

РАЗЛИЧИЯ ПАРАМЕТРОВ МИТОХОНДРИАЛЬНОГО МЕТАБОЛИЗМА В КЛЕТКАХ РАЗНЫХ ОТДЕЛОВ ГОЛОВНОГО МОЗГА

Стельмащук О.А.¹, Винокуров А.Ю.¹, Жеребцов Е.А.¹, Абрамов А.Ю.^{1,2}

¹Лаборатория клеточной физиологии и патологии, Орловский государственный университет имени И.С. Тургенева, Орел, Россия

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

Введение. При развитии нейродегенеративных заболеваний отмечается селективность в поражении различных отделов головного мозга. Например, в начальных стадиях болезни Паркинсона страдают преимущественно черная субстанция, энторинальная кора, пирамидальные клетки гиппокампа (поле CA1), клетки голубого пятна, позднее поражаются обширные участки коры и других отделов центральной нервной системы [1-4]. Известно также, что митохондриальные токсины (ротенон и MPP+) вызывают иницирующую болезнь Паркинсона потерю нейронов в определенных областях мозга [5,6]. При этом причина такой селективности до конца не ясна. Одним из возможных объяснений могут быть различия в скоростях производства и/или потребления энергии, длительный дефицит которой приводит к гибели нейронов и, как следствие, к развитию нейродегенерации.

Поскольку энергия в форме АТФ в клетках головного мозга преимущественно вырабатывается за счет окислительного фосфорилирования в митохондриях, определяющая роль в нарушении энергетического обмена отводится именно митохондриальной дисфункции. В связи с этим сравнительный анализ митохондриального мембранного потенциала (ММП, $\Delta\Psi_m$), а также митохондриального пула и скорости превращения NADH как одного из параметров функционирования цикла трикарбоновых кислот в различных отделах мозга является весьма актуальным.

Материалы и методы. Экспериментальные исследования проводили на острых срезах головного мозга самцов крыс линии Вистар в возрасте 12 недель, имеющих массу 250-300 г. Все работы с животными по выделению и приготовлению срезов головного мозга одобрены Этическим комитетом Орловского государственного университета имени И.С. Тургенева (протокол № 18 от 21.02.2020 г.) в соответствии с законодательством Российской Федерации. Эвтаназию животных проводили методом цервикальной дислокации. После выделения мозг помещали в охлажденный сбалансированный солевой раствор Хенкса (HBSS) (рН 7.4). Горизонтальные срезы различных областей мозга

(гиппокамп, кора, мозжечок, ствол головного мозга) толщиной 500 мкм были изготовлены в соответствии со стандартными процедурами [7,8] и были выдержаны перед экспериментами не менее 1 часа при 37°C.

Исследования флуоресценции в острых срезах головного мозга проводили с использованием экспериментальной установки, включавшей светодиод M455F1 (Thorlabs Inc., USA) для возбуждения флуоресценции родамина 123 на длине волны 490 нм или лазерного источника BDL-SMN-375 (Becker & Hickl, Germany) для возбуждения флуоресценции NADH на длине волны 375 нм. При этом возбуждающее излучение через оптическое волокно проходило через коллиматор и полосовой фильтр (при использовании светодиода M455F1), а затем через пластину светоделительного фильтра и линзу направлялось на исследуемую область. Испускаемый флуоресцентный свет проходил через длинноволновый фильтр 490 нм (при исследовании флуоресценции родамина 123) или 419 нм (при исследовании автофлуоресценции NADH) на ПЗС-камеру 340M-USB (Thorlabs etc, США).

Для проведения исследований ММП срезы мозга выдерживали в 1 мкМ растворе родамина 123 (Invitrogen by Thermo Fisher Scientific, США) в течение 20 мин до начала эксперимента, после чего трижды промывали с помощью HBSS (37°C, pH 7.4), помещали на предметное стекло с углублением, в которое добавляли 150 мкл HBSS (37°C, pH 7.4). Измерение уровня флуоресценции проводили в режимах регистрации уровней: базового и после внесения в ячейку рабочего раствора FCCP (Sigma-Aldrich, США) в количестве, обеспечивающем концентрацию 1 мкМ. Примеры полученных экспериментальных графиков приведены на рисунке 1.

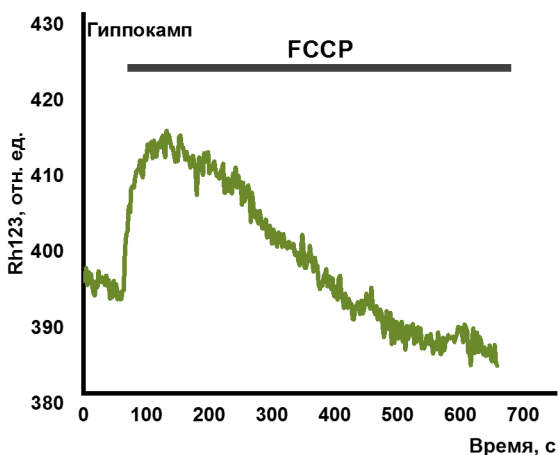


Рис. 1. Пример кривой изменения флуоресценции родамина 123 в срезе гиппокампа.

Сравнительную оценку уровня $\Delta\Psi_m$ проводили по значениям базового уровня флуоресценции относительно данных для коры головного мозга.

Протокол измерений автофлуоресценции NADH включал регистрацию уровней: базового, после внесения рабочего раствора FCCP (для получения концентрации 1 мкМ) и после добавления рабочего раствора NaCN (Sigma-Aldrich, США) (для получения концентрации 2 мМ). Примеры полученных экспериментальных графиков, а также методология их обработки приведены на рисунке 2.

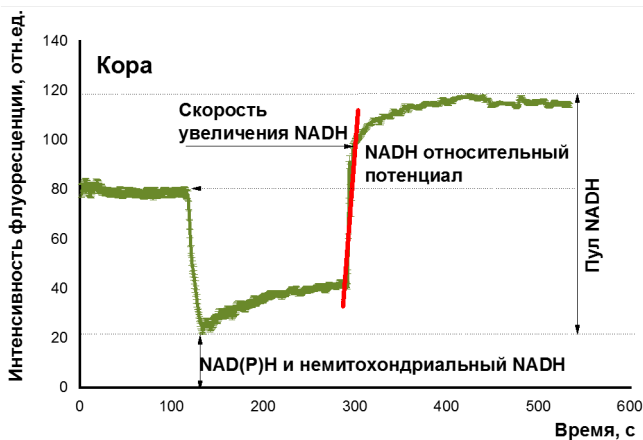


Рис. 2. Автофлуоресценция NADH в срезах отделов головного мозга: пример расчета параметров по автофлуоресценции NADH в срезах коры (а); кривые автофлуоресценции NADH в срезах среднего мозга, гиппокампа, мозжечка и ствола мозга (б-д).

Введение в измерительную ячейку 1 мкМ FCCP, при котором наблюдается максимальный уровень дыхания (уровень митохондриального NADH — 0%), выполняли для отделения автофлуоресценции митохондриального NADH от сигнала NAD(P)H и немитохондриального NADH. Последующее добавление 1 мМ NaCN блокирует потребление NADH и максимально увеличивает уровень NADH в митохондриях. Разница в уровне флуоресценции NADH между минимальным и максимальными значениями может быть принята за меру общего митохондриального содержания кофермента. При этом скорость роста флуоресценции NADH может быть принята как скорость производства NADH в цикле трикарбоновых кислот.

Результаты. Как свидетельствуют экспериментальные данные, отделы головного мозга отличаются по значению $\Delta\Psi_m$ (рисунк 3).

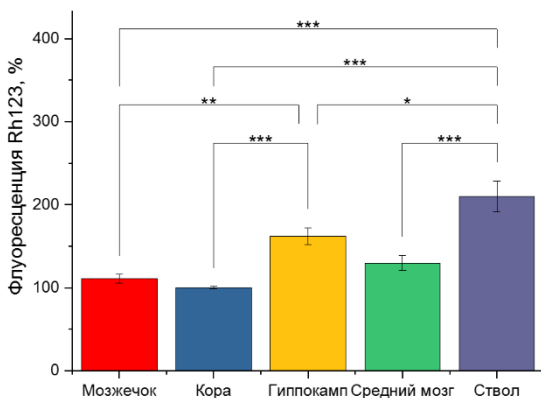


Рис. 3. Уровень флуоресценции родамина 123 в срезах отделов головного мозга крыс (в % от уровня флуоресценции в срезах коры) * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

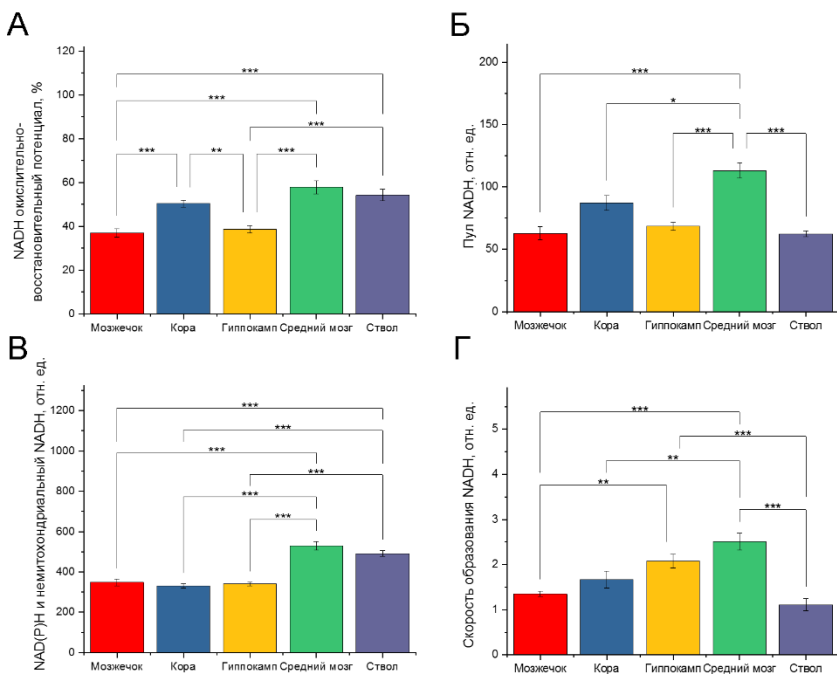


Рис. 4. Результаты статистической обработки энергетических параметров по автофлуоресценции NADH: окислительно-восстановительный потенциал (А); митохондриальный пул NADH (Б); скорость образования NADH в митохондриях срезов различных отделов головного мозга (Г) * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

Наибольшие значения $\Delta\Psi_m$ были обнаружены в срезах ствола мозга ($195 \pm 11\%$ кортикального $\Delta\Psi_m$, $N = 7$ крыс, $n = 14$ срезов) и гиппокамп ($155 \pm 7\%$, $N = 7$ крыс, $n = 14$ срезов). ММП в срезах среднего мозга также был выше по сравнению со срезами коры ($127 \pm 7\%$, $N = 7$ крыс, $n = 14$ срезов), в то время как в срезах мозжечка этот параметр был сходным с данными для коры.

Поскольку ММП может отличаться из-за ряда факторов, включая активность электротранспортной цепи митохондриальной мембраны, уровень экспрессии разобщающих белков, скорость цикла трикарбоновых кислот, для выяснения причин выявленных различий были выполнены исследования уровня NADH в разных отделах мозга.

При обработке экспериментальных результатов проводили расчеты общего митохондриального содержания кофермента (т.е. суммы (пула) NAD и NADH в митохондриях), долю восстановленной формы кофермента (NADH) от общего содержания в МХ (окислительно-восстановительный потенциал), а также скорости образования NADH в митохондриях. Результаты статистической обработки экспериментальных данных приведены на рисунке 4.

Обсуждение. Пул митохондриального NADH в срезах среднего мозга был значительно выше по сравнению со срезами кортикального слоя, гиппокамп, ствола мозга и срезов мозжечка.

Уровень окислительно-восстановительного потенциала NADH, отражающий баланс между производством и потреблением NADH в митохондриях, имел наименьшее значение в срезах гиппокамп ($41 \pm 3\%$, $N = 5$ крыс, $n = 15$ срезов) и мозжечка ($38 \pm 3\%$, $N = 5$ крыс, $n = 15$ срезов), что предполагает более высокую дыхательную активность в этих областях мозга. Самый высокий уровень окислительно-восстановительного потенциала NADH наблюдался в срезах среднего мозга ($62 \pm 5\%$, $N = 5$ крыс, $n = 15$ срезов) и ствола мозга ($58 \pm 5\%$, $N = 5$ крыс, $n = 15$ срезов). Скорость производства NADH различалась в срезах из разных областей мозга с самыми высокими значениями в среднем мозге и гиппокампе. Повышенный уровень окислительно-восстановительного потенциала NADH в срезах среднего мозга можно объяснить более высокой скоростью продукции NADH, в то время как в стволе мозга это более вероятно из-за снижения дыхательной активности. Важно отметить, что уровень NAD(P)H и немитохондриального NADH (измерен по уровню автофлуоресценции, нечувствительной к FCCP и NaCN) также был самым высоким в области среднего мозга и ствола мозга. Немитохондриальные уровни NADH/NAD(P)H в стволе мозга и мозжечке оказались выше по сравнению с кортикальными областями и областями гиппокамп.

Таким образом, селективность поражений отделов головного мозга при нейродегенерации, обусловленная различием в процессах

образования и потребления энергии, находит отражение в различии параметров функционирования митохондрий. Как показали выполненные нами исследования, ММП выше в срезах мозга из гиппокампа и ствола мозга в то время, как скорость продукции NADH и митохондриальный пул NADH наиболее высоки в острых срезах среднего мозга. Это говорит о том, что клетки среднего мозга имеют более высокую скорость метаболизма и потребления АТФ, что делает их более уязвимыми при дефиците энергии.

Работа выполнена при поддержке гранта Правительства Российской Федерации для государственной поддержки научных исследований, проводимых под руководством ведущих учёных в российских образовательных организациях высшего образования, научных учреждениях и государственных научных центрах Российской Федерации № 075-15-2019-1877.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Andersen JV, Jakobsen E, Waagepetersen HS, Aldana BI* // J Neurosci Res. 2019;97(8):961-74.
2. *Arias-Reyes C, Losantos-Ramos K, Gonzales M et al.* // Respir Physiol Neurobiol. 2019;266:156-62.
3. *Snyder B, Shell B, Cunningham JT, Cunningham RL* // Physiol Rep. 2017;5(9):e13258.
4. *Fu H, Hardy J, Duff KE* // Nat Neurosci. 2018;21(10):1350-8.
5. *Singer TP, Ramsay RR* // FEBS Lett. 1990;274(1-2):1-8.
6. *Hartley A, Stone JM, Heron C et al.* // J Neurochem. 1994;63(5):1987-90.
7. *Angelova P, Müller W* // Eur J Neurosci. 2006;23(9):2375-84.
8. *Novikova IN, Manole A, Zhrebtsov EA et al.* // Free Radic Biol Med. 2020;159:15-22.

ИНДУКЦИЯ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ЦИКЛОСПОРИН-ЗАВИСИМОЙ ПОРЫ АЦИЛКАРНИТИНАМИ. ВЛИЯНИЕ ДЛИНЫ УГЛЕРОДНОЙ ЦЕПИ

Федотчева Н.И., Гришина Е.В., Дынник В.В.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Российской академии наук Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино, Россия

Известно, что концентрации длинноцепочечных жирных кислот (LCFA) и их карнитиновых производных (LCAC) в крови при ожирении и диабете сильно увеличиваются, а в условиях ишемии-реперфузии могут