

КОЛИЧЕСТВЕННЫЕ ПОДХОДЫ К ПРИЖИЗНЕННОМУ АНАЛИЗУ МОРФОЛОГИИ МИТОХОНДРИЙ

© В. А. Попков,^{1,2} Е. Ю. Плотников,¹ Л. Д. Зорова,^{1,3} И. Б. Певзнер,¹
Д. Н. Силачев,¹ В. А. Бабенко,^{1,2} С. С. Янкаускас,¹ С. Д. Зоров,^{1,2} Д. Б. Зоров^{1,*}

¹Институт физико-химической биологии им. А. Н. Белозерского
Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова, Москва, 119991,

²Факультет биоинженерии и биоинформатики Московского государственного
университета им. М. В. Ломоносова, Москва, 119991

и ³Международный Лазерный научный центр
Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова, Москва, 119991;

* электронный адрес: zorov@genebee.msu.ru

Структурная организация митохондрий является отражением их функционального состояния и в значительной мере является показателем жизнеспособности клетки. Косвенным параметром оценки функционального состояния митохондрии и клетки является степень фрагментации, т. е. соотношение протяженных или разветвленных митохондриальных структур к округлым митохондриям. Насущная необходимость такой оценки требует выработки подходов, позволяющих на основании конфокальных изображений митохондрий, окрашенных флуоресцентными зондами, воссоздать целостную картину трехмерной организации митохондриома. В настоящей работе нами были опробованы три подхода к анализу структурной организации митохондрий клеток в норме и при фрагментации, индуцированной окислительным стрессом. Выявлено, что наиболее информативным способом анализа является трехмерное реконструирование на основе серии конфокальных изображений по оси z, однако с рядом ограничений возможно применение и более простых систем анализа, в том числе и по единичным двумерным изображениям. Дальнейшая разработка подобных методик анализа изображений позволит исследовать более тонкую организацию митохондрий в условиях нормы и различных патологических состояний. Это позволит обеспечить количественную оценку множества параметров, характеризующих морфофункциональное состояние митохондрий (прежде всего их абсолютных и относительных объемов) и дающих дополнительную информацию о ходе процессов трехмерной организации митохондриома.

Ключевые слова: митохондрии, фрагментация, конфокальная микроскопия, трехмерная реконструкция.

Принятые сокращения: ИР — ишемия—реоксигенация, SkQ1 — пластохинонил-децилтрифенилфосфоний, TMRE — этиловый эфир тетраметилпродамина.

Помимо генерации АТФ митохондрии в клетке выполняют целый ряд разнообразных функций, таких как регуляция внутриклеточного редокс-статуса, биосинтез ряда метаболитов и регуляторов, термогенез, участие в программируемой гибели клетки и детоксикация (Zorov et al., 1997). Доказанным является участие митохондрий в развитии различных патологических процессов, таких как ишемические повреждения органов и разнообразные заболевания, входящие в сферу митохондриальной медицины (Зоров и др., 2013) и пока еще напрямую не классифицированные как митохондриальные болезни, например болезни Альцгеймера и Паркинсона, в патогенезе которых принимают участие митохондрии (Friedland-Leuner et al., 2014; Picone et al., 2014; Wang et al., 2014; Силачев и др., 2015; Benek et al., 2015; Cenini, Voos, 2016). Воздействия, направленные на защиту митохондрий, обещают в скором времени стать клинически значимыми подходами для лечения таких патологий. Для исследования механиз-

ма участия митохондрий в нормальном и патологическом течении внутриклеточных процессов необходим анализ функционального состояния митохондрий в клетках, и немаловажную роль в этом анализе играет оценка структурной организации митохондрий. Неоднократно показано, что размеры и формы митохондрий в клетке непостоянны и что между процессами фрагментации и слияния митохондрий существует определенное равновесие (Fredderick, Chevremont, 1952; Bakeeva et al., 1978; Smith, Ord, 1983). Равновесие резко смещается в сторону фрагментации (расщепления) при патологических воздействиях, когда практически вся популяция митохондрий в клетке представлена малыми округлыми митохондриями (переход нить—зерно) (Vorobjev, Zorov, 1983; Skulachev et al., 2004; Chan, 2006).

Эти структурные переходы определяются редокс-состоянием клетки. Например, показано, что при окислительном повреждении клеток почек в культуре и в ткани

митохондрии фрагментируются, что может являться одним из первых признаков деградации клетки (Plotnikov et al., 2007, 2008). Это динамическое равновесие не только важно для нормального функционирования клетки, но, видимо, является ключевым механизмом, обеспечивающим репарацию поврежденных митохондрий. Анализ степени фрагментации, а также скорости восстановления нормальной структуры митохондрий является крайне важным для исследования механизмов развития патологий, а также для оценки эффективности терапевтических подходов.

Современные методы анализа изображений, полученных с помощью флуоресцентной или лазерной конфокальной микроскопии, позволяют количественно оценить параметры, отражающие состояние и морфологию митохондрий в клетке. Более того, программный анализ позволяет получить качественно новую информацию, которую очень трудно оценить невооруженным глазом. Кроме этого, автоматизированные методы анализа позволяют избежать субъективности при анализе и значительно сократить временные затраты.

Есть два основных подхода для количественной оценки фрагментации митохондрий в клетках — двухмерный и трехмерный. Оба подхода требуют флуоресцентного мечения митохондрий. Этого можно достичь с помощью либо флуоресцентных зондов, накапливающихся в митохондриях в зависимости от величины мембранного потенциала, либо генетически кодируемых флуоресцентных белков, имеющих адресную (митохондриальную) локализацию. Для двухмерного метода оценки структуры достаточно одного флуоресцентного изображения клетки, если митохондрии на нем хорошо разрешены. Трехмерный метод требует наличия так называемого z-стека — набора конфокальных изображений интенсивности флуоресценции клетки по оси z, соответствующей толщине клетки, получаемых с помощью лазерного сканирующего конфокального микроскопа.

В настоящей работе мы применили оба этих алгоритма оценки морфологического состояния митохондрий клеток после ишемического воздействия и сравнили их возможности, оценивая максимально широкий набор параметров морфофункционального состояния митохондрий.

Материал и методика

Двухмерный и полутрехмерный анализ. Для двухмерного анализа были использованы стандартные алгоритмы «анализа частиц», которые входят в такие пакеты анализа изображений, как ImageJ (NIH, США) и Fiji (LOCI, США). Дополнительно мы использовали алгоритм, специально написанный для анализа фрагментации митохондрий (Herbert et al., 2014; Lautenschlager et al., 2015). Данный алгоритм выделяет изображение митохондрий в двухмерных координатах и оценивает их длину, а также площадь клетки (вычитая площадь, занимаемую ядром). Алгоритм позволяет оценить среднюю длину митохондрий в клетке, а также среднее число митохондрий на площадь цитоплазмы. С помощью этого же модуля мы провели аналогичный анализ для набора изображений по толщине клетки (z-стека) («полутрехмерный анализ»), который позволяет соотнести информацию о длине и количестве выделенных митохондрий не с площадью, а с объемом клетки.

Трехмерный анализ. Для анализа конфигурации митохондриома мы использовали независимый программный модуль для пакета Fiji (Bolte, Cordelières, 2006). В этом подходе выделяются все флуоресцирующие объекты в клетке как единый объект. Для анализа используется информация о суммарном объеме митохондрий и их суммарной площади поверхности. Суммарная площадь поверхности позволяет косвенно оценить форму митохондрий: чем больше объект (и чем ближе его форма к сфере), тем больше соотношение его объема к его площади поверхности; чем меньше объекты, занимающие тот же суммарный объем, тем больше суммарная площадь их поверхности и тем меньше это соотношение. Таким образом, уменьшение соотношения объема к площади косвенно говорит о степени фрагментации митохондрий.

Для трехмерного анализа с автоматической сегментацией, т. е. с выделением отдельных митохондрий, мы использовали алгоритм spot segmentation из пакета (Ollion et al., 2013). С помощью этого подхода можно получить информацию о размере, форме, интенсивности флуоресценции и прочих параметрах отдельных митохондрий, в том числе и параметров, анализируемых описанными выше алгоритмами.

Эксперименты на культуре клеток почечного эпителия. У 3—7-суточных крысят асептически удаляли почки, которые измельчали и помещали в сбалансированный буферный солевой раствор Хенкса, pH 7.4. После отмывки ткань помещали в 0.1%-ный раствор коллагеназы в растворе Хенкса и инкубировали в течение 30 мин при 37 °C, удаляли крупные куски ткани, а супернатант центрифугировали при 200 g в течение 3 мин. Осадок клеток ресуспендировали в смеси сред DMEM/F12 (1 : 1), суспензию клеток оставляли в пробирке на 10—12 мин, после чего отбирали осадок, в котором содержались почечные каналы. Клетки культивировали в среде DMEM/F12, содержащей 10 % эмбриональной бычьей сыворотки, до достижения 60—70%-ного монослоя, после чего использовали для проведения экспериментов. Ишемию моделировали в растворе Хенкса путем его продувания азотом для создания аноксических условий. Клетки инкубировали в аноксической среде 24 ч при 37 °C, затем раствор заменяли на стандартную питательную среду, индуцируя реоксигенацию. Для оценки трансмембранного потенциала митохондрий клетки инкубировали в течение 30 мин с зондом этилового эфира тетраметилпродамина (TMRE, 200 nM). В качестве защитного агента использовали митохондриально направленный антиоксидант SkQ1 (120 nM) (Бакеева и др., 2008), с которым клетки инкубировали в течение 6 сут перед моделированием ишемии. Изображения получали с помощью лазерного сканирующего конфокального микроскопа LSM510 (объектив с масляной иммерсией Plan-Neofluar 63×/1.25 Oil, возбуждение при 543 нм, эмиссия в диапазоне 560—590 нм).

Статистика. Для каждого изображения считали около 500 митохондрий. Данные представлены в виде среднего значения и его стандартной ошибки (SEM).

Результаты

Двухмерный и полутрехмерный анализ фрагментации. С помощью конфокального микроскопа получены 3 серии изображений клеток — контрольных, подвергшихся ишемии—реоксигенации (ИР) и

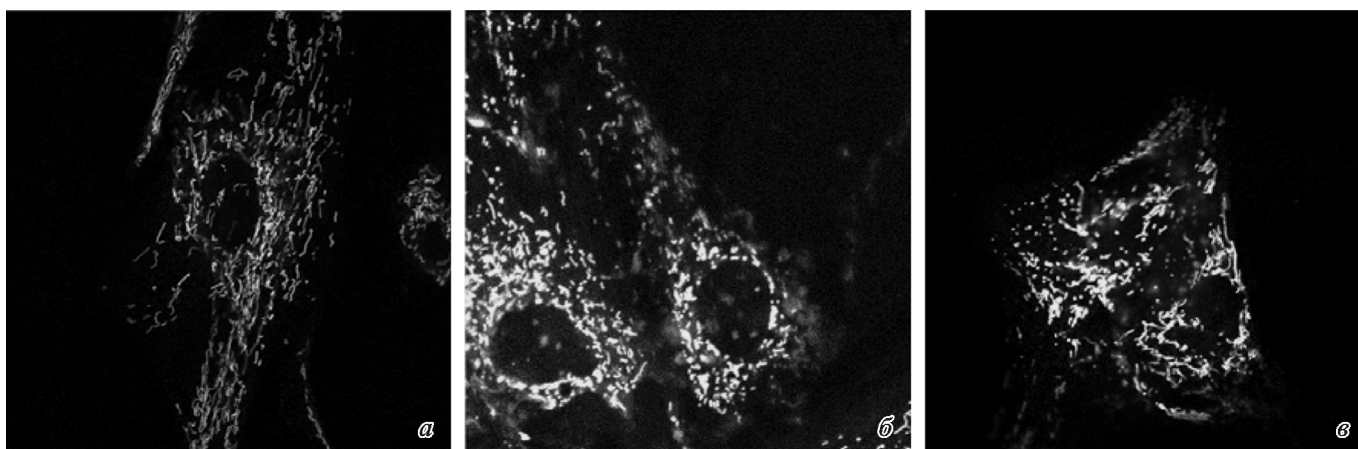


Рис. 1. Конфокальные изображения клеток первичной культуры почки, нагруженных зондом TMRE (200 нМ), в контроле (*а*), после ишемии—реоксигенации (ИР, *б*) и после ИР на фоне предобработки 120 нМ митохондриально адресованным антиоксидантом SkQ1 (*в*).

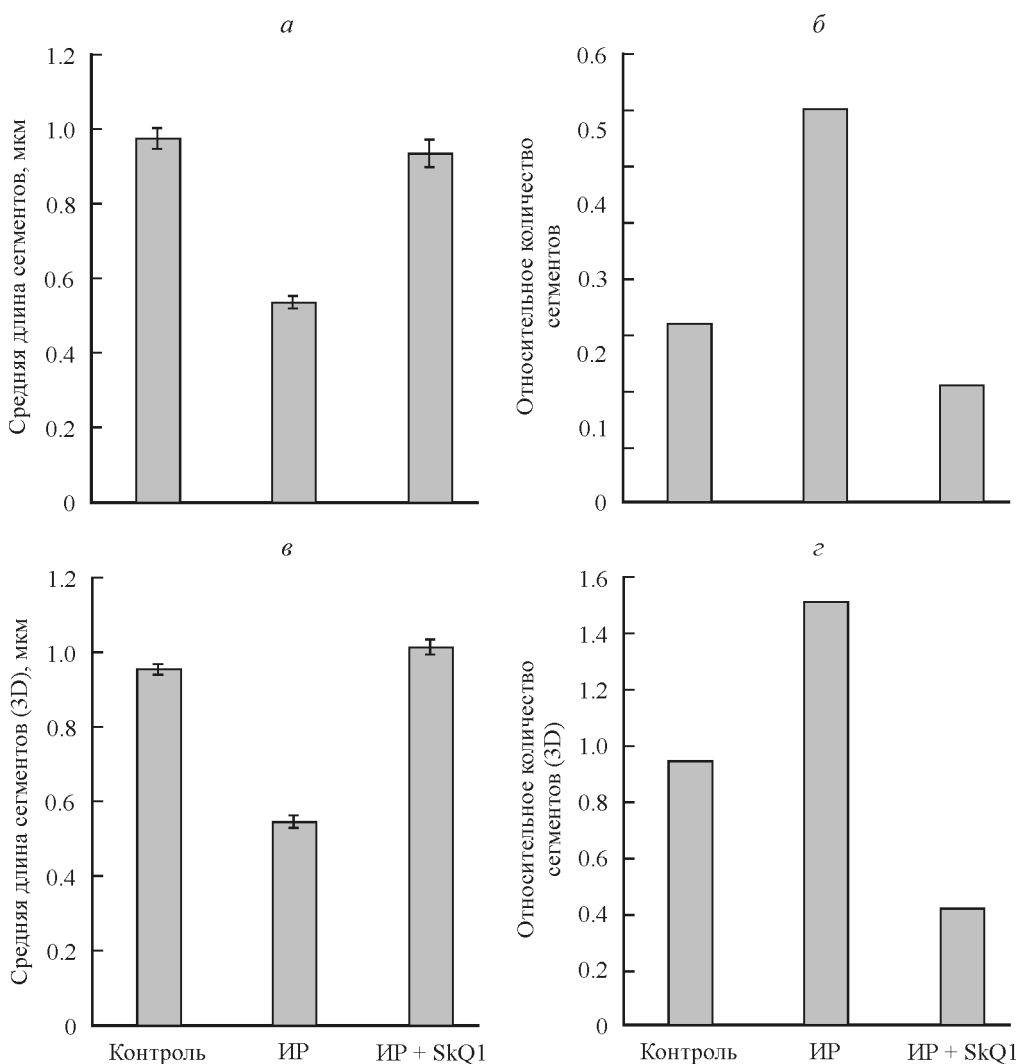


Рис. 2. Параметры митохондрий, определенные с помощью алгоритма двухмерного (*а—б*) и полутрехмерного (*в—г*) анализа фрагментации в контроле, после ИР и после ИР на фоне предобработки SkQ1 (120 нМ).

а — средняя длина сегментов; *б* — количество сегментов относительно площади клетки (без площади ядра); *в, г* — средняя длина сегментов и количество сегментов относительно объема клетки (без ядра), посчитанные с помощью алгоритма полутрехмерного анализа (Lautenschlager et al., 2015).

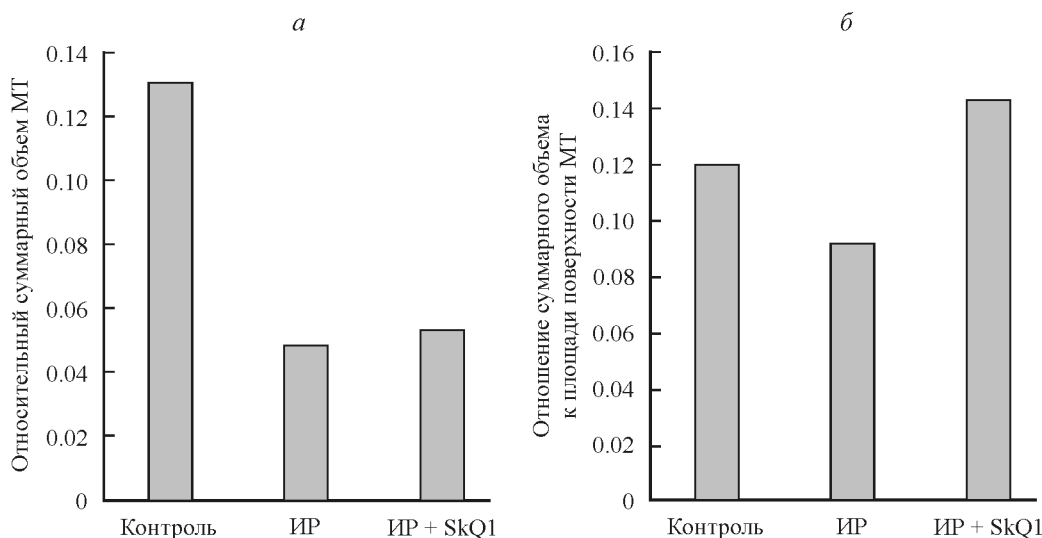


Рис. 3. Суммарный объем всех митохондрий (МТ) в клетке, нормированный на объем клетки (а), и отношение суммарного объема всех МТ к их суммарной площади, занимаемой МТ-профилями (б), посчитанные с помощью трехмерного анализа (Bolte, Cordelières, 2006).

Обозначения те же, что и на рис. 2.

подвергшихся ИР на фоне обработки SkQ1 (рис. 1). При визуализации митохондрий с помощью зонда TMRE выявлено, что в контрольных клетках митохондриальный ретикулум представлен в основном в виде нитей и палочек (рис. 1, а), т. е. структур, имеющих высокое соотношение длина/ширина. После ИР визуально наблюдаются дробление митохондрий и переход их в состояние «зерно» (рис. 1, б), тогда как при предобработке SkQ1 это явление выражено в меньшей степени. Поскольку визуальная оценка изображений не может дать объективной и количественной оценки степени подобной фрагментации, мы использовали далее различные методы программного анализа данных изображений. Действительно, двухмерный анализ показал, что после ишемии происходит фрагментация митохондрий, что выражается в уменьшении средней длины митохондрий в клетке (рис. 2, а) и одно-

временном увеличении количества коротких фрагментов (рис. 2, б), при этом митохондриально направленный антиоксидант SkQ1 предотвращал уменьшение длины митохондрий. Интересно отметить, что общее количество фрагментов в клетке в случае защищающего агента снизилось (рис. 2, б). Аналогичные изменения зафиксированы и при использовании полутрехмерного анализа, когда анализировали серию конфокальных изображений одной клетки по ее толщине (z-стек). В этом случае после ИР также наблюдали значимое снижение средней длины сегментов (рис. 2, в) и увеличение их количества в клетке (рис. 2, з), тогда как обработка SkQ1 предотвращала эти изменения.

Трехмерный анализ митохондриома. С помощью этого анализа мы выявили, что суммарный объем митохондрий, нормированный на объем клетки, падает

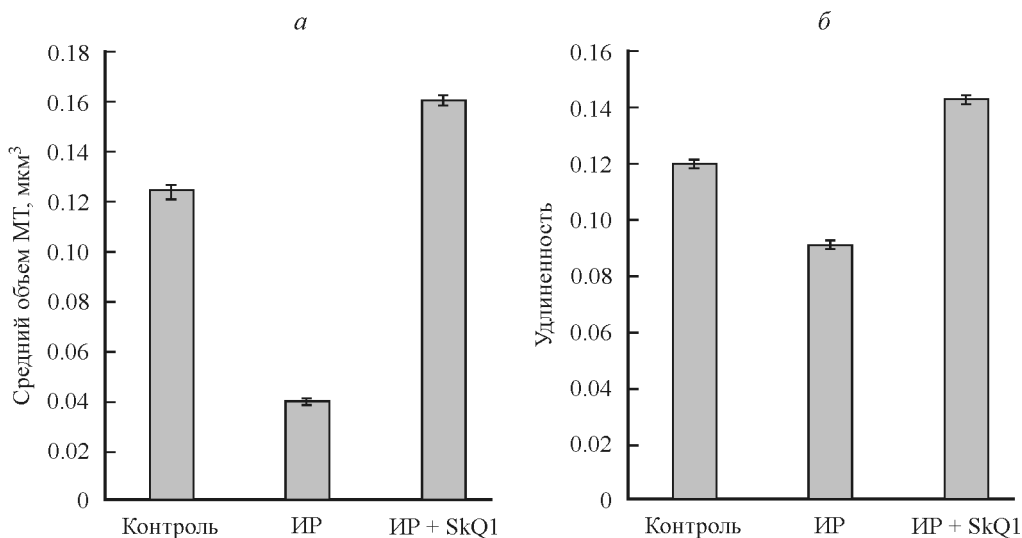


Рис. 4. Средний объем (а) и удлиненность (б) митохондрий, посчитанные с помощью алгоритма трехмерного анализа с сегментацией (Ollion et al., 2013).

Обозначения те же, что и на рис. 2.

после ИР клеток, а обработка SkQ1 не влияет на эти изменения (рис. 3, *a*). Этот результат отличается от полученного при двухмерном и полутрехмерном анализе длины митохондрий, где средняя длина митохондрий выше при обработке SkQ1 (рис. 2, *a*, *в*). Соотношение объема митохондрий к площади их поверхности снижается после ИР (рис. 3, *б*), но остается на уровне контроля в случае защиты SkQ1. Это косвенно указывает на то, что после ИР без защиты SkQ1 митохондрии мельче, чем в случае контроля или наличия защиты. Кроме этого, даже без системного анализа видно, что, хотя SkQ1 не приводит к увеличению суммарного объема митохондрий, отношение объема митохондрий к поверхности увеличивается, что может свидетельствовать об инициации антиоксидантом процесса слияния митохондрий.

Трехмерный анализ с программной сегментацией объектов прямо показал, что средний объем митохондрий в клетке после ИР падает (рис. 4, *a*), как и их удлиненность (рис. 4, *б*), а обработка SkQ1 предотвращает эти изменения.

Обсуждение

В живой клетке митохондрии обычно находятся в состоянии динамического равновесия в результате постоянно идущих процессов слияния и расщепления, что и проявилось в названии этой структуры (митос — нить и хондрос — зерно). В 1983 г. обнаружено явление глобальной митохондриальной фрагментации, приводящей к тому, что в ответ на окислительный стресс вся клеточная популяция митохондрий (митохондриом) расщепляется на мелкие фрагменты (Vorobjev, Zorov, 1983). Механизм митохондриальной фрагментации достаточно сложен и идет с участием множества белков, которые активируются в ответ на повреждение митохондрий и клетки (Полякова и др., 1995; Skulachev et al., 2004; Chan, 2006; Plotnikov et al., 2007; Зоров и др., 2015). Мы предположили, что фрагментация (расщепление) митохондрий есть адаптивный ответ митохондрий и клетки, приводящий к резкому увеличению числа митохондриальных фрагментов; это является не столько признаком деградации клетки, сколько признаком ускоренного процесса сегрегации митохондриального содержимого и утилизации поврежденных компонентов за счет аутофагии, т. е. механизмом контроля за качеством митохондрий. Становится ясным, что трехмерная организация митохондрий является репортером нормальности или ненормальности функционирования клетки. Учитывая это, необходимо объективно и максимально полно оценивать трехмерную организацию митохондриома в клетке, что может быть обеспечено с помощью компьютерного анализа изображений.

Первым очевидным преимуществом программного анализа изображений является возможность количественной оценки интересующих нас параметров. Это может быть особенно важно, например, при необходимости оценить эффективность какого-либо защищающего агента, как в случае настоящей работы. Отличить визуально клетку с фрагментированными и нефрагментированными митохондриями можно, но различить, а тем более доказать разницу в десятки процентов степени фрагментации без количественных методов оценки невозможно.

На приведенных нами примерах мы показали, что полноценный анализ изображений может дать качествен-

но новую информацию. Так, с помощью оценки различных параметров мы смогли показать, что защищающий агент позволяет сохранять нормальную морфологию митохондрий (рис. 2, *a*, *в*; 4, *a*, *б*), но при этом он не защищает от общего падения относительного объема (количества) митохондрий в клетке (рис. 2, *б*, *в*; 3, *a*). Это в свою очередь позволяет предполагать конкретные детали механизма защиты, которые мы не смогли бы выдвинуть, не проведя такого анализа. В частности, анализируя данный пример, можно предположить, что защищающий агент ускоряет слияние митохондрий после повреждения, но не может предотвратить само повреждение, так как снижение объема митохондрий оказывается таким же, как и без защиты.

Из дополнительных параметров, которые можно анализировать с применением описанных алгоритмов, стоит отметить среднюю флуоресценцию отдельных митохондрий и различные параметры «фактурности» митохондрий (которые могут информировать о гетерогенности внутреннего содержимого митохондрий). Например, таким образом можно обнаружить зависимость между размерами митохондрий и их трансмембранным потенциалом (при использовании зонда TMRE) или уровнем генерации активных форм кислорода с помощью зонда дихлорфлуоресцина. Кроме того, есть возможность исследовать распределение данных параметров в популяции митохондрий: например, анализируемые клетки могут не различаться по средним значениям параметра, но в одной из них этот параметр будет иметь более широкое или даже бимодальное распределение, что может свидетельствовать о наличии разных популяций митохондрий.

Одним из важнейших преимуществ компьютерной обработки изображений является скорость, с которой ее можно производить. Простые и точные подходы, не требующие тщательной проверки результатов для каждого изображения, могут обрабатывать сотни изображений в день. Даже при тщательной проверке результатов работы сложных алгоритмов реально обрабатывать несколько изображений за 1 ч. Аналогичная обработка в ручном режиме потребует десятки часов на одно-единственное изображение.

Приведенные подходы не лишены определенных недостатков, которые необходимо учитывать при проведении анализа, хотя многие из них нивелируются большой статистикой, которую гораздо легче наработать с помощью автоматической обработки. Важным узким местом является качество изображения: оно не должно принципиально меняться от группы к группе, потому что это может достаточно сильно влиять на работу автоматических алгоритмов. Необходимо помнить, что автоматическая работа алгоритмов не может заменить работу исследователя, который должен следить за тем, что обработка ведется корректно и учитываются именно объекты исследования, а не артефакты съемки. Кроме того, следует учитывать цели исследования: для некоторых задач будет достаточно условных относительных параметров, с помощью которых можно сравнить разные экспериментальные группы, для других необходимы подходы, измеряющие реальные параметры биологических объектов.

В настоящей работе мы использовали несколько общедоступных программных алгоритмов, некоторые из которых давали больше информации, чем другие. К сожалению, усложнение подхода ведет не только к увеличению объема получаемой информации, но и к снижению надежности обработки и увеличению вероятности оши-

Характеристики некоторых подходов к морфометрическому и функциональному анализу митохондрий в клеточной культуре

Подход	Измеряемые параметры митохондрий (МТ)	Преимущества	Недостатки
Двухмерный анализ на одном срезе (полутрехмерный на стеке)	Средняя длина, количество на площадь (объем) клетки	Точность выделения	Условность параметров
Трехмерный анализ митохондриома	Суммарный объем и площадь поверхности	Точность, биологическая корректность параметров	Малая информативность, косвенная оценка формы МТ
Трехмерный анализ отдельных митохондрий	Размер, форма, флуоресценция отдельных МТ	Биологическая корректность, информативность	Неточность
Ручное трехмерное выделение митохондрий	То же	Биологическая корректность, информативность, точность	Огромные затраты труда и времени для анализа

бок. Ниже мы попытаемся описать основные особенности каждого из подходов (суммированы в таблице).

Авторы алгоритма двухмерного анализа длины митохондрий убедительно продемонстрировали, что их алгоритм достаточно точно выделяет конфигурацию митохондрии на срезе (Lautenschlager et al., 2015). Главным недостатком этого подхода является то, что две митохондрии, видимые на конкретном срезе как два отдельных профиля, потенциально могут сливаться выше или ниже уровня оптического среза, а в клетке в действительности может быть только одна сильно разветвленная митохондрия, имеющая в каждом сечении множество отдельных профилей. Таким образом, с помощью этого подхода измеряются не абсолютные параметры отдельных митохондрий, а относительные параметры митохондриома на конкретном конфокальном срезе клетки. Однако, поскольку эта условность одинаково влияет на все экспериментальные группы, этот подход вполне корректно использовать для их сравнения.

Полутрехмерный анализ длины митохондрий во всей клетке является расширением предыдущего на несколько оптических срезов. В этом подходе озвученная условность становится наиболее очевидной. Митохондрии на каждом срезе считаются как отдельные, т. е. митохондрия, попавшая на много срезов, на каждом будет учтена как новая. К счастью, в прикрепленной к подложке клетке митохондрии располагаются преимущественно горизонтально, что почти исключает вероятность наличия длинных, вертикально расположенных митохондрий, которые анализом будут восприняты как множество коротких из-за того, что на каждый срез они попали в поперечном сечении. В целом и двухмерный, и полутрехмерный подходы оценивают, скорее, абстрактную разветвленность митохондриома, а не абсолютные параметры митохондрий, поэтому корректно их применять только для сравнения групп.

Анализ суммарного митохондриома является наиболее корректным с точки зрения абсолютных параметров и точности выделения, но при этом наименее информативен. Он позволяет достаточно точно оценить суммарный объем митохондрий, хотя оценить геометрические характеристики митохондрий может лишь по косвенным признакам (соотношение с площадью поверхности, которая измеряется менее точно).

Трехмерная сегментация отдельных митохондрий является наиболее информативным и биологически корректным, но и самым ненадежным. Главным его недостатком являются очень сильные флуктуации в точности выделения отдельных митохондрий, которые зависят от

качества изображений, геометрических характеристик клетки, взаимного расположения митохондрий и настроек программы обработки изображений. Этот алгоритм достаточно корректно может выделить и проанализировать отдельно лежащие митохондрии, но становится недостаточно точным при уменьшении расстояния между митохондриями: в зависимости от настроек он может как излишне дробить единые митохондрии, так и объединять в одну близко лежащие отдельные митохондрии. В результате необходима проверка того, что конкретно выделяет алгоритм. Определенная степень неточности будет присутствовать в любом случае, главное, чтобы она не различалась между группами; именно для этого важно, чтобы качество изображений и условия съемки не различались между группами; более корректно иметь обе группы в неоптимальном, но одинаковом качестве.

Наиболее биологически корректным, информативным и лишенным неточностей подходом, безусловно, является выделение каждой отдельной митохондрии в ручном режиме. Единственным объективным недостатком этого подхода является то, что на обработку одной клетки необходимо потратить десятки часов, что по сути полностью исключает возможность использования этого подхода для реальных исследований.

Можно заключить, что автоматизированные способы обработки изображений обладают значительными преимуществами: они не очень затратны по времени, нетрудоемки для исследователя, лишены субъективности, позволяют не только количественно оценить имеющуюся информацию, но и способны дать качественно новую информацию, которую невозможно получить визуально. Многие подобные алгоритмы входят в бесплатные программные пакеты и достаточно просты в использовании, что делает их легкодоступными для широкого круга исследователей. Эти подходы применимы не только для анализа фрагментации митохондрий в клетке, но подходят и для многих других задач, для решения которых необходимо анализировать изображения биологических объектов.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект 14-15-00147).

Список литературы

Бакеева Л. Е., Барсков И. В., Егоров М. В., Исаев Н. К., Капелько В. И., Казаченко А. В., Кирпатовский В. И., Козловский С. В., Лакомкин В. Л., Левина С. В., Писаренко О. И.,

- Плотников Е. Ю., Сапрунова В. Б., Серебрякова Л. И., Скулачев М. В., Стельмацук Е. В., Студнева И. М., Цкитишвили О. В., Васильева А. К., Викторов И. В., Зоров Д. Б., Скулачев В. П. 2008. Производное пластохинона, адресованное в митохондрии, как средство, прерывающее программу старения. 2. Терапия некоторых старческих патологий, опосредованных АФК (сердечной аритмии, инфарктов сердца и почки и инсульта головного мозга). Биохимия. 73 (12) : 1607—1621. (Bakeeva L. E., Barskov I. V., Egorov M. V., Isaev N. K., Kapelko V. I., Kazachenko A. V., Kupnatovskiy B. I., Kozlovsky S. V., Lakomkin V. L., Levina S. V., Pisarenko O. I., Plotnikov Yu. P., Saprunova V. B., Serebryakova L. I., Skulachev M. V., Stelmashook E. V., Studneva I. M., Tskitishvili O. V., Vasilieva A. K., Viktorov I. V., Zorov D. B., Skulachev V. P. 2008. Mitochondria-targeted plastoquinone derivatives as tools to interrupt execution of the aging program. 2. Treatment of some ROS- and age-related diseases (heart arrhythmia, heart infarctions, kidney ischemia, and stroke). Biochemistry (Moscow). 73 (12) : 1288—1299.)
- Зоров Д. Б., Воробьев И. А., Плотников Е. Ю., Силачев Д. Н., Зорова Л. Д., Певзнер И. Б., Бабенко В. А., Зоров С. Д., Янкаускас С. С., Попков В. А. 2015. Фрагментация (дробление) митохондрий. Частные вопросы. Биол. мембр. 32 (5—6) : 338—345. (Zorov D. B., Vorobjev I. A., Plotnikov E. Y., Silachev D. N., Zorova L. D., Pevzner I. B., Babenko V. A., Zorov S. D., Jankauskas S. S., Popkov V. A. 2015. Specific issues of mitochondrial fragmentation (fission). Biol. Membr. 32 (5—6) : 338—345.)
- Зоров Д. Б., Исаев Н. К., Плотников Е. Ю., Силачев Д. Н., Зорова Л. Д., Певзнер И. Б., Моросанова М. А., Янкаускас С. С., Зоров С. Д., Бабенко В. А. 2013. Перспективы митохондриальной медицины. Биохимия. 78 (9) : 1251—1264. (Zorov D. B., Isaev N. K., Plotnikov E. Y., Silachev D. N., Zorova L. D., Pevzner I. B., Morosanova M. A., Jankauskas S. S., Zorov S. D., Babenko V. A. 2013. Perspectives of mitochondrial medicine. Biochemistry (Moscow). 78 (9) : 979—990.)
- Полякова И. А., Зоров Д. Б., Лейкина М. И. 1995. Структурно-функциональные изменения хондриома культивируемых клеток при нарушении энергетического метаболизма. Докл. РАН. 342 (4) : 553—555. (Poliakova I. A., Zorov D. B., Leikina M. I. 1995. Structure-activity changes of mitochondria from cultured cells upon disruption of energy metabolism. Dokl. Akad. Nauk. 342 (4) : 553—555.)
- Силачев Д. Н., Зорова Л. Д., Усатикова Э. А., Певзнер И. Б., Бабенко В. А., Гуляев М. В., Пирогов Ю. А., Антоненко Ю. Н., Плотников Е. Ю., Зоров Д. Б. 2015. Митохондрии как мишень для нейропротекции. Биол. мембр. 32 (5—6) : 388—398. (Silachev D. N., Zorova L. D., Usatikova E. A., Pevzner I. B., Babenko V. A., Gulyaev M. V., Pirogov Yu. A., Antonenko Yu. N., Plotnikov E. Y., Zorov D. B. 2015. Mitochondria as a target for neuroprotection. Biol. Membr. 32 (5—6) : 388—398.)
- Bakeeva L. E., Chentsov Y. S., Skulachev V. P. 1978. Mitochondrial framework (reticulum mitochondriale) in rat diaphragm muscle. BBA—Bioenergetics. 501: 349—369.
- Benek O., Aitken L., Hroch L., Kuca K., Gunn-Moore F., Musilek K. 2015. A direct interaction between mitochondrial proteins and amyloid-beta peptide and its significance for the progression and treatment of Alzheimer's disease. Curr. Med. Chem. 22 : 1056—1085.
- Bolte S., Cordelieres F. P. 2006. A guided tour into subcellular colocalization analysis in light microscopy. J. Micr. 224 : 213—232.
- Cenini G., Voos W. 2016. Role of mitochondrial protein quality control in oxidative stress-induced neurodegenerative diseases. Curr. Alzheimer Res. 13 : 164—173.
- Chan D. C. 2006. Mitochondrial fusion and fission in mammals. Ann. Rev. Cell Develop. Biol. 22 : 79—99.
- Frederic J., Chevremont M. 1952. Recherches sur les chondriosomes de cellules vivantes par la microscopie et la microcinematographie en contraste de phase (1re partie). Arch. Biol. (Liege). 63 : 109—131.
- Friedland-Leuner K., Stockburger C., Denzer I., Eckert G. P., Müller W. E. 2014. Mitochondrial dysfunction: cause and consequence of Alzheimer's disease. Progr. Mol. Biol. Transl. Sci. 127 : 183—210.
- Herbert S., Ortman W., Lautenschl J., Marco K., Grosskreutz J., Denzler J. 2014. Quantitative analysis of pathological mitochondrial morphology in neuronal cells in confocal laser scanning microscopy images. Proc. IWBBIO. 2014 : 1290—1301.
- Lautenschlager J., Lautenschlager C., Tadic V., Sube H., Ortman W., Denzler J., Grosskreutz J. 2015. Novel computer vision algorithm for the reliable analysis of organelle morphology in whole cell 3D images — a pilot study for the quantitative evaluation of mitochondrial fragmentation in amyotrophic lateral sclerosis. Mitochondrion. 25 : 49—59.
- Ollion J., Cochenec J., Loll F., Escudé C., Boudier T. 2013. TANGO: a generic tool for high-throughput 3D image analysis for studying nuclear organization. Bioinformatics (Oxford, England). 29 : 1840—1841.
- Picone P., Nuzzo D., Caruana L., Scafidi V., Di Carlo M. 2014. Mitochondrial dysfunction: different routes to Alzheimer's disease therapy. Oxidative Med. Cell. Longevity. doi : 10.1155/2014/780179.
- Plotnikov E. Y., Kazachenko A. V., Vyssokikh M. Y., Vasileva A. K., Tevirkun D. V., Isaev N. K., Zorov D. B. 2007. The role of mitochondria in oxidative and nitrosative stress during ischemia/reperfusion in the rat kidney. Kidney Int. 72 : 1493—1502.
- Plotnikov E. Y., Vasileva A. K., Arkhangelskaya A. A., Pevzner I. B., Skulachev V. P., Zorov D. B. 2008. Interrelations of mitochondrial fragmentation and cell death under ischemia/reoxygenation and UV-irradiation: protective effects of SkQ1, lithium ions and insulin. FEBS Lett. 582 : 3117—3124.
- Skulachev V. P., Bakeeva L. E., Chernyak B. V., Domnina L. V., Minin A. A., Pletjushkina O. Y., Zorov D. B. 2004. Thread-grain transition of mitochondrial reticulum as a step of mitoptosis and apoptosis. Mol. Cell. Biochem. 256—257 : 341—358.
- Smith R. A., Ord M. J. 1983. Mitochondrial form and function relationships *in vivo*: their potential in toxicology and pathology. Int. Rev. Cytol. 83 : 63—134.
- Vorobjev I. A., Zorov D. B. 1983. Diazepam inhibits cell respiration and induces fragmentation of mitochondrial reticulum. FEBS Lett. 163 : 311—314.
- Wang X., Wang W., Li L., Perry G., Lee H., Zhu X. 2014. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in Alzheimer's disease. Biochim. biophys. acta. Mol. Basis Disease. 1842 : 1240—1247.
- Zorov D. B., Krasnikov B. F., Kuzminova A. E., Vyssokikh M. Y., Zorova L. D. 1997. Mitochondria revisited. Alternative functions of mitochondria. Biosci. Rep. 17 : 507—520.

QUANTIFICATION OF MITOCHONDRIAL MORPHOLOGY *IN SITU*

V. A. Popkov,^{1,2} E. Yu. Plotnikov,¹ L. D. Zorova,^{1,3} I. B. Pevzner,¹ D. N. Silachev,¹ V. A. Babenko,^{1,2}
S. S. Jankauskas,¹ S. D. Zorov,² D. B. Zorov^{1, *}

¹ Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, M. V. Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119991,

² Faculty of Bioengineering and Bioinformatics, M. V. Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119991,
and ³ International Laser Center, M. V. Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119991;

* e-mail: zorov@genebee.msu.ru

Structural organization of mitochondria reflects their functional status and largely is an index of the cell viability. The indirect parameter to assess the functional state of mitochondria and cells is the degree of fragmentation, i. e. a ratio of long or branched mitochondrial structures to rounded mitochondria. The critical need for such evaluations requires the creation of an approach, that allows on the basis of confocal images of mitochondria stained with a fluorescent probe, to create an integral picture of the three-dimensional organization of mitochondria. In the present study, we tested three approaches to analyze the structural architecture of mitochondria under norm and fission induced by oxidative stress. We have revealed that while the most informative way of analysis is a three-dimensional reconstruction based on series of confocal images taken in Z-dimension, however, with some limitations it is plausible to use more simple algorithms of analysis, including that one that uses unitary two-dimensional images. Further improvement of these methods of image analysis will allow more comprehensive analysis of mitochondrial architecture under norm and different pathological states. It may also provide quantification of a number of mitochondrial parameters determining morpho-functional state of mitochondria primarily their absolute and relative volumes and give additional information on three-dimensional organization of mitochondriome.

Key words: mitochondria, fragmentation, confocal microscopy, 3D modeling.
