

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 энергоёмких 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

между цитоплазмой и митохондриями.

Помимо всего выше сказанного, соотношение НАД⁺/НАДН регулирует работу митохондрий не только на уровне цикла трикарбоновых кислот и электрон-транспортной цепи, но и на уровне регуляции проницаемости митохондриальной мембраны [12]. В частности, НАДН может напрямую взаимодействовать и ингибировать некоторые потенциал зависимые анионные каналы, контролирующие транспорт некоторых анионов, регулируя тем самым активность всей органеллы [13,14]. Кроме того, соотношение НАД⁺/НАДН также является одним из важных факторов регуляции проницаемости митохондрий, критические изменения которой могут способствовать неспецифической проницаемости митохондрий [12,15]. Изменение проницаемости митохондриальной мембраны приводит к ее деполяризации, снижается синтез АТФ. На заключительной стадии из митохондрии происходит высвобождение апоптозиндуцирующего фактора и происходит гибель клетки [7,8].

Целью данной работы является изучение динамики изменения содержания митохондриальных форм НАДН при моделировании блокады дыхательной цепи в тканях различных отделов головного мозга крыс.

Для измерения содержания митохондриальных форм НАДН была собрана экспериментальная установка с лазерным источником BDL-SMN-375 (Becker&Hickl, Германия) для возбуждения флуоресценции НАДН на длине волны 375 нм. Схема установки представлена на рисунке 1. В данной системе излучение возбуждения через оптическое волокно проходит через коллиматор 5 и полосовой фильтр 4 (при использовании LEDM455F1), и далее, через светоделительный фильтр-пластинку 6 и объектив 8 направляется на исследуемую область. В канале флуоресцентной визуализации обратно-отраженное излучение источника проходит через светофильтры 6 и 3, и регистрируется высокочувствительной охлаждаемой CCD-камерой DCC 3260C (Thorlabs etc, США). Поле зрения камеры на образце составляет прямоугольный участок с площадью порядка 1 мм².

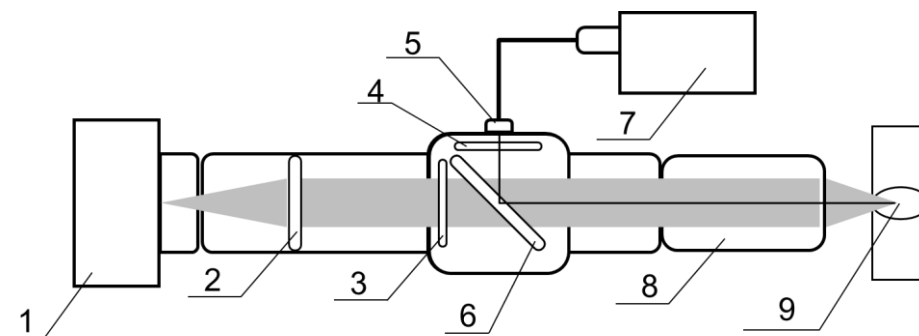


Рисунок 1– Схема экспериментальной установки для измерения эндогенной флуоресценции в острых срезах мозга: 1 – ПЗС-камера 340M-USB (Thorlabs etc, США); 2 – линза $f=200$ мм (Thorlabs etc, США); 3 – длинноволновый светофильтр FGL455 (Thorlabs etc, США); 4 – светофильтр MF445-45 (Thorlabs etc, США); 5 – коллиматор Thorlabs CVH100-COL (Thorlabs etc, США) с линзой LB1945-A; 6 – дихроичный фильтр MD416 (Thorlabs etc, США); 7 – источник излучения BDL-SMN-375 (Becker&Hickl, Germany); 8 – планарный апохроматический объектив Mitutoyo M Plan APO 5X (Thorlabs etc, США); 9 – образец

В качестве объекта исследования были выбраны препараты отделов головного мозга (кора, средний мозг, мозжечок, гиппокамп) самцов крыс линии Wistar ($n=2$, возраст 2 месяца). Вывод животного из эксперимента и все экспериментальные работы 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). Все процедуры по приготовлению препаратов проводились в строгом соответствии с температурным режимом и с использованием питательной среды Хенкса. После процедур приготовления, отдельный срез помещался на стекло с питательной средой, фиксировался и переносился в экспериментальную установку. Для измерения окислительно-восстановительный индекса, были использованы раствор FCCP (5 мкМ), для максимального увеличения дыхания и минимизации пула НАДН, и раствор NaCN (5 мМ), для блокировки митохондриального дыхания и максимального ответа при флуоресценции НАДН. Выбор воздействующих веществ обусловлен тем, что НАДН является донором электронов для комплекса I, и, следовательно, уровни НАДН обратно коррелируют с активностью дыхательной цепи. Проводилась запись последовательности кадров с интервалом 2 с. Первоначально регистрировался базовый уровень эндогенной флуоресценции в течении 1 минуты, затем добавление FCCP и NaCN с последующей регистрацией изменений в течении 3 минут после каждого воздействия.

Для оценки содержания митохондриальных форм НАДН, серии кадров с каждого среза были обработаны при помощи специального программного обеспечения с дальнейшей статистической обработкой. На каждом кадре выбиралось несколько точек и проводилась оценка динамики интенсивности флуоресценции в зависимости от времени путем построения графика, на котором указывались моменты времени добавления воздействующих веществ. Пример одного из графиков представлен на рисунке 2.

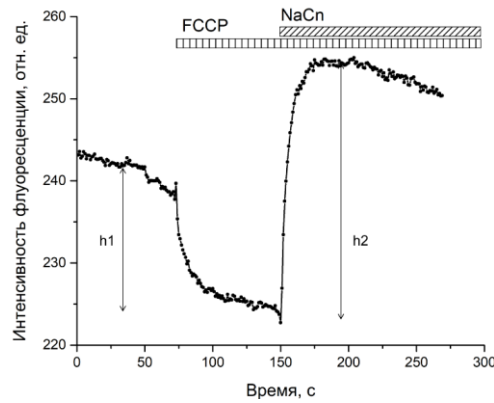


Рисунок 2 – Пример реакции среза на воздействие FCCP и NaCN

Из рисунка 2 можно заметить, что при добавлении FCCP происходит резкое снижение интенсивности флуоресценции НАДН до минимального значения, что вероятно свидетельствует о нарушении выработки АТФ митохондриями и, как следствие, об увеличении дыхания клеток. Величина $h1$ соответствует разнице флуоресценции между базовым тестом и минимальным значением после воздействия FCCP. При введении NaCN происходит обратный процесс – резкое увеличение интенсивности флуоресценции НАДН и блокировка дыхания, что ведет за собой выход на максимальный уровень флуоресценции, обусловленный переводом всего митохондриального пула кофермента в восстановленную форму. Величина $h2$ соответствует разнице флуоресценции между максимальным ответом после воздействия NaCN и минимальным значением после воздействия FCCP. Соотношение $h1/h2$ показывает долю восстановленного НАДН от общего количества кофермента, участвующего в метаболизме митохондрий.

Искомым параметром было выбрано соотношение $h1/h2$, при помощи статистического анализа была вычислена медиана выборки из серии результатов с каждого отдела головного мозга и ее процентное распределение. Значимость распределения оценивалась по критерию Манна-Уитни ($p < 0,05$ и $p < 0,01$). Диаграммы размаха представлены на рисунке 3.

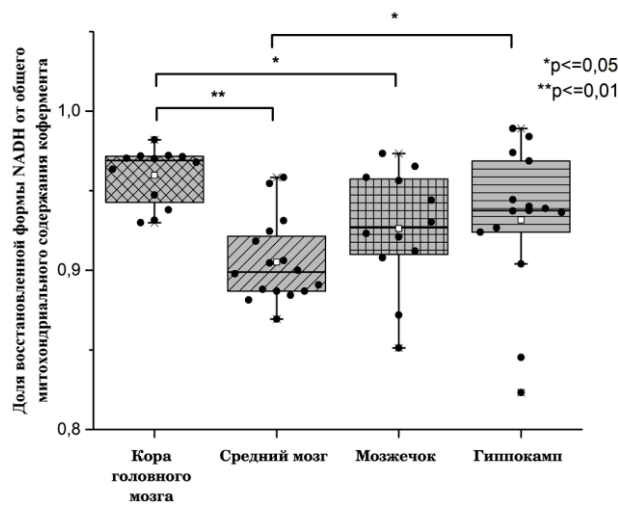


Рисунок 3 – Результаты статистической обработки измерений доли восстановленной формы НАДН от общего митохондриального содержания кофермента в разных отделах головного мозга крыс

Исходя из полученных данных видно, что в различных отделах мозга доля восстановленной формы НАДН от общего митохондриального содержания кофермента статистически различна. Этот анализ позволяет выявить, что соотношение $h1/h2$ у всех исследуемых отделов мозга близко к 1, что показывает способность к достижению первоначального базового уровня содержания метаболических коферментов и нормализации работы биоэнергетических механизмов клетки. Но, исходя из рисунка 3, заметно что кора и гиппокамп обладают большими ресурсами для быстрого достижения первоначального уровня флуоресценции коферментов. Напротив, исходя из экспериментальных исследований, соотношение $h1/h2$ для среднего мозга располагается ниже остальных, что свидетельствует о малой способности клеточных механизмов к восстановлению первоначального базового уровня и, следовательно, о высоком риске нарушения биоэнергетики митохондриальных клеток, что ведет за собой предрасположенности к возникновению НДЗ.

Таким образом, изучение ответной реакции на нарушение биоэнергетического баланса клеток, различных по своей структуре и положению в головном мозге, является перспективным для дальнейшего

развития методов ранней диагностики и терапии не только НДЗ, но и других заболеваний, связанных с нарушением энергетического обмена.

В дальнейшем, на основании полученных данных митохондриальных метаболических процессов посредством регистрации автофлуоресценции НАДН, предполагается разработка путей восстановления параметров биоэнергетики митохондрий до контрольных значений путем применения различных воздействий, способных защитить нейроны и индуцированные стволовые клетки.

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. Gao J. et al. Abnormalities of mitochondrial dynamics in neurodegenerative diseases // *Antioxidants*. 2017.
2. Manole A. et al. Clinical, pathological and functional characterization of riboflavin-responsive neuropathy // *Brain*. Department of Molecular Neuroscience and Neurogenetics Laboratory, UCL Institute of Neurology, Queen Square, London, WC1N 3BG, United Kingdom: Oxford University Press, 2017. Vol. 140, № 11. P. 2820–2837.
3. Keane P.C. et al. Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease // *Parkinson's Disease*. 2011.
4. Dolgacheva L.P. et al. Alpha-synuclein and mitochondrial dysfunction in Parkinson disease // *Biol. Membr.* Istitute of Cell Biophysics of Russian Academy of Sciences, ul. Institutskaya 3, Pushchino Moscow oblast, 142290, Russian Federation: Russian Academy of Sciences, 2017. Vol. 34, № 5. P. 4–14.
5. Agrawal M., Biswas A. Molecular diagnostics of neurodegenerative disorders // *Frontiers in Molecular Biosciences*. 2015.
6. Pollak N., Dölle C., Ziegler M. The power to reduce: Pyridine nucleotides - Small molecules with a multitude of functions // *Biochemical Journal*. 2007.
7. Alano C.C., Ying W., Swanson R.A. Poly(ADP-ribose) Polymerase-1-mediated Cell Death in Astrocytes Requires NAD⁺ Depletion and Mitochondrial Permeability Transition // *J. Biol. Chem*. 2004.
8. Alano C.C. et al. NAD⁺ depletion is necessary and sufficient for poly(ADP-ribose) polymerase-1-mediated neuronal death // *J. Neurosci*. 2010.
9. Ying W. NAD⁺/NADH and NADP⁺/NADPH in cellular functions and cell death: Regulation and biological consequences // *Antioxidants and Redox Signaling*. 2008.
10. Rutter J. et al. Regulation of crock and NPAS2 DNA binding by the redox state of NAD cofactors // *Science* (80-.). 2001.
11. Ziegler M. New functions of a long-known molecule: Emerging roles of NAD in cellular signaling // *European Journal of Biochemistry*. 2000.
12. Zoratti M., Szabò I. The mitochondrial permeability transition // *BBA - Rev. Biomembr*. 1995.
13. Green D.R., Kroemer G. The pathophysiology of mitochondrial cell death // *Science*. 2004.
14. Abeti R., Abramov A.Y. Mitochondrial Ca²⁺ in neurodegenerative disorders // *Pharmacol. Res.* Department of Molecular Neuroscience, UCL Institute of Neurology, London, United Kingdom: Academic Press, 2015. Vol. 99. P. 377–381.
15. Davidovic L. et al. Importance of poly(adp-ribose) glycohydrolase in the control of poly(adp-ribose) metabolism // *Exp. Cell Res*. 2001.

THE STUDY OF MITOCHONDRIAL NADH CONTENT IN RAT BRAIN TISSUES

^{1*}Seryogina E.S., ¹Voltov A.A., ¹Vetrov I.A., ¹Shupletsov V.V., ¹Bryanskaya E.O., ^{1,2}Abramov A.Yu.

¹ Cell Physiology & Pathology Laboratory, Orel state University named after I. S. Turgenev, Orel,

*e.s.seryogina@gmail.com,

² UCL Queen Square Institute of Neurology, London

Keywords: mitochondrial forms of NADH, brain tissue, model animals, optical visualization, neurodegenerative diseases

Annotation. Today, neurodegenerative diseases (NDZ) occupy one of the leading places among diseases around the world and the main problem of their early diagnosis is the complexity and irreversibility of the processes that affect neuronal cells in the brain after a violation of the energy balance of the respiratory chain of mitochondria. The aim of this work is to study the dynamics of changes in the content of mitochondrial forms of NADH in the tissues of various parts of the brain. The results of this work will form the basis for the development of ways to restore the parameters of mitochondrial bioenergetics for the implementation of early diagnosis and treatment of PD.

