форм кислорода и гибнет после возобновления кровоснабжения. Оценка уровня образования супероксид анион-радикала при различной продолжительности гипоксии показала, что циклическое воздействие коротких периодов гипоксии приводило к меньшей продукции свободных радикалов по сравнению с более длительными периодами гипоксии.

Регистрация люцигенин-активированной ХЛ в условиях аэрации образца ткани кислородсодержащей газовой смесью показала увеличение уровня образования CAP в ткани мозга уже через 12 ч после введения последней дозы пронеуротоксина. Это свидетельствует о том, что увеличение продукции свободных радикалов, приводящее к дегенерации нервных клеток, происходит задолго до проявления первых клинических симптомов патологии.

ВЫВОДЫ

Оптимизированы условия использования метода люцигенин-активированной хемилюминесценции для оценки радикал-продуцирующей способности биологических тканей. Подобраны составы кислородсодержащей и бескислородной газовой смесей для аэрации опытного образца, позволяющие поддерживать pH омывающего образца раствора на уровне 7,4.

Продемонстрирована возможность использования метода для оценки уровня образования радикалов при гипоксии и паркинсонизме. Показано достоверное увеличение уровня образования радикалов в ткани сердца для циклов гипоксии длительностью 150 мин — в 1,8 раза, 240 мин — в 2,0 раза. При паркинсонизме уровень образования CAP в областях стриатума и черной субстанции через 12 ч после введения последней дозы пронеуротоксина оказался выше в 1,7 и 1,3 раза соответственно в сравнении с контролем.

Литература

- Holt IJ, Cooper JM, Morgan-Hughes JA, Harding AE: Deletions of muscle mitochondrial DNA. *Lancet*. 1988 Jun 25; 1 (8600):1462.
- DiDonato S: Multisystem manifestations of mitochondrial disorders. *Journal of neurology* 2009 May; 256 (5): 693–710.
- Kaminsky VO, Zhivotovsky B: Free radicals in cross talk between autophagy and apoptosis. *Antioxid Redox Signal*. 2014 Jul 1; 21 (1): 86–102.
- Kagan VE, Tyurin VA, Jiang J, Tyurina YY, Ritov VB, Amoscato AA, et al. Cytochrome c acts as a cardiolipin oxygenase required for release of proapoptotic factors. *Nature chemical biology*. 2005 Sep; 1 (4): 223–32.
- Sinha K, Das J, Pal PB, Sil PC. Oxidative stress: the mitochondria-dependent and mitochondria-independent pathways of apoptosis. *Archives of toxicology*. 2013; 87 (7): 1157–80.
- Льюин Б. Клетки. 9-е изд. М.: БИНОМ. Лаборатория знаний; 2011. 896 с.
- Anderson G, Maes M. Neurodegeneration in Parkinson's disease: interactions of oxidative stress, tryptophan catabolites and depression with mitochondria and sirtuins. *Mol Neurobiol*. 2014; 49 (2): 771–83.
- Caldeira GL, Ferreira IL, Rego AC. Impaired transcription in Alzheimer's disease: key role in mitochondrial dysfunction and oxidative stress. *J Alzheimers Dis*. 2013; 34 (1): 115–31.
- Ross R: The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature*. 1993 Apr 29; 362 (6423): 801–9.
- Madeo J, Zubair A, Marianne F. A review on the role of quinones in renal disorders. *Springerplus*. 2013; 2 (1): 139.
- Giacco F, Brownlee M. Oxidative stress and diabetic complications. *Circulation research*. 2010; 107 (9): 1058–70.
- Chang JC, Liu KH, Li YC, Kou SJ, Wei YH, Chuang GS, et al. Functional recovery of human cells harbouring the mitochondrial DNA mutation MERRF A8344G via peptide-mediated mitochondrial delivery. *Neurosignals*. 2013; 21 (3–4): 160–73.
- Sadun AA, Carelli V. The role of mitochondria in health, ageing, and diseases affecting vision. *Br J Ophthalmol*. 2006 Jul; 90 (7): 809–10.
- Betts J, Jaros E, Perry RH, Schaefer AM, Taylor RW, Abdel-All Z, et al. Molecular neuropathology of MELAS: level of heteroplasmy in individual neurones and evidence of extensive vascular involvement. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 2006; 32 (4): 359–73.
- Mahato B, Jash S, Adhya S. RNA-mediated restoration of mitochondrial function in cells harboring a Kearns Sayre Syndrome mutation. *Mitochondrion*. 2011; 11 (4): 564–74.
- Zenker M, Aigner T, Wendler O, Tralau T, Muntefering H, Fenski R, et al. Human laminin beta2 deficiency causes congenital nephrosis with mesangial sclerosis and distinct eye abnormalities. *Hum Mol Genet*. 2004; 13 (21): 2625–32.
- Ames BN, Shigenaga MK, Hagen TM. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993; 90 (17): 7915–22.
- Elias RJ, McClements DJ, Decker EA. Antioxidant activity of cysteine, tryptophan, and methionine residues in continuous phase beta-lactoglobulin in oil-in-water emulsions. *J Agric Food Chem*. 2005; 53 (26): 10248–53.
- Ruberg M, France-Lanord V, Brugg B, Lambeng N, Michel PP, Anglade P, et al. [Neuronal death caused by apoptosis in Parkinson disease]. *Revue neurologique*. 1997; 153 (8–9): 499–508. French.
- Kagan VE, Bayir HA, Belikova NA, Kapralov O, Tyurina YY, Tyurin VA, et al. Cytochrome c/cardiolipin relations in mitochondria: a kiss of death. *Free Radic Biol Med*. 2009; 46 (11): 1439–53.
- Belikova NA, Tyurina YY, Borisenko G, Tyurin V, Samhan Arias AK, Yanamala N, et al. Heterolytic reduction of fatty acid hydroperoxides by cytochrome c/cardiolipin complexes: antioxidant function in mitochondria. *J Am Chem Soc*. 2009; 131 (32): 11288–9.
- Vladimirov YA. Free radical lipid peroxidation in biomembranes: Mechanism, regulation, and biological consequences. In: Johnson JE, Jr., Walford R, Harman D, Miquel J, editors. *Free Radicals, Aging, and Degenerative Diseases*. New York: Allan R. Liss, Inc.; 1986. p.141–95.
- Vladimirov YA, Olenev VI, Suslova TB, Cheremisina ZP. Lipid peroxidation in mitochondrial membrane. *Adv Lipid Res*. 1980; (17): 173–249.

24. Skulachev VP. Mitochondria in the programmed death phenomena; a principle of biology: «it is better to die than to be wrong». IUBMB Life. 2000; 49 (5): 365–73.

25. Владимиров Ю. А., Проскурнина Е. В., Измайлов Д. Ю. Кинетическая хемилюминесценция как метод изучения реакций свободных радикалов. Биофизика. 2011; 56 (6): 1081–90.

26. Полимова А. М., Хакимова Г. Р., Владимиров Г. К., Жидкова Т. В., Измайлов Д. Ю., Проскурнина Е. В и др. Активированная хемилюминесценция как метод оценки радикалообразующей способности ткани мозга. Технологии живых систем. 2012; 9 (10): 3–12.

27. Sasaki T, Iwamoto A, Tsuboi H, Watanabe Y. Development of real-time biographic system for functional and metabolic imaging in living brain tissue. Brain research. 2006; 1077 (1): 161–9.

28. Oosthuizen MM, Engelbrecht ME, Lambrechts H, Greyling D, Levy RD. The effect of pH on chemiluminescence of different probes exposed to superoxide and singlet oxygen generators. J Biolumin Chemilumin. 1997; 12 (6): 277–84.

29. Ugrumov MV, Khaindrava VG, Kozina EA, Kucheryanu VG, Bocharov EV, Kryzhanovsky GN, et al. Modeling of presymptomatic and symptomatic stages of parkinsonism in mice. Neuroscience. 2011; 181: 175–88.

References

1. Holt IJ, Cooper JM, Morgan-Hughes JA, Harding AE: Deletions of muscle mitochondrial DNA. Lancet. 1988 Jun 25; 1 (8600):1462.

2. Di Donato S: Multisystem manifestations of mitochondrial disorders. Journal of neurology 2009 May; 256 (5): 693–710.

3. Kaminsky VO, Zhivotovsky B: Free radicals in cross talk between autophagy and apoptosis. Antioxid Redox Signal. 2014 Jul 1; 21 (1): 86–102.

4. Kagan VE, Tyurin VA, Jiang J, Tyurina YY, Ritov VB, Amoscato AA, et al. Cytochrome c acts as a cardiolipin oxygenase required for release of proapoptotic factors. Nature chemical biology. 2005 Sep; 1 (4): 223–32.

5. Sinha K, Das J, Pal PB, Sil PC. Oxidative stress: the mitochondria-dependent and mitochondria-independent pathways of apoptosis. Archives of toxicology. 2013; 87 (7): 1157–80.

6. Lyuin B. Kletki. 9th ed. M.: BINOM. Laboratoriya znaniy; 2011. 896 p. Russian.

7. Anderson G, Maes M. Neurodegeneration in Parkinson's disease: interactions of oxidative stress, tryptophan catabolites and depression with mitochondria and sirtuins. Mol Neurobiol. 2014; 49 (2): 771–83.

8. Caldeira GL, Ferreira IL, Rego AC. Impaired transcription in Alzheimer's disease: key role in mitochondrial dysfunction and oxidative stress. J Alzheimers Dis. 2013; 34 (1): 115–31.

9. Ross R: The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. Nature. 1993 Apr 29; 362 (6423): 801–9.

10. Madeo J, Zubair A, Marianne F. A review on the role of quinones in renal disorders. Springerplus. 2013; 2 (1): 139.

11. Giacco F, Brownlee M. Oxidative stress and diabetic complications. Circulation research. 2010; 107 (9): 1058–70.

12. Chang JC, Liu KH, Li YC, Kou SJ, Wei YH, Chuang CS, et al. Functional recovery of human cells harbouring the mitochondrial DNA mutation MERRF A8344G via peptide-mediated mitochondrial delivery. Neurosignals. 2013; 21 (3–4): 160–73.

13. Sadun AA, Carelli V. The role of mitochondria in health, ageing, and diseases affecting vision. Br J Ophthalmol. 2006 Jul; 90 (7): 809–10.

14. Betts J, Jaros E, Perry RH, Schaefer AM, Taylor RW, Abdel-Ail Z, et al. Molecular neuropathology of MELAS: level of heteroplasmy in individual neurones and evidence of extensive vascular involvement. Neuropathol Appl Neurobiol. 2006; 32 (4): 359–73.

15. Mahato B, Jash S, Adhya S. RNA-mediated restoration of mitochondrial function in cells harboring a Kearns Sayre Syndrome mutation. Mitochondrion. 2011; 11 (4): 564–74.

16. Zenker M, Aigner T, Wendler O, Tralau T, Muntefering H, Fenski R, et al. Human laminin beta2 deficiency causes congenital nephrosis with mesangial sclerosis and distinct eye abnormalities. Hum Mol Genet. 2004; 13 (21): 2625–32.

17. Ames BN, Shigenaga MK, Hagen TM. Oxidants, antioxidants, and

the degenerative diseases of aging. Proc Natl Acad Sci U S A. 1993; 90 (17): 7915–22.

18. Elias RJ, McClements DJ, Decker EA. Antioxidant activity of cysteine, tryptophan, and methionine residues in continuous phase beta-lactoglobulin in oil-in-water emulsions. J Agric Food Chem. 2005; 53 (26): 10248–53.

Ruberg M, France-Lanord V, Brugg B, Lambeng N, Michel PP,

19. Anglade P, et al. [Neuronal death caused by apoptosis in Parkinson disease]. Revue neurologique. 1997; 153 (8–9): 499–508. French.

Kagan VE, Bayir HA, Belikova NA, Kapralov O, Tyurina YY,

20. Tyurin VA, et al. Cytochrome c/cardiolipin relations in mitochondria: a kiss of death. Free Radic Biol Med. 2009; 46 (11): 1439–53.

Belikova NA, Tyurina YY, Borisenko G, Tyurin V, Samhan Arias AK,

21. Yanamala N, et al. Heterolytic reduction of fatty acid hydroperoxides by cytochrome c/cardiolipin complexes: antioxidant function in mitochondria. J Am Chem Soc. 2009; 131 (32): 11288–9.

Vladimirov YA. Free radical lipid peroxidation in biomembranes:

22. Mechanism, regulation, and biological consequences. In: Johnson JE, Jr., Walford R, Harman D, Miquel J, editors. Free Radicals, Aging, and Degenerative Diseases. New York: Allan R. Liss, Inc.; 1986. p.141–95.

23. Vladimirov YA, Olenev VI, Suslova TB, Cheremisina ZP. Lipid peroxidation in mitochondrial membrane. Adv Lipid Res. 1980; (17): 173–249.

24. Skulachev VP. Mitochondria in the programmed death phenomena; a principle of biology: «it is better to die than to be wrong». IUBMB Life. 2000; 49 (5): 365–73.

Vladimirov YA, Proskurnina EV, Izmaylov DYU. Kineticheskaya

25. khemilyuminesstsiya kak metod izucheniya reaktsiy svobodnykh radikalov. Biofizika. 2011; 6 (56): 1081–90. Russian.

Polimova AM, Khakimova GR, Vladimirov GK, Zhidkova TV,

26. Izmaylov DYU, Proskurnina EV, et al. Aktivirovannaya khemilyuminesstsiya kak metod otsenki radikalobrazuyushchey sposobnosti tkani mozga. Tekhnologii zhivyykh sistem. 2012; 10 (9): 3–12. Russian.

27. Sasaki T, Iwamoto A, Tsuboi H, Watanabe Y. Development of real-time biographic system for functional and metabolic imaging in living brain tissue. Brain research. 2006; 1077 (1): 161–9.

Oosthuizen MM, Engelbrecht ME, Lambrechts H, Greyling D,

28. Levy RD. The effect of pH on chemiluminescence of different probes exposed to superoxide and singlet oxygen generators. J Biolumin Chemilumin. 1997; 12 (6): 277–84.

Ugrumov MV, Khaindrava VG, Kozina EA, Kucheryanu VG,

29. Bocharov EV, Kryzhanovsky GN, et al. Modeling of presymptomatic and symptomatic stages of parkinsonism in mice. Neuroscience. 2011; 181: 175–88.