

6. Croce, A.C. Autofluorescence spectroscopy and imaging: A tool for biomedical research and diagnosis / A.C. Croce, G. Bottiroli // *Eur. J. Histochem.*, 2014. – 58. – № 4. – 320–337.
7. Dremin, V.V. The development of attenuation compensation models of fluorescence spectroscopy signals / V.V. Dremin, E.A. Zhrebtsov, I.E. Rafailov, A.Y. Vinokurov, I.N. Novikova, A.I. Zhrebtsova, K.S. Litvinova, A.V. Dunaev // *Proc. SPIE*. 2016. – 9917. – 99170Y.
8. Shi, H. Early identification of acute hypoxia based on brain NADH fluorescence and cerebral blood flow / H. Shi, N. Sun, A. Mayevsky, Z. Zhang, Q. Luo // *J. Innov. Opt. Health Sci.*, 2014. – 7. – № 2. – 1450033.
9. Du Le, V.N. Dual-modality optical biopsy of glioblastomas multiforme with diffuse reflectance and fluorescence: ex vivo retrieval of optical properties / V.N. Du Le, J. Provias, N. Murty, M.S. Patterson, Z. Nie, J.E. Hayward, T.J. Farrell, W. McMillan, W. Zhang, Q. Fang // *J. Biomed. Opt.*, 2017. – 22. – № 2. – 27002.
10. Volynskaya, Z.I. Diagnosing breast cancer using diffuse reflectance spectroscopy and intrinsic fluorescence spectroscopy / Z.I. Volynskaya, A.S. Haka, K.L. Bechtel, M. Fitzmaurice, R. Shenk, N. Wang, J. Nazemi, R.R. Dasari, M.S. Feld // *J. Biomed. Opt.*, 2008. – 13. – № 2. – 24012.
11. Pogue, B.W. Review of tissue simulating phantoms for optical spectroscopy, imaging and dosimetry / B.W. Pogue, M.S. Patterson // *J. Biomed. Opt.*, 2006. – 11. – № 4. – 41102.
12. Weissig, V. Mitochondrial Medicine / V. Weissig, M. Edeas. – Humana Press, 2015. – Т. 1. – 480 с.
13. Kandurova, K.Y. Approbation of fine needle optical probe for registration of changes in cell respiration coenzymes fluorescence / K.Y. Kandurova, E.V. Potapova, E.A. Zhrebtsov, V.V. Dremin, E.S. Seryogina, A.Y. Vinokurov, A.V. Mamoshin, A.V. Borsukov, Y.V. Ivanov, A.V. Dunaev // *Opt. Spectrosc.*, 2020. – 128. – 6.
14. Sachar, M. Protoporphyrin IX: the good, the bad, and the ugly / M. Sachar, K.E. Anderson, X. Ma // *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 2016. – 356. – № 2. – 267–275.
15. Lewis, M.A. Hepatic artery embolization for neuroendocrine tumors: postprocedural management and complications / M.A. Lewis, S. Jaramillo, L. Roberts, C.J. Fleming, J. Rubin, A. Grothey // *Oncologist*, 2012. – 17. – № 5. – 725-731.

THE STUDY OF INOCULATED HEPATOCELLULAR CARCINOMA IN MICE USING FLUORESCENCE AND DIFFUSE REFLECTANCE SPECTROSCOPY

¹Kandurova K.Y., ¹Potapova E.V., ¹Shupletsov V.V., ¹Seryogina E.S., ^{1,2}Dremin V.V., ^{1,3}Zhrebtsov E.A., ⁴Alekseyev A.G., ^{1,5}Mamoshin A.V., ¹Dunaev A.V.

¹Research and Development Center of Biomedical Photonics, Orel State University, Orel, *kandkseniya@gmail.com,

²Aston Institute of Photonic Technologies, Aston University, Birmingham,

³Optoelectronics and Measurement Techniques Unit, University of Oulu, Oulu,

⁴Medical Institute, Orel State University, Orel,

⁵Orel Regional Clinical Hospital, Orel

Keywords: optical biopsy, fluorescence spectroscopy, diffuse reflection spectroscopy, hepatocellular carcinoma

Annotation. The article describes the results of experimental studies using a specially developed system for optical biopsy, designed for in vivo diagnosis of puncture biopsy of diffuse and focal liver neoplasms. Experimental studies were conducted on laboratory mice with intertwined hepatocellular carcinoma cells. The optical methods used were fluorescence and diffuse-reflective spectroscopy. The obtained results demonstrate quantitative differences in the maximum intensity of fluorescence and the form of diffuse reflection spectra of healthy and malignant tissues, indicating the presence of metabolic and morphological changes. The developed multiparametric approach is promising for further development, testing and implementation in clinical practice.



СРАВНЕНИЕ СКОРОСТИ ВЫРАБОТКИ NADH В ТКАНЯХ РАЗЛИЧНЫХ ОТДЕЛОВ ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫС

^{1*}Горлин П.М., ^{1**}Палалов А.А., ¹Стельмашук О.А., ¹Жеребцов Е.А., ^{1,2}Абрамов А.Ю.

¹ФГБОУ ВО «ОГУ им. И.С. Тургенева», г. Орёл, *gorlin23@yandex.ru, **d.alexanderpalalov@yandex.ru,

²Department of Clinical and Movement Neurosciences, UCL Queen Square Institute of Neurology, London

Ключевые слова: митохондрии, нейродегенеративные заболевания, NADH, нейрон

Аннотация. Изучение работы митохондрий в нервной ткани является одним из перспективных направлений современной нейробиологии. Дисфункция митохондрий приводит к необратимым патологическим процессам и является ключевым звеном патогенеза нейродегенеративных заболеваний. Оценить работу митохондрий возможно с помощью определения NADH – субстрата цепи переноса электронов, генерирующей митохондриальный потенциал для синтеза АТФ. При этом интенсивность метаболических процессов и активность митохондрий в клетках различных областей головного мозга отличается. Мы исследовали скорость образования и пул NADH в с помощью флуоресцентной спектроскопии в нервной ткани головного мозга крыс в пяти областях: коре, среднем мозге, гиппокампе, мозжечке и стволе. Согласно результатам исследования,

скорость синтеза и совокупная концентрация NADH в тканях указанных областей головного мозга достоверно отличаются. Полученные данные, вероятно, позволят в некоторой степени объяснить селективность поражения различных отделов центральной нервной системы при развитии нейродегенерации.

Нейродегенеративные заболевания – гетерогенная группа прогрессирующих, разрушительных и неизлечимых заболеваний, распространенных в пожилом и старческом возрасте, исходом которых часто является развитие деменции. Так, по данным Всемирной Организации Здравоохранения (ВОЗ), в мире насчитывается 50 млн человек с деменцией, и каждый год выявляется 10 млн новых случаев. Наиболее часто встречающимися нейродегенеративными заболеваниями являются болезнь Альцгеймера (БА) и болезнь Паркинсона (БП), поражающие 5% (БА) и 1% (БП) людей в возрасте 65 лет и старше [1,2]. Ежегодные расходы на уход в домах престарелых при основных нейродегенеративных заболеваниях в европейских странах оцениваются в сотни миллионов евро [3]. Несмотря на активное изучение, этиология нейродегенеративных заболеваний все еще не выяснена. Одна из наиболее перспективных гипотез предполагает ключевую роль митохондрий в развитии нейродегенерации.

Митохондрии были впервые описаны немецким анатомом и гистологом Рихардом Альтманом в 1894 году, а название этой органелле предложил другой немецкий гистолог – К. Бенд в 1897 году. Но только в 1920 году биохимик Отто Вагбург доказал, что митохондрии являются главными энергетическими станциями клетки и тесно связаны с процессами клеточного дыхания. В дальнейшем выяснилось, что функции митохондрий включают не только энергетическое обеспечение клеток, но также регуляцию кальциевого гомеостаза, жизненного цикла клетки, продукцию активных форм кислорода (АФК) [4].

Митохондрии – двумембранные органеллы, имеющие матрикс и крипты. В матриксе митохондрий происходит совокупность биохимических реакций, получивших название цикл трикарбоновых кислот, или цикл Кребса. В процессе последовательных окислительных реакций выделяется энергия в виде восстановленных молекул NADH, FADH₂, которые, в свою очередь, являются донорами электронов для комплексов цепи переноса электронов (ЦПЭ), расположенной на мембране митохондрии [5].

ЦПЭ состоит из ферментных комплексов, которые, используя энергию NADH и FADH₂, генерируют митохондриальный мембранный потенциал ($\Delta\psi_m$), являющийся движущей силой для синтеза АТФ – основного источника энергии в живых организмах. Поскольку митохондрии являются регуляторами множества витальных клеточных процессов, их дисфункция напрямую связана с развитием ряда патологических процессов [6]. Так, нарушение работы митохондрий является одним из ключевых патогенетических составляющих нейродегенеративных заболеваний [7,8]. Увеличение синтеза АФК, окислительный стресс – облигатные звенья патогенеза нейродегенерации, исходом которых является гибель нейронов центральной нервной системы [9,10].

Интенсивность общего энергетического обмена, плотность распределения митохондрий в клетках различных областей головного мозга неодинакова. Так, ткани гиппокампа, мозжечка, среднего мозга и коры больших полушарий обладают различной активностью ферментов гликолиза, уровнем продукции АФК, активностью митохондрий [11,12]. Также в различных областях ЦНС отличается уровень NADH – основного субстрата ЦПЭ митохондрий [13].

Вместе с тем отмечается определенная селективность в поражении различных отделов головного мозга при нейродегенерации, что, вероятно, связано с морфофункциональными особенностями данных отделов. В начальных стадиях заболевания страдают преимущественно черная субстанция, энторинальная кора (часть формации гиппокампа), пирамидальные клетки гиппокампа (поле CA₁), клетки голубого пятна, позднее поражаются обширные участки коры и других отделов центральной нервной системы [14,15]. Причиной подобной уязвимости одних и относительной устойчивости других структур, предположительно, является различная активность митохондрий в данных областях головного мозга.

Оценить работу митохондрий возможно путем измерения уровня NADH – основного донора электронов в ЦПЭ. Его определение *in vitro* может быть осуществлено с помощью флуоресцентной спектроскопии (ФС) – неинвазивного метода, основанного на регистрации эндогенных флуорофоров. Измерение уровня флуоресценции NADH в клетке позволит сделать вывод о ее метаболической активности, о сохранности или нарушении работы митохондрий, что особенно актуально в связи с высокой распространенностью нейродегенеративных заболеваний.

Таким образом, целью данной работы является измерение скорости выработки NADH в тканях различных отделов головного мозга крыс для сравнения митохондриальной активности в данных областях.

Все экспериментальные протоколы соответствовали этическим нормам по гуманному обращению с животными, принятым в Орловском государственном университете (одобрены Этическим комитетом Орловского государственного университета имени И.С. Тургенева № 12 от 06.09.2018). Эксперименты по сравнению скорости выработки NADH в тканях различных отделов головного мозга проводились на крысах линии Wistar возраста 12 недель (n=4). Эвтаназию проводили путем дислокации шейного отдела позвоночника. После выделения головного мозга крыс помещался в охлажденную среду Хенкса. Горизонтальные срезы мозга толщиной 500 мкм нарезались ручным методом из различных областей: кора больших полушарий, средний мозг, мозжечок, гиппокамп и ствол.

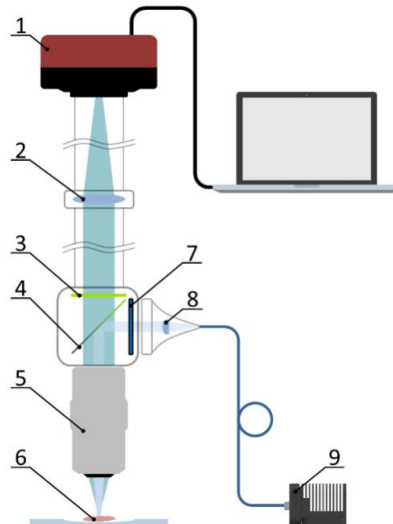


Рисунок 1 – Схема экспериментальной установки для измерения эндогенной флуоресценции:

1 – ПЗС-камера, 2 – линза $f=200$ мм, 3 – длинноволновый светофильтр, 4 – дихроичный фильтр, 5 – планарный апохроматический объектив, 6 – образец, 7 – светофильтр, 8 – коллиматор, 9 – источник излучения

Для определения верхних и нижних значений пула митохондриального NADH, использовались растворы FCCP (5 мкМ) и NaCN (5 мМ). Перед проведением измерений свежие подготовленные срезы помещались в стеклянную ячейку со средой Хенкса и фиксировались механически для устранения их движения в ходе эксперимента. Затем проводилась регистрация базового уровня эндогенной флуоресценции, добавление FCCP для достижения в ячейке концентрации 5 мкМ с последующей регистрацией изменений флуоресценции, и, затем, добавление NaCN до концентрации 5 мМ с последним этапом регистрации вызванных изменений флуоресценции. Каждый этап регистрации эндогенной флуоресценции длился 3 минуты с интервалом в 2 с между кадрами.

Примеры расчета изменений эндогенной флуоресценции NADH представлены на рисунке 2.

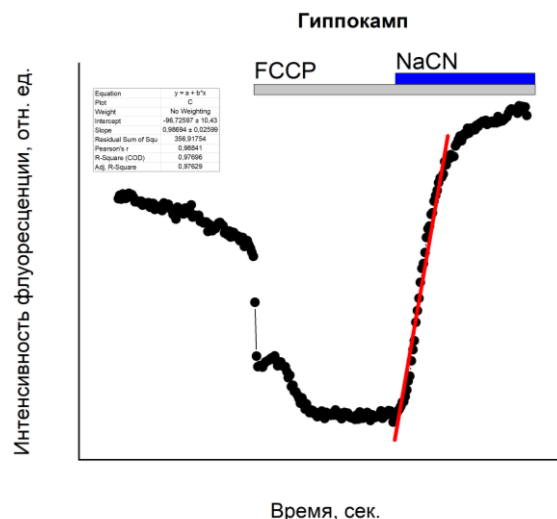


Рисунок 2 – Пример расчета скорости роста NADH

Скорость роста NADH в мозжечке составило $1,35 \pm 0,22$ отн. Ед., коре $1,67 \pm 0,66$ отн. Ед., в гиппокампе $2,43 \pm 0,61$ отн. Ед., в среднем мозге $2,43 \pm 0,77$ отн. Ед. и в стволе мозга $1,11 \pm 0,54$ отн. Ед. Статистически значимые различия были получены у гиппокампа с мозжечком ($p < 0,01$) и стволом ($p < 0,001$), так же у среднего мозга с корой ($p < 0,01$) и с мозжечком и стволом ($p < 0,001$).

При обработке данных было выявлено, что гиппокамп и средний мозг имеет более высокую активность по сравнению с другими областями мозга.

Структура, наиболее часто затрагиваемые при синдроме Ли и других митохондриальных расстройствах, это средний мозг. Учитывая эту избирательную чувствительность нейронов среднего мозга и ствола головного мозга к ингибированию или разрушению комплекса I, можно объяснить высокую активность производства NADH [16].

Можно предположить, что в гиппокампе данная скорость реакции NADH связана с более высокими когнитивными функциями мозга млекопитающих, где функции сильно зависят от продукции митохондриальной АТФ и особенно от функции I комплекса.

Работа выполнена в рамках проекта «Митохондрии как мишени в механизме нейродегенеративных заболеваний» на основании подписанного соглашения № 075-15-2019-1877 от 03.12.2019 г.

Библиографический список

1. Masters C.L. et al. Alzheimer's disease // Nat. Rev. Dis. Prim. Macmillan Publishers Limited, 2015. Vol. 1. P. 1–18.
3. Vossius C., Nilsen O.B., Larsen J.P. Parkinson's disease and nursing home placement: the economic impact of the need for care // Eur. J. Neurol. Wiley Online Library, 2009. Vol. 16, № 2. P. 194–200.
4. Angelova P.R., Abramov A.Y. Role of mitochondrial ROS in the brain: from physiology to neurodegeneration // FEBS Letters. 2018.
5. Cracan V. et al. A genetically encoded tool for manipulation of NADP⁺/NADPH in living cells // Nat. Chem. Biol. Nature Publishing Group, 2017. Vol. 13, № 10. P. 1088–1095.
6. Titov D. V et al. Complementation of mitochondrial electron transport chain by manipulation of the NAD⁺/NADH ratio // Science (80-.). 2016. Vol. 352, № 6282. P. 231 LP – 235.
7. Erkkinen M.G., Kim M., Geschwind M.D. Clinical neurology and epidemiology of the major neurodegenerative diseases // CHS Perspectives Biol. 2018.
8. Niedzielska E. et al. Oxidative Stress in Neurodegenerative Diseases // Mol. Neurobiol. 2016. Vol. 53, № 6. P. 4094–4125.
9. Zewen Liu et al. Oxidative stress in neurodegenerative diseases: from molecular mechanisms to clinical applications // Oxid. Med. Cell. Longev. 2017. P. 1–11.
10. Angelova P.R., Abramov A.Y. Functional role of mitochondrial reactive oxygen species in physiology // Free Radical Biology and Medicine. 2016.
11. McNair L.F. et al. Metabolic Characterization of Acutely Isolated Hippocampal and Cerebral Cortical Slices Using [U-13C]Glucose and [1,2-13C]Acetate as Substrates // Neurochem. Res. Springer US, 2017. Vol. 42, № 3. P. 810–826.
12. Andersen J. V. et al. Distinct differences in rates of oxygen consumption and ATP synthesis of regionally isolated non-synaptic mouse brain mitochondria // J. Neurosci. Res. 2019. Vol. 97, № 8. P. 961–974.
13. Christian A.R. et al. NADH-linked mitochondrial respiration in the developing mouse brain is sex-, age- and tissue-dependent // Respir. Physiol. Neurobiol. Elsevier, 2019. Vol. 266, № May. P. 156–162.
14. Snyder B. et al. Chronic intermittent hypoxia induces oxidative stress and inflammation in brain regions associated with early-stage neurodegeneration // Physiol. Rep. 2017. Vol. 5, № 9. P. 1–13.
15. Fu H., Hardy J., Duff K.E. Selective vulnerability in neurodegenerative diseases // Nat. Neurosci. Springer US, 2018. Vol. 21, № 10. P. 1350–1358.
16. Wirtz S., Schuelke M. Region-specific expression of mitochondrial complex I genes during Murine Brain development // PLoS One. 2011. Vol. 6, № 4.

COMPARISON OF NADH PRODUCTION SPEED IN TISSUES OF VARIOUS RATBRAIN REGIONS

^{1*}Gorlin P.M., ^{1**}Palalov A.A., ¹Stelmashchuk O.A., ¹Zherebtsov E.A., ^{1,2}Abramov A.Y.
Orel State University named after I.S. Turgenev, Orel, *gorlin23@yandex.ru, **d.alexanderpalalov@yandex.ru,
²Department of Clinical and Movement Neurosciences, UCL Queen Square Institute of Neurology, London

Keywords: mitochondria, neurodegenerative diseases, NADH, neuron

Annotation. The study of mitochondria in neural tissue is one of the most promising areas of modern neuroscience. Mitochondrial dysfunction leads to irreversible pathological processes and is a key link in the pathogenesis of neurodegenerative diseases. It is possible to evaluate the work of mitochondria by determining the NADH substrate of the electron transfer chain that generates the mitochondrial potential for ATP synthesis. At the same time, the intensity of metabolic processes and mitochondrial activity in cells of different regions of the brain differs. We studied the rate of formation and pool of NADH b using fluorescence spectroscopy in rat neural tissue in five regions: the cortex, midbrain, hippocampus, cerebellum, and stem. According to the results of the study, the rate of synthesis and the total concentration of NADH in the tissues of these areas of the brain significantly differ. The obtained data will probably help to explain to some extent the selectivity of various parts of the Central nervous system in the development of neurodegeneration.