

КОМПЛЕКСНАЯ ОЦЕНКА ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА В ТКАНЯХ ОТДЕЛОВ ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫС ПО СОДЕРЖАНИЮ ВОССТАНОВЛЕННОГО ГЛУТАТИОНА И СКОРОСТИ ПРОДУКЦИИ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА¹Тагунов П.А., ¹Микенькина М.А., ¹Винокуров А.Ю., ^{1,2}Абрамов А.Ю.¹Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Орловский государственный университет имени И.С. Тургенева», г. Орел, pavel.tagunov@tuta.io,
²UCL Queen Square Institute of Neurology, London, a.abramov@ucl.ac.uk

Ключевые слова: активные формы кислорода, эндогенные антиоксиданты, окислительный стресс, митохондриальная дисфункция

Аннотация. Активные формы кислорода (АФК) в последнее время привлекают пристальное внимание ученых. Являясь необходимыми для реализации множественных биологических процессов при физиологических концентрациях АФК в условиях сверхпродукции могут быть причиной развития ряда патологий, среди которых значительное место занимают нейродегенеративные заболевания. Исследование такой взаимосвязи возможно только на основе комплексной оценки уровня окислительного стресса в тканях головного мозга, включающей определение скорости продукции АФК и содержание эндогенного антиоксиданта восстановленного глутатиона.

Активными формами кислорода (АФК) называют совокупность взаимопревращающихся реакционноспособных радикалов кислорода, большинство из которых имеет короткое время жизни. С точки зрения последовательности образования различают три типа АФК: 1) первичные (индуцированные), к которым относят супероксиданион и оксид азота; 2) вторичные, являющиеся продуктом атаки первичными АФК других молекул. К ним относят гидроксильный радикал, пероксинитрит-анион, а также радикалы липидов; 3) третичные, образующиеся в реакциях соединения вторичных радикалов с молекулами легко окисляемых соединений [1].

Общепринято рассматривать АФК как вещества с высокой биологической активностью. В целом, они выступают регуляторами апоптоза, обновления биологических мембран, участвуют в процессах старения организма, клеточной сигнализации, в стимуляции клеточного деления, принимают участие в реакции организма на образование злокачественных опухолей, в развитии иммунных процессов [1]. Так, например, NO является нейромедиатором и выступает в роли регулятора сосудистого тонуса, расслабляя гладкую мускулатуру сосудов, а также снижает агрегацию тромбоцитов и адгезию нейтрофилов к эндотелию [2]. Образующийся из пероксида водорода и хлорид-иона под действием фермента миелопероксидазы слюны гипохлорит-ион реагирует с аминокетильными группами белков бактерий с образованием хлораминов. В реакции с супероксиданионом гипохлорит-ион способен генерировать гидроксильный радикал, обладающий наибольшей цитотоксичностью среди АФК [2]. Известно стимулированное антигенами образование супероксиданиона под действием НАДФН-оксидазы мембран фагоцитов и его участие в нейтрализации возбудителей заболеваний [1]. Однако высокий уровень генерации АФК может приводить к негативным последствиям. К ним относятся прежде всего необратимые повреждения биомолекул (липидов, ДНК, белков) [2]. В целом, негативные процессы, протекающие при избыточном образовании в организме АФК, носят название окислительного стресса.

Необходимость регуляции содержания АФК привело к формированию комплексной стратегии с участием эндо- и экзогенных антиоксидантных агентов, к которым относят ферменты и другие вещества пептидной природы, витамины, а также ряд микроэлементов. Важнейшими представителями первой группы выступают ферменты, катализирующие реакции превращения АФК – супероксиддисмутазы (СОД), каталазы и глутатионпероксидазы [3]. Принцип действия СОД заключается в обеспечении дисмутации супероксиданиона в молекулярный кислород и перекись водорода. Последняя разлагается на воду и молекулярный кислород под действием каталазы. Роль глутатионпероксидазы заключается в восстановлении пероксида водорода или органических пероксидов до воды или спирта соответственно с участием восстановленной формы глутатиона (GSH). К витаминам с антиоксидантной активностью можно отнести бета-каротин, витамин А, аскорбиновую кислоту [4, 5]. Помимо витаминов к небелковым антиоксидантам относят альфа-липовую кислоту, проявляющую защитный эффект как в окисленной, так и восстановленной форме; коэнзим Q, который вследствие гидрофобности играет большую роль в защите мембран; мочевую кислоту, наряду с альбумином, выступающую основным антиоксидантом плазмы крови [3].

Несмотря на то, что окислительный стресс имеет отрицательное значение для всего организма в целом, сегодня выделяют ряд патологий, в развитии которых АФК выступает в качестве одного из спусковых механизмов. В частности, к ним относят нейродегенеративные заболевания (НДЗ). Это связано в том числе с тем, при сравнительно невысокой доле от массы тела (порядка 2 %) клетки центральной нервной системы потребляют около 20 % кислорода, 95 % которого в митохондриях (МХ) расходуется на дыхание, а 5 % – образование АФК [6]. В случае МХ источниками АФК могут служить электронтранспортная цепь (ЭТЦ), некоторые ферменты цикла Кребса (аконитаза, пируватдегидрогеназа и α -кетоглутаратдегидрогеназа), а также катализируемые моноаминоксидазой и цитохром-b5-редуктазой реакции [7]. Существенное увеличение содержания АФК в клетке может приводить к изменению митохондриального мембранного потенциала в

результате открывании Ca^{2+} -зависимой митохондриальной поры [8], что имеет место при болезни Паркинсона (БП) [9, 10], болезни Альцгеймера (БА) [11] и большого перечня других заболеваний [12]. Показано возникновение митохондриальной дисфункции при развитии заболеваний с накоплением аномально агрегированных белков – β -амилоида, тау-белка, α -синуклеина и гентингина при БП, БА, болезни двигательных нейронов и прионной болезни [13]. Следствием развития окислительных процессов является также активация поли (АДФ-рибоза)-полимеразы, участвующей в репарации ДНК, и соответствующее снижение пула митохондриального НАДН, что, в конечном счете, ведет к снижению скорости образования АТФ и потере нейрональной активности. Такой механизм был показан в случае развития БА [11], БП [14], а также при эксайтотоксичности [15, 16]. При развитии БП окислительный стресс может стать причиной снижения транспорта глюкозы в клетку и пула НАДН и, как следствие, уменьшения интенсивности окислительного фосфорилирования и образования АТФ [20-22]. При развитии прогрессирующего супрануклеарного паралича увеличение образования АФК и снижение продуцирования АТФ является причиной уменьшения способности мезенхимальных стволовых клеток к дифференцировке [23]. Влияние окислительного стресса при дисфункции МХ показано при развитии спорадической, а также семейной формы БАС. Во втором случае это связано с мутациями в гене митохондриальной супероксиддисмутазы и, следовательно, аномальным накоплением супероксиданиона [25].

Принципиальное значение АФК для развития НДЗ делает актуальной задачу по комплексной оценке окислительного стресса в тканях головного мозга, которая может быть решена при рассмотрении вопроса с двух позиций: 1) определения уровня АФК; 2) определения уровня антиоксидантной защиты. С учетом описанного выше многообразия АФК и нейтрализующих их веществ, экспериментальный анализ всех параметров может быть весьма трудоемким. Поэтому оправданным является подход по выбору нескольких параметров оценки окислительного стресса, имеющих наибольшее значение для рассматриваемой системы.

Первым в цепи АФК в результате утечки электронов с I и III комплексов ЭТЦ генерируется супероксиданион [1]. Его количество значительно зависит от активности дыхания и изменений парциального напряжения кислорода. В дальнейшем расходование супероксиданиона может происходить по нескольким направлениям с образованием различных АФК [2]. Митохондриальный глутатион (mGSH) выступает в качестве основной линии защиты для поддержания соответствующей митохондриальной окислительно-восстановительной среды, помогая избежать или восстановить окислительные модификации, приводящие к митохондриальной дисфункции и гибели клеток. Важность mGSH основана не только на его количестве, но и на универсальности за счет химического взаимодействия с синглетным кислородом, супероксиданионом и гидроксильным радикалом; стабилизации мембранной структуры перемещением ацилпероксидов, образующихся в результате перекисного окисления липидов (ПОЛ); выполнения роли кофермента ряда ферментов, активность которых основана на изменении редокс-потенциала глутатиона; обеспечения рециклирования аскорбиновой кислоты от окисленной до восстановленной формы с помощью фермента дегидроаскорбатредуктазы [26]. Интересно, что одним из самых ранних биохимических нарушений, наблюдаемых у пациентов с БП, является потеря общего уровня GSH, что может способствовать прогрессирующей гибели клеток. Было показано, что связанное с повреждением МХ, наблюдаемым у пациентов с БП, полное истощение GSH предшествует снижению как активности митохондриального комплекса I, так и уровня дофамина, что говорит о влиянии mGSH на эту патологию.

С нашей точки зрения, именно первичность супероксиданиона, а также весомый вклад GSH в антиоксидантную защиту клеток головного мозга могут объяснить их выбор его в качестве интегральных показателей содержания АФК и эндогенных антиоксидантов в исследуемой системе.

В настоящей работе была предпринята попытка по сравнительному комплексному анализу уровня окислительного стресса в отделах головного мозга крыс по параметрам скорости продукции супероксиданиона и содержания GSH. Для этого в качестве объектов исследования выступали срезы среднего мозга, коры, гиппокампа и мозжечка головного мозга крыс линии Wistar (самцы возрастом 2 месяца). Исследования соответствовали этическим нормам по гуманному обращению с животными и одобрены Этическим комитетом Орловского государственного университета имени И.С. Тургенева (протокол № 18 от 21.02.2020). Для обеспечения максимального сохранения функциональности все манипуляции со срезами осуществляли в охлажденном сбалансированном растворе солей Хенкса (HBSS).

Для оценки содержания GSH использовали флуоресцентный зонд monochlorobimane (mBCl), который в результате взаимодействия с GSH приобретает способность к флуоресценции (максимум поглощения – 394 нм, максимум флуоресценции – 490 нм). При проведении эксперимента срез выдерживали в течение 30 мин в HBSS, содержащим mBCl в концентрации 2 мкМ, после чего переносили в лунку предметного стекла, куда приливали свежий HBSS. В трех точках среза проводили фиксацию уровня флуоресценции с помощью установки, схема которой приведена на рисунке 1. Анализ результатов проводили с учетом прямопропорциональной зависимости между интенсивностью флуоресценции и содержанием GSH в образце.

Для оценки скорости продукции супероксиданиона использовали флуоресцентный зонд dihydroetidium (dHE), который при взаимодействии с супероксиданионом образует продукт, приобретающий в результате интеркаляции в ДНК способность к флуоресценции (максимум поглощения – 500 нм, максимум эмиссии – 590 нм). При выполнении эксперимента срез помещали в лунку предметного стекла, куда также приливали свежий

HBSS. С помощью установки, схема которой приведена на рисунке 1, в течение 3 мин проводили запись последовательности кадров с интервалом в 1 с для определения базового уровня флуоресценции. Затем в лунку вносили раствор dHE для обеспечения рабочей концентрации 300 мкМ и продолжали запись последовательности кадров в том же режиме в течение еще 3 мин. При обработке с помощью специального программного обеспечения были получены кривые изменения уровня флуоресценции, по которым определяли скорость прироста флуоресценции продукта окисления dHE, прямопропорциональную скорости образования супероксиданиона. Для расчета использовали начальный участок кривой возрастания флуоресценции, полученный в условиях избытка dHE в измерительной ячейке.

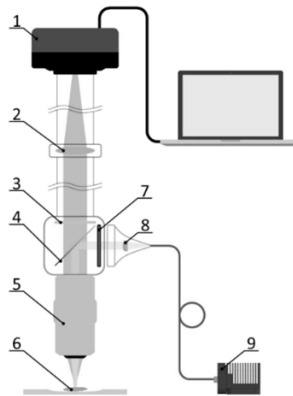


Рисунок 1 – Схема экспериментальной установки для измерения флуоресценции:

1 – ПЗС-камера 340M-USB; 2 – линза $f=200$ мм; 3 – длинноволновый светофильтр FGL455 для возбуждения на 365 нм либо FGL495 для возбуждения на 455 нм; 4 – дихроичный фильтр MD416 для возбуждения на 365 нм либо MD480 для возбуждения на 455 нм; 5 – планарный апохроматический объектив Mitutoyo M Plan APO 5X; 6 – образец; 7 – светофильтр MF445-45 для выделения полосы возбуждения на 455 нм; 8 – коллиматор Thorlabs CVH100-COL с линзой LB1945-A; 9 – источник излучения BDL-SMN-375 для регистрации флуоресценции продукта восстановления mBCl либо M455F1 для регистрации продукта окисления dHE

На рисунках 2 и 3 приведены результаты сравнительной оценки содержания GSH и скорости продукции супероксиданиона в срезах отделов головного мозга крыс.

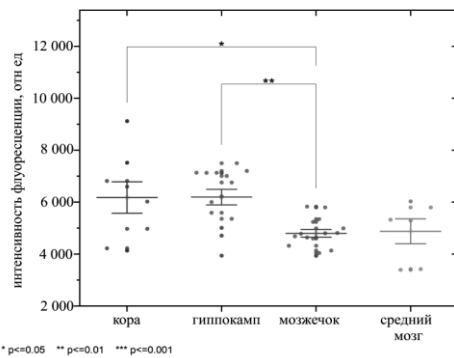


Рисунок 2 – Интенсивность флуоресценции продукта взаимодействия mBCl с GSH по отделам головного мозга крыс (значимость распределения оценивали по критерию Манна-Уитни)

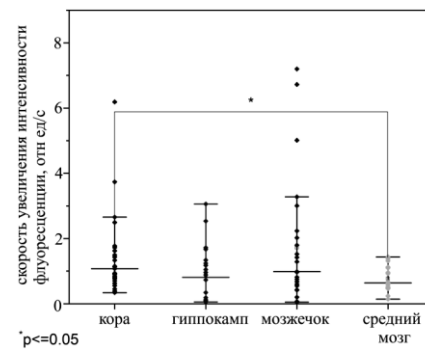


Рисунок 3 – Скорость увеличения флуоресценции продукта взаимодействия dHE с супероксиданионом по отделам головного мозга крыс

Как видно, соотношения двух рассматриваемых параметров в разных отделах головного мозга крыс различно. Если по содержанию GSH имеют место статистически значимые различия в парах «кора-мозжечок» и «гиппокамп-мозжечок» (рисунок 2), то в случае продукции супероксиданиона это отмечено только в паре «кора-средний мозг» (рисунок 3). Важно отметить, что при наибольшем уровне скорости продукции супероксиданиона в коре головного мозга отмечается и самое высокое содержание GSH. С другой стороны, наименьший уровень скорости продукции контролируемого АФК в среднем мозге наблюдается также при низком содержании эндогенного антиоксиданта. По нашему мнению, это не позволяет сделать выводы как о более высоком уровне окислительного стресса в коре головного мозга, так и о более низком – в среднем мозге, которые могли бы быть сформулированы только по результатам эксперимента с использованием dHE. Аналогичные соотношения по содержанию GSH позволяют говорить скорее о нормальном физиологическом состоянии исследуемых образцов, что можно было бы ожидать в случае исследованных в ходе эксперимента здоровых лабораторных животных.

Таким образом, совместное определение параметров содержания АФК (по скорости продукции супероксиданиона) и эндогенной антиоксидантной защиты (по содержанию GSH) позволяет проводить комплексный анализ уровня окислительного стресса в образцах мозга для цели выявления возможности развития обусловленных этим состоянием патологий.

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.

Библиографический список

1. Донцов В. И. Активные формы кислорода как система: значение в физиологии, патологии и естественном старении / В.И. Донцов и др. // Труды ИСА РАН. – 2006. – Т.19. – С. 50-65.
2. Пожилова Е.В. Активные формы кислорода в физиологии и патологии клетки / Е.В. Пожилова, В.Е. Новиков, О.С. Левченкова // Вестник Смоленской государственной медицинской академии. – 2015. – Т.14. – №2. – С. 13-22.
3. Endogenous Antioxidants: A Review of their Role in Oxidative Stress / Т. Aguilar, В. Navarro, J. Perez // InTech. – 2016. – P. 3-11.
4. Сергеев Ю. В. Принципы применения бета-каротина в дерматологии / Ю. В. Сергеев, М. О. Переверзев // Иммунопатология, аллергология, инфектология. – 2006. - №3. – С. 21-25.
5. Vitamins as Antioxidants / М. Manela-azulay [et al.] // Daily Routine in Cosmetic Dermatology. – 2016. – № 2. – P. 1-13.
6. Mechanism of neurodegeneration of neurons with mitochondrial DNA mutations / А. Y. Abramov [et al.] // Brain. – 2010. – №133. – P. 797-807.
7. Abramov A.Y. Three distinct mechanisms generate oxygen free radicals in neurons and contribute to cell death during anoxia and reoxygenation / А.Y. Abramov, А. Scorziello, M.R. Duchen // Journal of Neuroscience. – 2007. – №27. – P. 1129-1138.
8. Bernardi P. Mitochondrial transport of cations: Channels, exchangers, and permeability transition // Physiological Reviews. - 1999. – Vol.79,№4. – P. 1127-1146.
9. The mitochondrial permeability transition pore: Channel formation by F-ATP synthase, integration in signal transduction, and role in pathophysiology / P. Bernardi [et al.] // Physiological Reviews. – 2015. – №95. – 1111-1155.
10. Cozzolino M. Mitochondrial dysfunction in ALS / M. Cozzolino, M.T. Carri // Progress in Neurobiology. – 2012. – №97. – P. 54-66.
11. Abeti R. Beta-amyloid activates PARP causing astrocytic metabolic failure and neuronal death / R. Abeti, А. Abramov, M. Duchen // Brain. – 2011. – №134. – P. 1658-1672.
12. Mitochondrial hyperpolarization in iPSC-derived neurons from patients of FTDP-17 with 10+16 MAPT mutation leads to oxidative stress and neurodegeneration / N. Esteras [et al.] // Redox Biology. - 2017. – №12. – P. 410-422.
13. Vossius C. Parkinson's disease and nursing home placement: the economic impact of the need for care / C. Vossius, O.B. Nilsen, J.P. Larsen // European Journal of Neurology. – 2009. – №16. – P. 194-200.
14. PINK1-Associated Parkinson's Disease Is Caused by Neuronal Vulnerability to Calcium-Induced Cell Death / S. Gandhi [et al.] // Molecular Cell. – 2009. – №33. – P. 627-638.
15. Duan Y. Ca²⁺-dependent generation of mitochondrial reactive oxygen species serves as a signal for poly (ADP-ribose) polymerase-1 activation during glutamate excitotoxicity / Y. Duan, R.A. Gross, S. Sheu // The Journal of Physiology. – 2007. – №585. – P. 741-758.
16. Abramov A.Y. Mechanisms underlying the loss of mitochondrial membrane potential in glutamate excitotoxicity / A.Y. Abramov, M.R. Duchen // Biochimica et Biophysica Acta – Bioenergetics. - 2008. – №1777. – P. 953-964.
17. PINK1 cleavage at position A103 by the mitochondrial protease PARL / E. Deas [et al.] // Human Molecular Genetics. – 2011. – №20. – P. 867-879.
18. Cell metabolism affects selective vulnerability in PINK1-associated Parkinson's disease / Z. Yao [et al.] // Journal of Cell Science. – 2011. – №124. – P. 4194-4202.
19. Mitochondrial dysfunction in Parkinsonian mesenchymal stem cells impairs differentiation / P.R. Angelova [et al.] // Redox Biology. – 2018. – №14. – P. 474-484.
20. Esteras N. Nrf2 activation in the treatment of neurodegenerative diseases: A focus on its role in mitochondrial bioenergetics and function / N. Esteras, А.Т. Dinkova-Kostova, А.Y. Abramov // Biological Chemistry. – 2016. – №397. – P. 383-400.
21. Shibata N. Transgenic mouse model for familial amyotrophic lateral sclerosis with superoxide dismutase-1 mutation // Neuropathology. – 2001. – №21. – P. 82-92.
22. Толпыгина О. А. Роль глутатиона в системе антиоксидантной защиты (обзор) // Бюллетень ВШЦ СО РАМН. – 2012. - №2. – С. 178-180.

COMPREHENSIVE ASSESSMENT OF OXIDATIVE STRESS IN RAT BRAIN TISSUES BASED ON THE CONTENT OF REDUCED GLUTATHIONE AND THE RATE OF PRODUCTION OF REACTIVE OXYGEN SPECIES¹Tagunov P.A., ¹Mikenkina M.A., ¹Vinokurov A.Yu., ^{1,2}Abramov A.Yu.¹Orel State University named after I.S. Turgenev, Orel, pavel.tagunov@tuta.io,²UCL Queen Square Institute of Neurology, London, a.abramov@ucl.ac.uk

Key words: reactive oxygen species, endogenous antioxidants, oxidative stress, mitochondrial dysfunction

Annotation. Reactive oxygen species (ROS) have recently attracted the attention of scientists. Being necessary for the implementation of multiple biological processes at physiological concentrations of ROS in the conditions of overproduction can cause the development of a number of pathologies, among which a significant place is occupied by neurodegenerative diseases. The study of this relationship is possible only on the basis of a comprehensive assessment of the level of oxidative stress in brain tissues, including the determination of the rate of ROS production and the content of the endogenous antioxidant reduced glutathione.

ИССЛЕДОВАНИЕ СОДЕРЖАНИЯ МИТОХОНДРИАЛЬНЫХ ФОРМ НАДН В ТКАНЯХ ОТДЕЛОВ ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫС^{1*}Серёгина Е.С., ¹Волтов А.А., ¹Ветров И.А., ¹Шуплецов В.В., ¹Брянская Е.О., ^{1,2}Абрамов А.Ю.¹Лаборатория клеточной физиологии и патологии, ФГБОУ ВО «Орловский государственный университет имени И.С. Тургенева», г. Орел, *e.s.seryogina@gmail.com,²UCL Queen Square Institute of Neurology, London

Ключевые слова: митохондриальные формы НАДН, ткани головного мозга, модельные животные, оптическая визуализация, нейродегенеративные заболевания

Аннотация. На сегодняшний день нейродегенеративные заболевания (НДЗ) занимают одно из лидирующих мест среди заболеваний по всему миру и главной проблемой их ранней диагностики является сложность и необратимость процессов, которым подвержены нейрональные клетки в головном мозге после нарушения энергетического баланса дыхательной цепи митохондрий. Целью работы является изучение динамики изменения содержания митохондриальных форм НАДН в тканях различных отделов головного мозга. Результаты данной работы лягут в основу разработки путей восстановления параметров митохондриальной биоэнергетики для реализации ранней диагностики и лечения НДЗ.

На сегодняшний день нейродегенеративные заболевания (НДЗ) занимают одно из лидирующих мест среди заболеваний по всему миру. Данная патология приводит к значительным нарушениям в организме человека, которые в первую очередь сказываются на качестве жизни. Главной проблемой НДЗ является отсутствие ранней диагностики, из-за сложности и необратимости процессов, которым подвержены нейрональные клетки в головном мозге [1,2].

Известно, что развитие НДЗ обусловлено нарушением нормальной работы митохондрий. К основным проявлениям митохондриальной дисфункции относят снижение синтеза АТФ, продукцию активных форм кислорода, активизацию механизмов программированной гибели клетки, аутофагию и некрозоподобные изменения [3–5]. Следствием этих процессов являются подавление энергоемких процессов в нейронах, повреждение свободными радикалами мембранных структур клеток, гибель функциональных нервных клеток и др. К тому же, нарушения, вызванные НДЗ, снижают работоспособность отдельно взятых частей дыхательной цепи митохондрий. Так, комплекс I и комплекс II повреждаются при болезнях Паркинсона и Гентингтона, комплекс III – при болезнях Паркинсона и Альцгеймера, комплекс IV перестает полноценно функционировать при болезни Альцгеймера. Стоит отметить, что из-за нарушения работы одного комплекса происходит сбой работы всей дыхательной цепи.

Окисление НАДН комплексом I происходит на внутренней стороне мембраны, а в матриксе в результате цитратного цикла и β-окисления происходит восстановление НАД. В матриксе протекают восстановление O₂ и образование АТФ. Поскольку НАДН служит донором электронов и водорода, он переносит их мембранным белкам внутренней митохондриальной мембраны [6]. Эти электроны используются в производстве АТФ посредством окислительного фосфорилирования.

Клеточное соотношение НАД⁺/НАДН является ключевым параметром, который отражает общее окислительно-восстановительное состояние клеток. В связи с отсутствием подходящих методов изучения долгое время считалось, что основная функция молекулы НАД заключается в ее участии в клеточных процессах энергетического обмена. Но оказалось, что функции этой молекулы гораздо разнообразнее и затрагивают широкий спектр проблем. От соотношения НАД⁺/НАДН зависят многие важные клеточные процессы, в том числе клеточная смерть [7,8], экспрессия некоторых генов [9–11] и др. Другим немаловажным вопросом является транспорт НАД⁺ и НАДН между внутриклеточными компонентами. Внутренняя мембрана митохондрий непроницаема для обеих форм НАД, в то же время в клетке происходит их постоянный обмен