

ВЛИЯНИЕ β -АМИЛОИДНОЙ НЕЙРОТОКСИЧНОСТИ НА ВНУТРИКЛЕТОЧНЫЙ КАЛЬЦИЙ В ТОКСИЧЕСКОЙ МОДЕЛИ БОЛЕЗНИ АЛЬЦГЕЙМЕРА IN VITRO

Стельмащук О.А.

Орловский государственный университет имени И.С. Тургенева, лаборатория клеточной физиологии и патологии, Орел, Российская Федерация

Актуальность

Митохондрия стала одной из первых внутриклеточных органелл, которая была связана с обработкой внутриклеточного Ca^{2+} [1]. Первые исследования по поглощению Ca^{2+} митохондриями предшествовали хемиосмотической теории, которая затем обеспечила термодинамическую основу для понимания быстрого накопления положительно заряженного иона, такого как Ca^{2+} , в матрице митохондрий [2].

Функциональные митохондрии имеют жизненно важное значение для выполнения своей ключевой роли в клетке по поддержанию энергетического обмена, буферизации сигнала Ca^{2+} и управлению механизмом гибели клеток. Выработку АТФ или запуск открытия mPTP и активацию каскада гибели клеток может стимулировать митохондриальный Ca^{2+} . Поступление Ca^{2+} в митохондрии в результате буферизации избыточного Ca^{2+} из цитозоля во время передачи сигналов играет ключевую роль в нейронах.

Повышенные уровни Ca^{2+} в митохондриях, связанные с отложением бляшек и гибелью нейронов, показаны в трансгенной мышинной модели церебрального β -амилоидоза. Природный секретлируемый растворимый β -амилоид, наносимый на здоровый мозг, увеличивал концентрацию Ca^{2+} в митохондриях. Также есть данные, что перегрузка митохондриальным кальцием (mCa^{2+}) способствует прогрессированию болезни Альцгеймера, способствуя образованию супероксида, метаболической дисфункции и гибели нейронов [3].

Материалы и методы

Исследования проводились с применением современных методов: флуоресцентной и конфокальной микроскопии с помощью лазерного сканирующего микроскопа LSM 900 с системой Airyscan 2 (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Германия). Объектом исследования была нейроглиальная культура, полученная от новорожденных самцов крыс линии Вистар. Для создания токсичной модели болезни Альцгеймера применяли короткий фрагмент нейротоксического пептида β -амилоида 25-35 (10 мкМ) и полного фрагмента β -амилоида 1-42 (1 мкМ) (Bachem, Switzerland). Первичную нейроглиальную культуру загружали в течение 30 мин при комнатной температуре 5 мкМ Fura-2 AM (Invitrogen by Thermo Fisher Scientific, США) в солевом растворе, забуференном HEPES (HBSS), содержащим (мМ): 156 NaCl, 3 KCl, 2MgSO₄, 1,25 KH₂PO₄, 2 CaCl₂, 10 глюкозы и 10 HEPES, pH доводили до 7,35 с помощью NaOH. Для одновременного измерения $[\text{Ca}^{2+}]_i$ и митохондриального мембранного потенциала $\Delta\Psi_m$ ($\Delta\Psi_m$) в культуры добавляли 1 мкМ Rh123 (Invitrogen by Thermo Fisher Scientific, США) в последние 15 мин периода загрузки Fura-2, а затем клетки промывали 3-5 раз перед экспериментом. Для оценки жизнеспособности клеток использовали метод двойного окрашивания красителями Hoechst 33342 (2 мкг/мл, 10 мин), который помечает ядра синим цветом, чтобы подсчитать общее количество из клеток, и Propidium Iodide (2 мкг/мл, 10 мин), который способен проникать только в поврежденные клетки и окрашивает ядро в красный цвет.

Результаты

Применение полного пептида β -амилоид 1-42 (1 мкМ) или короткого пептида β -амилоид 25-35 (5 мкМ) через 5-10 мин вызывало типичный для этих пептидов кальциевый сигнал в первичных астроцитах, но не в нейронах из той же смешанной культуры [4, 5]. одновременные измерения Fura-2 и мембранного

потенциала митохондрий ($\Delta\Psi_m$) с помощью родамина 123 показали глубокую и изменчивую по форме сигнала β A-индуцированную потерю $\Delta\Psi_m$ в астроцитах. β A-индуцированная деполяризация митохондрий зависит от избыточного производства реактивных форм кислорода и митохондриального поглощения кальция. 24-часовая инкубация нейронов и астроцитов смешанной культуры коры с 5 мкМ β -амилоида 25-35 вызывала значительное увеличение числа погибших клеток (с $20\pm 6\%$ в контроле, N=5; до $45\pm 8\%$, N=5; $p\leq 0.005$).

Выводы

Фармакологическая секвестрация митохондриального поглощения кальция как защита от β -амилоидной нейротоксичности может стать перспективным направлением защиты от гибели нейронов.

Работа выполнена при поддержке гранта Правительства Российской Федерации для государственной поддержки научных исследований, проводимых под руководством ведущих ученых в российских образовательных организациях высшего образования, научных учреждениях и государственных научных центрах Российской Федерации № 075-15-2022-1095.

Список литературы

1. Vasington F.D., Murphy J.V. Ca^{++} uptake by rat kidney mitochondria and its dependence on respiration and phosphorylation // J. Biol. Chem. ASBMB, 1962. Vol. 237, N 8. P. 2670–2677.
2. Mitchell P., Moyle J. Chemiosmotic hypothesis of oxidative phosphorylation // Nature. Nature Publishing Group, 1967. Vol. 213, N 5072. P. 137–139.
3. Calkins M.J. et al. Impaired mitochondrial biogenesis, defective axonal transport of mitochondria, abnormal mitochondrial dynamics and synaptic degeneration in a mouse model of Alzheimer's disease // Hum. Mol. Genet. 2011.
4. Abramov A.Y., Canevari L., Duchen M.R. β -Amyloid Peptides Induce Mitochondrial Dysfunction and Oxidative Stress in Astrocytes and Death of Neurons through Activation of NADPH Oxidase // J. Neurosci. 2004.
5. Abeti R., Abramov A.Y., Duchen M.R. β -amyloid activates PARP causing astrocytic metabolic failure and neuronal death // Brain. 2011.