

Биоэнергетический анализ первичной нейрональной недостаточности

Чувствительный анализ для оценки митохондриальной дисфункции, характерной для болезни Паркинсона, Хантингтона и других нейродегенеративных заболеваний

ОБЛАСТИ ИССЛЕДОВАНИЯ

Нейродегенеративные заболевания, митохондриопатии

ТИП АНАЛИЗА

Функция митохондрий: оценка резервной дыхательной емкости в первичных нейронах и нейрональных препаратах *ex vivo*

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА

Окислительный стресс, митохондриальная дисфункция, резервная дыхательная емкость, синапсомы, митохондриальный мембранный потенциал

Митохондрии играют основную роль в удовлетворении потребностей нейрональных синапсов в энергии (АТФ). Митохондриальная дисфункция приводит к нарушению нейропластичности, нейрональной дегенерации и гибели клеток, и в настоящее время признается ключевым элементом нейродегенеративных заболеваний, в том числе болезней Альцгеймера (БА), Хантингтона (БХ), Паркинсона (БП) и деменции с тельцами Леви (ДТЛ).¹

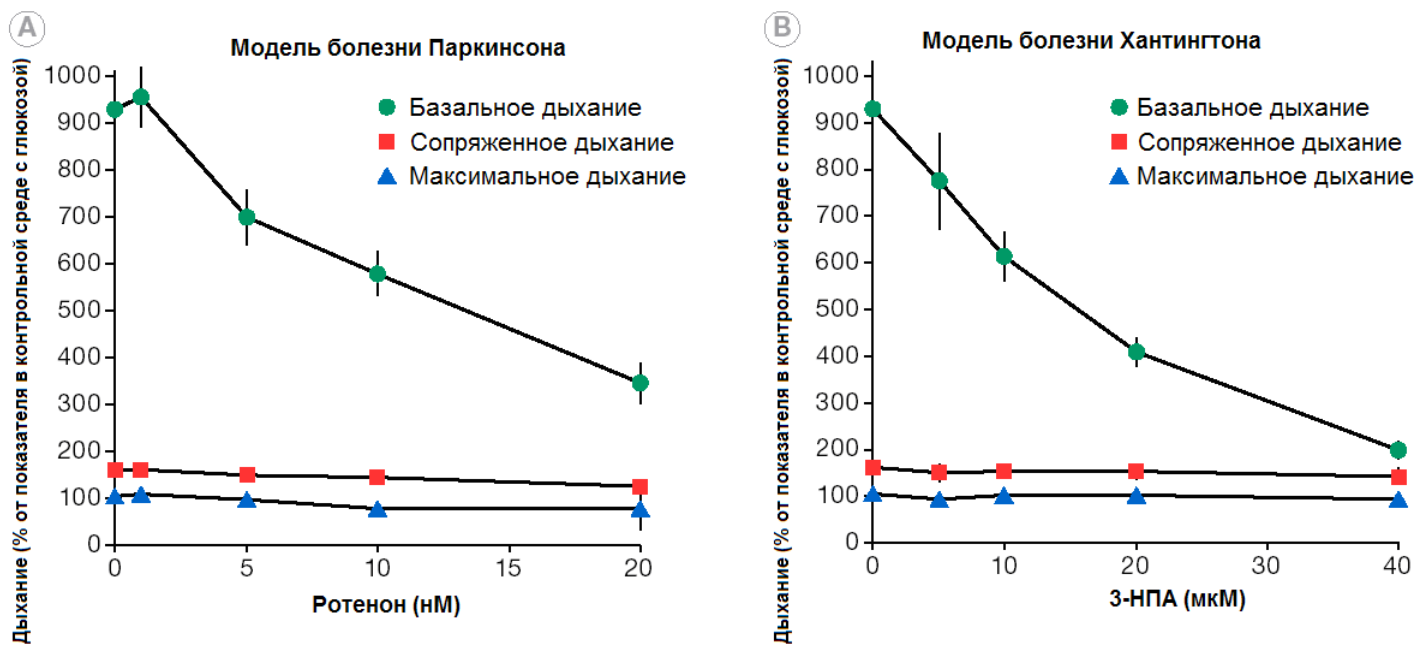
Разработка модельных систем для анализа, таких как первичные нейроны, изолированные митохондрии головного мозга и пресинаптические нервные окончания (синапсомы) определенных областей головного мозга, позволила выявить митохондриальные нарушения, связанные с нейродегенеративными заболеваниями. Синапсомы являются особенно важными модельными системами, поскольку в них сохраняются митохондриальная биоэнергетическая функция, возбудимость мембран и рецепторы, а также структуры, связанные с высвобождением и повторным поглощением нейромедиаторов, и синапсомы могут быть выделены у экспериментальных животных любого возраста. Однако потребность в относительно больших количествах синаптического белка для проведения стандартных анализов ограничивает проведение биоэнергетических анализов синапсов.

Choi с соавт., используя анализатор XF, способный обрабатывать образцы небольших размеров, проводил мониторинг показателей митохондриального дыхания синапсомом с использованием в 50 раз меньшего количества белка, чем это было возможно ранее.² Полученные результаты демонстрировали снижение резервной дыхательной емкости митохондрий в синапсомах с нарушением биоэнергетики, которые могут моделировать дефициты, характерные для БП и БХ. На рисунке 1 показано, что максимальное дыхание, в отличие от базального или сопряженного дыхания, является крайне чувствительным к очень небольшим концентрациям ротенона и 3-НПА, ингибиторам комплексов I и II, которые использовались для моделирования митохондриальной дисфункции, обнаруженной при болезнях Паркинсона и Хантингтона соответственно.

Choi с соавт. продолжил демонстрацию гетерогенного ответа в синапсомах, подверженных повышенному потреблению энергии, вместе с зависящим от времени снижением мембранного потенциала. Эти результаты показали, что различные субпопуляции синапсомом обладают разной восприимчивостью к биоэнергетической недостаточности в условиях повышенного потребления энергии.

Рисунок 1 | Резервная емкость синапсом чувствительна к небольшим изменениям концентрации ингибиторов комплексов I и II

Титрование базального, сопряженного (чувствительного к олигомицину) и максимального (стимулированного FCCP) дыхания с (А) ротеноном и (Б) 3-НПА. Синапсомы инкубировали в присутствии 15 мМ глюкозы + 10 мМ пирувата, и ингибиторы в указанных концентрациях добавляли в модель митохондриальной дисфункции, выявленной при болезни Паркинсона и Хантингтона соответственно. Скорости выражались относительно базального дыхания в среде, содержащей глюкозу без пирувата.



Результаты экспериментов свидетельствуют в поддержку применения анализатора XF в сочетании с измерениями мембранного потенциала для исследования синапсом, выделенных из определенных областей головного мозга животных моделей нейродегенеративных заболеваний человека.

Обсуждение

Ряд нейродегенеративных заболеваний человека связаны с митохондриальной дисфункцией, включая митохондриальную деполяризацию, расширение, ультраструктурные изменения и митохондриальную биоэнергетическую недостаточность. Разработка модельных систем, от препаратов синапсом до культивирования первичных нейронов, воспроизводящих указанные дефициты, возможно, может привести к выявлению новых лекарственных средств, действие которых направлено на определенные биоэнергетические процессы.

Gohil и соавт. недавно опубликовали исследование с использованием меклизина в качестве нейропротективного средства в моделях болезни Хантингтона. В предыдущей работе они демонстрировали способность меклизина изменять энергетический обмен от аэробного дыхания в сторону гликолиза. В данном наиболее современном исследовании был показан защитный эффект меклизина в отношении клеток полосатого тела мыши, экспрессирующих повышенное количество poryQ при болезни Хантингтона, обусловленный его способностью снижать митохондриальное дыхание. С помощью анализатора XF компании Seahorse авторы смогли продемонстрировать, что всего лишь 10%-ное снижение скорости потребления кислорода (СПК) приводит к почти 60%-ному увеличению жизнеспособности клеток STHdh^{Q111/111} 3.

Учитывая, что меклизин хорошо переносится и может назначаться для достижения небольшого ингибирования дыхания, существует возможность его использования для защиты нейронов в условиях *in vivo*.

В другом исследовании Yao с соавт. сравнивал митохондриальную функцию у самок тройных трансгенных мышей с болезнью Альцгеймера (3xTg-D) со здоровой группой контроля того же возраста с использованием

митохондриальных препаратов, выделенных из целого головного мозга. Данная трансгенная мышинная модель несет мутации в трех генах, связанных с БА и лобно-височной деменцией, и представляет собой возрастной нейропатологический фенотип, включающий отложение амилоида бета и тау гиперфосфорилирование. О дисфункции митохондрий головного мозга свидетельствуют ослабление митохондриального дыхания и снижение уровня белка пируватдегидрогеназы уже в 3-месячном возрасте. В митохондриях трансгенных мышей также наблюдалось усиление окислительного стресса, на что указывает повышение образования водорода и перекисного окисления липидов.⁴

Для определения роли клетки в митохондриальной недостаточности у данных мышей проводили оценку базального клеточного дыхания и гликолиза в культурах первичных нейронов гиппокампа у трансгенных (ТГ) и не-ТГ мышей. В нейронах гиппокампа трансгенных мышей наблюдалось значительно более низкое базальное и максимальное дыхание, свидетельствующее об ослаблении резервной дыхательной емкости данных нейронов, что может усиливать митохондриальную дисфункцию в условиях повышенного метаболического потребления. Аналогичным образом, в первичных нейронах мышей с БА отмечалось снижение базального дыхания и максимальной дыхательной емкости по сравнению с нейронами не-ТГ мышей. Исследователи показали, что митохондриальная дисфункция, особенно, приводящая к нарушению выработки энергии, предшествует образованию бляшек, а также установили, что головной мозг самки трансгенной мыши повторяет многочисленные показатели митохондриальной дисфункции, обнаруженной у людей с БА, включая снижение биоэнергетики, усиление окислительного стресса и увеличение амилоида в мышинных моделях БА.

В стендовом докладе L.H. Sanders⁵, недавно представленном на неврологической конференции в 2010 году, изучалась гипотеза о том, что повреждение ДНК возникает на ранних этапах гибели дофаминэргических клеток в черной субстанции, с использованием ротеноновой крысиной модели болезни Паркинсона. Исследователи проводили серии анализов XF, демонстрирующих, что сублетальное количество ротенона в равной степени подавляло дыхание в первичных мезэнцефальных и корковых нейронах. Данная сублетальная обработка ротеноном стимулировала избирательное повреждение ДНК ядер и митохондрий в черной субстанции *in vivo*. Эти результаты соответствуют модели, которая привела бы к образованию фенотипа БП на основании дисфункции комплекса I.

Данные исследования доказывают целесообразность применения анализатора XF для характеристики биохимических нарушений моделей нейродегенеративных заболеваний.

Материалы и методы

Синаптосомы и соединения: синаптосомы выделяли из коры головного мозга мышей CD1 в возрасте 17-21 дня методом гомогенизации в гомогенизаторе Даунса, далее центрифугировали в градиенте Перколл.² Для исследования биоэнергетики синаптосомальную область разводили в «ионной среде» (20 мМ HEPES, 10 мМ Д-глюкозы, 1,2 мМ Na₂HPO₄, 1 мМ MgCl₂, 5 мМ NaHCO₃, 5 мМ KCl, 140 мМ NaCl, pH 7,4). Синаптосомы центрифугировали в течение 15 минут при ускорении 15000g для удаления раствора перколл и ресуспендировали в ионной среде. Ротенон, олигомицин, 3-НПА и FCCP были получены у компании Sigma-Aldrich (Сент-Луис, штат Миссури, США).

Биоэнергетический анализ XF

Биоэнергетические анализы XF проводились с помощью анализатора внеклеточного потока XF (Seahorse Bioscience), полностью интегрированного, многолуночного прибора, измеряющего поглощение и выведение конечных продуктов метаболизма в режиме реального времени. Для проведения биоэнергетического анализа синаптосом использовали набор для анализа XF. Данный одноразовый набор для анализа содержит 24 или 96 твердотельных, двухфлуоресцентных биологических датчиков (O₂ и pH). Каждый датчик также оснащен 4 инъекционными портами в каждой лунке для доставки тестируемых препаратом в лунки во время проведения анализа.

Клеточные культуральные микропланшеты XF покрыты оптимизирующим процесс связывания полиэтиленимином (разбавление 50%-ного раствора в соотношении 1:1500). Аликвоты синаптосом (10 мкг белка, если не указано иное) распределяли в 20 лунок покрытого полиэтиленимином клеточного культурального микропланшета XF24, далее микропланшет центрифугировали в течение 1 часа при ускорении 3400g для обеспечения прикрепления агрегатов синаптосом, которые были достаточно прочными, чтобы выдержать условия механического перемешивания. Ионный раствор заменяли на «среду инкубации» (3,5 мМ KCl, 120 мМ NaCl, 1,3 мМ CaCl₂, 0,4 мМ

KH_2PO_4 , 1,2 мМ Na_2SO_4 , 2 мМ MgSO_4 , 15 мМ D-глюкозы, 4 мг/мл бычьего сывороточного альбумина, 37°C), и планшеты сразу использовали или хранили на льду в течение не более 3 часов.

Затем определяли скорость потребления кислорода (СПК) и скорость закисления. СПК измеряется в пмоль/мин, ECAR в мрН/мин.

Рисунок 2 | Схема проведения анализа XF



Ссылки

1. Swerdlow, R.H. *Mitochondrial Medicine and the Neurodegenerative Mitochondriopathies*. Pharmaceuticals 2009:2,150-167.
2. Choi, S.W., et al. *Bioenergetic analysis of isolated cerebrocortical nerve terminals on a microgram scale: spare respiratory capacity and stochastic mitochondrial failure*. J Neurochem. 2009:109, 1179-1191.
3. Gohil, V.M., et al. *Meclizine is neuroprotective in models of Huntington's disease*. HMG Advance Access published October 25, 2010.
4. Yao, J., et al. *Mitochondrial bioenergetic de_cit precedes Alzheimer's pathology in female mouse model of Alzheimer's disease*. PNAS: 106(34):14670-5. Epub 2009 August 10
5. Sanders, L H, et al. DNA Damage Precedes Cell Death In Rotenone Rat Model Of Parkinson's Disease. Neuroscience 2010, Poster 252, November 14, 2010, San Diego CA

Дополнительная литература

1. Bartesaghi, S., et al. *Loss of Thymidine kinase 2 alters neuronal bioenergetics and leads to neurodegeneration*. Hum Mol Genet. 2010:19(9):1669-77. Epub 2010 Feb 1.