

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ «ФЕДЕРАЛЬНЫЙ
ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР ИНСТИТУТ ЦИТОЛОГИИ И
ГЕНЕТИКИ СИБИРСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ РОССИЙСКОЙ
АКАДЕМИИ НАУК»

На правах рукописи

ТЮМЕНЦЕВ
Михаил Алексеевич

**АНАЛИЗ ВКЛАДА ДИСФУНКЦИИ МИТОХОНДРИЙ В
РАЗВИТИЕ ПРИЗНАКОВ БОЛЕЗНИ АЛЬЦГЕЙМЕРА У
КРЫС OXYS**

03.03.04 - Клеточная биология, цитология, гистология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
доктор биологических наук, профессор
Колосова Наталия Гориславовна

Новосибирск – 2018

Работа выполнена в лаборатории молекулярных механизмов старения Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», г. Новосибирск.

Научный руководитель:

Колосова Наталия Гориславовна

д.б.н., профессор, г.н.с., и.о. зав. лабораторией молекулярных механизмов старения ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики СО РАН», г. Новосибирск

Официальные оппоненты:

Айдагулова Светлана Владимировна

д.б.н. профессор, зав. лаб. клеточной биологии и фундаментальных основ репродукции ФГБОУ «Новосибирский государственный медицинский университет» г. Новосибирск

Сорокина Ирина Васильевна

д.б.н., в.н.с. лаб. фармакологических исследований ФГБУН «Новосибирский институт органической химии» СО РАН г. Новосибирск

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное научное учреждение Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича

Защита состоится «___» _____ 2018 г. в _____ на заседании диссертационного совета Д 003.011.01 на базе ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», в конференц-зале Института по адресу:

пр. академика Лаврентьева 10, г. Новосибирск, 630090.

тел. (383) 363-49-06 (1321); факс: (383) 333-12-78, e-mail: dissov@bionet.nsc.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ИЦиГ СО РАН и на сайте Института: <http://www.bionet.nsc.ru/>

Автореферат разослан «___» _____ 2018 г.

Ученый секретарь

диссертационного совета,
доктор биологических наук

Хлебодарова Т.М.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Болезнь Альцгеймера (БА) – самое распространенное нейродегенеративное заболевание, которое приводит к атрофическим изменениям мозга и деменции. Заболеваемость им растет с увеличением продолжительности жизни и старением населения, эффективных методов профилактики и лечения БА нет, что обусловлено неполнотой знаний патогенеза. Согласно доминирующей гипотезе «амилоидного каскада», центральным событием в патогенезе БА становится накопление нейротоксических форм пептида амилоида-бета (Аβ), приводящее к образованию амилоидных бляшек, гиперфосфорилированию тау-белка и формированию нейрофибриллярных клубков, синаптической недостаточности, гибели нейронов, воспалению, митохондриальной дисфункции и окислительному стрессу (Morley et al., 2012). Однако постепенно стало очевидным, что эта гипотеза оправдана только для ранней, наследственной формы БА (~5% случаев), а при поздней, спорадической форме заболевания, на которую приходится ~95% случаев, гиперпродукция Аβ становится вторичным событием. Как ключевой фактор, инициирующий развитие спорадической БА, рассматривается дисфункция митохондрий. Согласно гипотезе «митохондриального каскада» (Swerdlow, 2014), снижение синтеза АТФ и окислительный стресс приводят к чрезмерной продукции Аβ, который оказывает токсическое воздействие на митохондрии, усугубляя нейродегенеративные процессы.

Представление о том, что митохондрии играют ключевую роль в старении и развитии связанных с ним заболеваний, было впервые сформулировано Д. Харманом (Harman, 2009) в рамках гипотезы митохондриальной свободнорадикальной теории старения, согласно которой старение обусловлено накоплением повреждений, вызванным образованием активных форм кислорода (АФК). Однако в последние годы стало очевидным, что усиленная генерация АФК не является ни инициатором, ни основной причиной старения (Payne, Chinnery, 2015). Более того, эпизодическое усиление митохондриями генерации АФК, играющих важную регуляторную роль, вызывает изменения, способные увеличить продолжительность жизни организма (Ristow, Schmeisser, 2014). Также оказалось, что дисфункция митохондрий может способствовать старению независимо от образования АФК, что не только их метаболическая дисфункция, но и нарушения митохондриальной динамики и коммуникации с другими органеллами, в частности, с эндоплазматическим ретикулом, также способствуют старению. Таким образом, не вызывает сомнений связь патогенеза БА с дисфункцией митохондрий, однако её вклад в переход от «здорового» старения к развитию этого заболевания остается не ясным. Исследование этой проблемы у людей, особенно на доклиническом этапе, затруднено.

Доказано, что уникальной моделью спорадической формы БА является линия преждевременно стареющих крыс OXYS, у которых развиваются все ключевые признаки заболевания: деструктивные изменения нейронов и их гибель, синаптическая недостаточность, дисфункция митохондрий, гиперфосфорилирование тау-белка,

усиленное накопление A β 1-42 и образование амилоидных бляшек в мозге, нарушения поведения и снижение способности к обучению и памяти (Колосова и др., 2014; Stefanova et al., 2014-2016). Дисфункция митохондрий рассматривается как наиболее вероятная причина преждевременного старения крыс OXYS, однако механизмы её развития остаются неясными. Представляется актуальным оценить структурные изменения митохондрий крыс OXYS и их функциональную активность в период развития признаков БА, когда энергетическая недостаточность играет значительную роль и может быть основным событием, вызывающим проявление клинических симптомов. Один из подходов к изучению механизмов развития заболеваний - исследование эффектов препаратов, способных влиять на этот процесс. Их примером является митохондриальный антиоксидант пластохинонил-децил-трифенилфосфоний (SkQ1), способность которого подавлять развитие признаков БА у крыс OXYS доказана ранее.

Цель работы - исследовать пути нарушения функций митохондрий и их вклад в развитие и прогрессию признаков БА у крыс OXYS. Для ее достижения были поставлены следующие **задачи**:

1) В период, предшествующий развитию признаков БА (возраст 20 дней), в период их манифестации (возраст 4-5 мес.) и активной прогрессии (возраст 18-24 мес.) у крыс OXYS, используя крыс Вистар как контроль, исследовать

а) ультраструктуру митохондрий пирамидальных нейронов области CA1 гиппокампа;

б) уровни белков-маркеров слияния и деления митохондрий - митофузинов MFN1 и MFN2 и динамин-1-подобного белка DRP1;

в) активность комплексов I, IV и V дыхательной цепи в митохондриях гиппокампа и коры мозга;

г) генерацию АФК митохондриями мозга в различных метаболических состояниях, а также уровень белкового продукта гена митохондриального белка-разобщителя UCP2 - регулятора генерации АФК в гиппокампе и коре мозга.

2) Оценить связь нейропротекторных эффектов митохондриального антиоксиданта SkQ1 с его влиянием на ультраструктурные параметры митохондрий старых животных.

Научная новизна. Впервые охарактеризованы изменения количества и ультраструктуры митохондрий в нейронах гиппокампа крыс с периода завершения формирования мозга до старческого возраста. Доказано, что развитию признаков БА у крыс OXYS предшествуют структурно-функциональные изменения митохондрий гиппокампа: в доклинический период (возраст 20 дней) регистрируется снижение, по сравнению с крысами Вистар, активности дыхательной цепи, усилены генерация АФК и слияние, ведущее к образованию крупных митохондрий, а также появление митохондрий с характерным для пациентов с БА фенотипом – «митохондрий-на-нитке». Манифестация (возраст 4-5 мес.) и прогрессия (18-24 мес.) признаков БА у крыс OXYS протекают на фоне значительно сниженного количества митохондрий в нейронах гиппокампа, снижения активности дыхательной цепи, нарушения их ультраструктуры, митохондриальной динамики и коммуникации с эндоплазматическим ретикулумом (ЭПР) при отсутствии отличий от контрольных

крыс Вистар в уровне генерации АФК митохондриями мозга. Установлено, что активно накапливающийся в период активной прогрессии признаков БА в нейронах гиппокампа крыс OXYS бета-амилоид локализуется в мембранах митохондрий, их матриксе, а также в цитоплазме, ядре и отростках нейронов. Впервые показано, что способность митохондриального антиоксиданта SkQ1 смягчать проявления признаков БА у старых крыс OXYS на стадии значительных нейродегенеративных изменений связана с подавлением деструктивных изменений митохондриального аппарата в нейронах гиппокампа.

Теоретическая и практическая значимость. Получены убедительные аргументы в поддержку гипотезы «митохондриального каскада», согласно которой дисфункция митохондрий предшествует и способствует накоплению бета амилоида и развитию нейродегенеративных процессов при БА. Выявленные на крысах OXYS и Вистар эффекты SkQ1 демонстрируют определенную эффективность использования этого направленного в митохондрии антиоксиданта в профилактике старения мозга и развития характерных для БА нейродегенеративных процессов даже на стадии выраженных нейродегенеративных изменений.

Апробация результатов. По материалам диссертации опубликовано 4 статьи в журналах из перечня ВАК. Результаты работы были представлены на научных конференциях: «Механизмы регуляции функций органелл эукариотической клетки» (Иркутск, 2018), «Беляевские чтения, Международная конференция, посвященная 100-летию со дня рождения академика АН СССР Дмитрия Константиновича Беляева» (Новосибирск, 2017), «XXIII Съезд Физиологического общества им. И.П. Павлова» (Воронеж, 2017), «The 10th International conference on bioinformatics of genome regulation and structure – BGRS» (Новосибирск, 2016). Форум «Биомедицина-2016» (Новосибирск, 2016).

Вклад автора. Основные результаты получены автором самостоятельно. Автор принимал активное участие в планировании, проведении и обсуждении всех экспериментов, по результатам которых написана диссертация. Исследование активности комплексов дыхательной цепи митохондрий мозга и содержания белка UCP2 выполнено в рамках совместной работы с к.б.н. Н.А. Муралевой, содержания белков митохондриальной динамики - совместно с м.н.с. Ю.В. Румянцевой. Электронномикроскопические исследования проведены на базе ЦКП микроскопического анализа биологических объектов СО РАН.

Структура диссертации. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, результатов, обсуждения, заключения, выводов и списка цитируемой литературы (163 источника). Работа изложена на 105 страницах, содержит 21 рисунок, 1 таблицу.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Животные. Работа выполнена на базе ЦКП «Генофонды экспериментальных животных» ИЦиГ СО РАН на крысах-самцах линий OXYS и Вистар в возрасте от 20 дней до 24 мес. Эффекты SkQ1 приема (250 нмоль/кг массы тела ежедневно) оценивали на крысах OXYS и Вистар ($n = 5$ в каждой группе) при его приеме с возраста 19 до 24 мес. Эксперименты проводились в соответствии с принципами гуманности, изложенными в директивах Европейского сообщества (86/609/ЕЕС) и Хельсинкской декларации.

Электронная микроскопия. Гиппокамп и префронтальную кору фиксировали по стандартному протоколу (Morozova, Kiseleva 2006). Ультратонкие срезы зоны CA1 гиппокампа и III-V слои коры исследовали на электронном микроскопе JEM 100C (гиппокамп) и JEM 1400 (кора) (JEOL Ltd., Япония). На снимках пирамидных нейронов гиппокампа проводили оценку ультраструктуры митохондрий, подсчет количества и размера митохондрий, подсчет числа межмитохондриальных контактов, ядерно-митохондриальных контактов и контактов митохондрия-эндоплазматический ретикулум. На снимках нейропиля проводили подсчет «митохондрий-на-нитке» (MOAS).

Исследование внутриклеточной локализации A β проводили с помощью электронной микроскопии, используя первичные антитела к A β (Abcam, США) и вторичные антитела, конъюгированные с 10-нм наночастицами золота.

Измерение продукции АФК митохондриями, выделенными согласно (Rapunov, 2013) определяли, оценивая генерацию пероксида водорода, которую измеряли по скорости превращения Amplex Red в резорурфин в присутствии пероксидазы хрена (возбуждение/эмиссия 570/585 нм), используя различные комбинации субстратов дыхания. Митохондриальный белок определяли по Бредфорду.

Содержание белка UCP2 определяли в коре и гиппокампе с помощью набора ELISA Kit for Uncoupling Protein 2, Mitochondrial (UCP2) SEC586Ra (Cusabio, КНР) в соответствии с инструкциями производителя.

Выделение митохондриального белка. Образцы ткани помещали в буфер (320 мМ сахарозы; 1 мМ ЭДТА; 0,01 М TrisHCl, pH 7,4) в соотношении 1:10 с добавлением ингибиторов протеаз (Sigma-Aldrich) и гомогенизировали. Гомогенат центрифугировали при 800 x g - 10 мин, супернатант центрифугировали при 15000 g - 20 мин. Осадок (митохондриальная фракция) ресуспендировали в 120 мкл лизирующего буфера и инкубировали на льду 30 мин. Концентрацию белка определяли по Бредфорду. Образцы хранили при -70°C.

Вестерн-блот анализ белков митохондриальной динамики. Белки разделяли на полиакриламидном геле (10% разделяющий, 5% концентрирующий) в трис-глициновом буфере (25 мМ трис-HCl; 190 мМ глицин; 0,1% SDS). Перенос белков из геля на нитроцеллюлозную мембрану (Hybond-CExtra, Amersham) проводили в камере для «влажного» переноса. Мембраны инкубировали с первичными антителами к DRP1 (1:1000 Abcam, США), VDAC (1:1000), MFN 1 (1:1000) и MFN 2 (1:500). Использовали

вторичные антитела Goat Anti-Rabbit (1:5000) для MFN 1 и Sheep Anti-Mouse (1:5000) для остальных белков по стандартному протоколу. Хемифлуоресценцию детектировали с использованием рентгеновской плёнки. Интенсивность свечения оценивали с помощью программы ImageJ.

Ферментативную активность митохондриальных комплексов I, IV и V определяли наборами реактивов ab109721, ab109911 и ab109907 (Abcam, США) в соответствии с инструкциями изготовителя, используя объем митохондриальной фракции, эквивалентный 50 мкг общего белка. Активность ферментов исследовали на приборе CLARIO star (BMGLabtech, USA), результаты представляли как изменение абсорбции (550 нм) в минуту на мг белка.

Статистический анализ результатов проводили с помощью программы Statistica 10. Использовали факторный дисперсионный анализ (ANOVA) с post-hoc сравнениями групповых средних (Newman-Keuls test). Как независимые факторы рассматривали генотип, возраст, препарат. Данные представлены как среднее $\pm$ SEM. Результаты считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

1. Ультраструктура и количество митохондрий пирамидных нейронах гиппокампа крыс OXYS и Вистар разного возраста

Ультраструктура митохондрий позволяет оценивать их функциональное состояние на уровне отдельных клеток. Изменения с возрастом ультраструктуры и количества митохондрий изучали на популяции пирамидных нейронов поля CA1 гиппокампа крыс OXYS и Вистар в возрасте 20 дней, 5 и 24 мес. Удельное количество митохондрий (рис. 1А), отражающее их количество в отдельном нейроне, было меньше у крыс OXYS ($F_{1,188} = 7.4$, $p < 0,01$), у которых оно снижалось с возраста 20 дней к 5 мес. ($p < 0,04$) и сохранялось на этом уровне в возрасте 24 мес. При этом в 20 дней этот показатель у крыс OXYS и Вистар не различался, а в 5 мес. был в полтора раза ($p < 0,006$), а в 24 мес. – вдвое меньше, чем у крыс Вистар ($p < 0,01$).

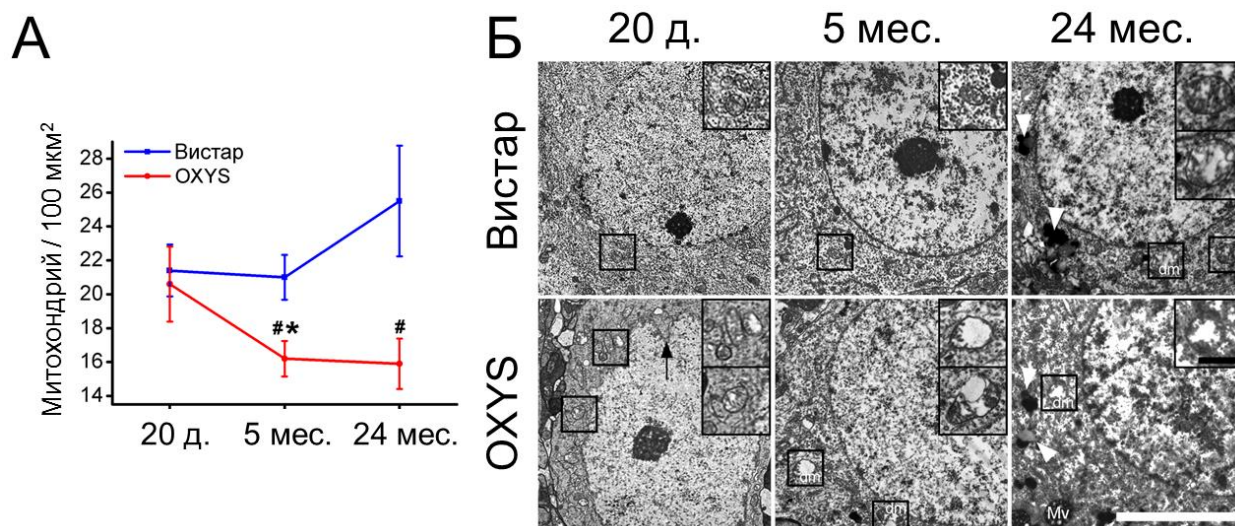


Рис. 1. Изменения с возрастом удельного количества митохондрий в нейронах гиппокампа крыс Вистар и OXYS (А). Репрезентативные фотографии участков

цитоплазмы пирамидных нейронов крыс Вистар и OXYS разного возраста и примеры митохондрий различной степени поврежденности (врезки) (Б). # - $p < 0,05$ по сравнению с крысами Вистар, * - $p < 0,05$ по сравнению с предыдущим возрастом. Бар – 5 мкм. dm – поврежденные митохондрии. Mv – мультивезикулярное тельце. Белые стрелки – липофусцин. Черная стрелка – вдавление поверхности ядерной мембраны.

Для количественной оценки изменений структурно-функционального состояния митохондрий оценивали удельное содержание неизменённых митохондрий, митохондрий с признаками умеренных деструктивных изменений (обводненный матрикс, частично фрагментированные кристы) и митохондрий с признаками выраженных деструктивных изменений (значительно обводненный матрикс с единичными кристами) (рис.2). Все эти показатели зависели от возраста ($F_{2,187} = 23.9$, $p < 0,0001$, $F_{2,187} = 21.2$, $p < 0,0001$ и $F_{2,187} = 9.26$, $p < 0,0002$, соответственно). Удельное содержание неизменённых митохондрий как у крыс Вистар, так и у OXYS в возрасте 24 мес. было меньше, чем в 5 мес. ($p < 0,004$ и $p < 0,001$, соответственно), а удельное содержание митохондрий с признаками умеренных изменений, напротив, больше ($p < 0,005$ и $p < 0,002$, соответственно). Важно отметить, что количество митохондрий с выраженными деструктивными изменениями к возрасту 24 мес. достоверно возросло только у крыс OXYS ($p < 0,013$).

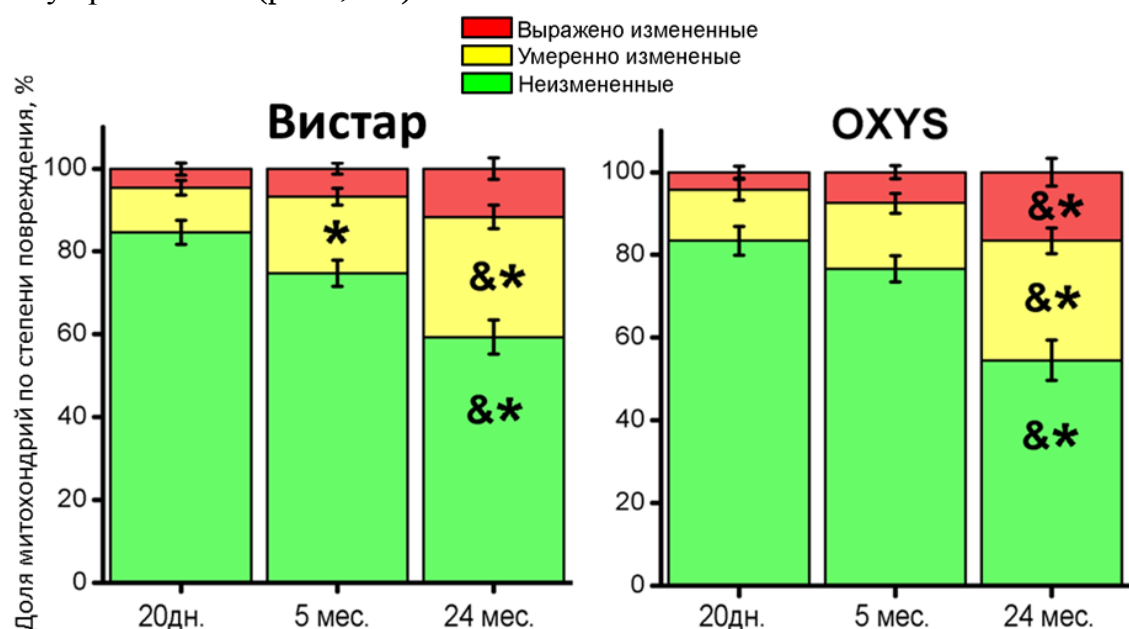


Рис. 2. Соотношения интактных, умеренно поврежденных и выраженно поврежденных митохондрий в нейронах поля CA1 гиппокампа крыс Вистар и OXYS разного возраста. # - $p < 0,05$ по сравнению с крысами Вистар, * - $p < 0,05$ по сравнению с предыдущим возрастом, & - $p < 0,05$ по сравнению с 20-ти дневными крысами одной линии.

Средняя площадь митохондрий (рис. 3) с возрастом ($F_{2,187} = 23.7$, $p < 0,0001$) увеличивалась у крыс обеих линий и не зависела от генотипа. Однако в возрасте 20 дней у крыс OXYS этот показатель был на 30% выше, чем у крыс Вистар ($0,26 \pm 0,02$ и $0,2 \pm 0,02$ мкм², соответственно, $p < 0,02$).

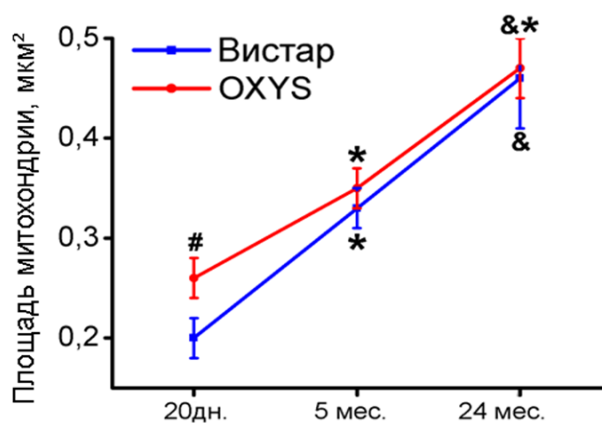


Рис. 3. Изменения с возрастом средней площади митохондрий в нейронах гиппокампа крыс Вистар и OXYS. Данные представлены как средний размер митохондрии в мкм². # - $p < 0,05$ по сравнению с крысами Вистар, * - $p < 0,05$ по сравнению с предыдущим возрастом, & - $p < 0,05$ по сравнению с 20-ти дневными крысами одной линии.

Митохондрии - основные источники АТФ в клетке, их колокализация с различными структурами указывает на усиленное потребление энергии этими структурами. Так, количество митохондрий, прилежащих к ядру, отражает его повышенную потребность в энергии. Количество контактов митохондрий с ядром (рис. 4) с возрастом росло и было у крыс OXYS в 5 мес. вдвое больше, чем у крыс Вистар ($p < 0,011$), что может указывать на повышенную потребность ядра в АТФ в период развития признаков БА. К возрасту 24 мес. их количество несколько повышалось и у крыс Вистар, в результате межлинейные различия нивелировались.

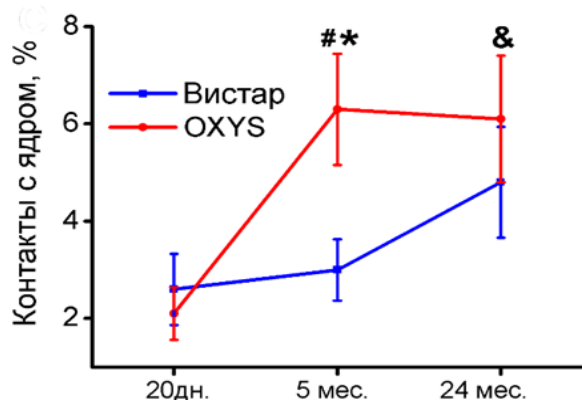


Рис. 4. Изменения с возрастом доли митохондрий, контактирующих с ядром, в нейронах гиппокампа крыс Вистар и OXYS. # - $p < 0,05$ по сравнению с крысами Вистар, * - $p < 0,05$ по сравнению с предыдущим возрастом, & - $p < 0,05$ по сравнению с 20-ти дневными крысами одной линии.

Известно, что с возрастом и при развитии ряда нейродегенеративных заболеваний снижается количество устойчивых к митофагии и снижению трансмембранного потенциала протяженных митохондрий, образование которых зависит от активности процессов слияния. С возрастом их удельное количество снижалось в нейронах гиппокампа крыс Вистар и OXYS, межлинейных различий выявлено не было (рис. 5).

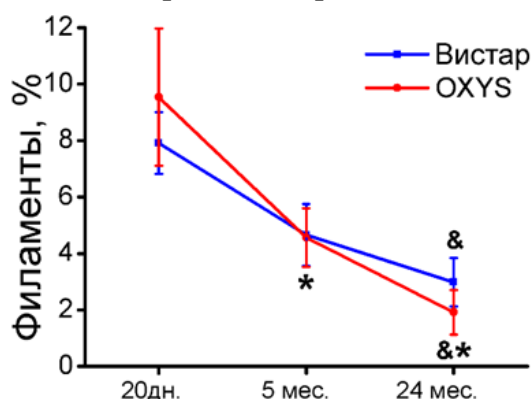


Рис. 5. Изменения доли протяженных митохондрий в нейронах гиппокампа крыс Вистар и OXYS с возрастом. * - $p < 0,05$ по сравнению с предыдущим возрастом, & - $p < 0,05$ по сравнению с 20-ти дневными крысами той же линии.

2. Изменения митохондриальной динамики в нейронах гиппокампа крыс OXYS и Вистар с возрастом

События митохондриальной динамики на ультраструктурном уровне наблюдаются как непосредственные контакты двух митохондрий (рис. 6 Б), встречаемость которых (рис. 6 А) отражает интенсивность процессов митохондриальной динамики в клетке. В возрасте 20 дней межлинейные различия по этому показателю в нейронах гиппокампа отсутствовали, в возрасте 5 мес. количество митохондриальных контактов у крыс OXYS было меньше, чем у Вистар ($p < 0,002$). К возрасту 24 мес. различия становились двукратными на фоне некоторого увеличения этого параметра у крыс Вистар (7.8 ± 1.6 и 14.2 ± 2.1 соответственно, $p < 0,001$).

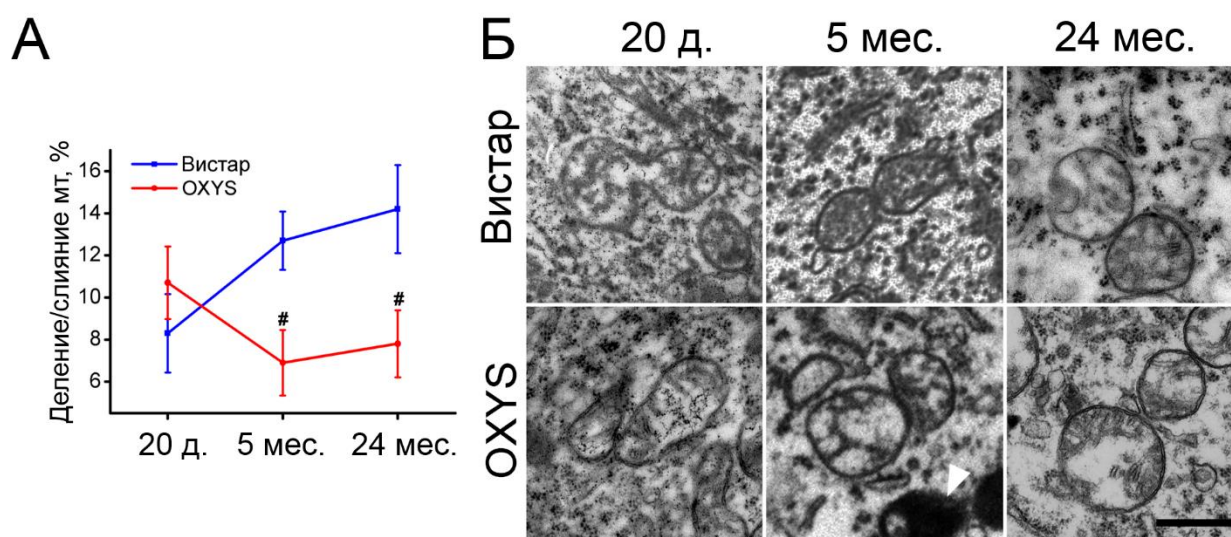
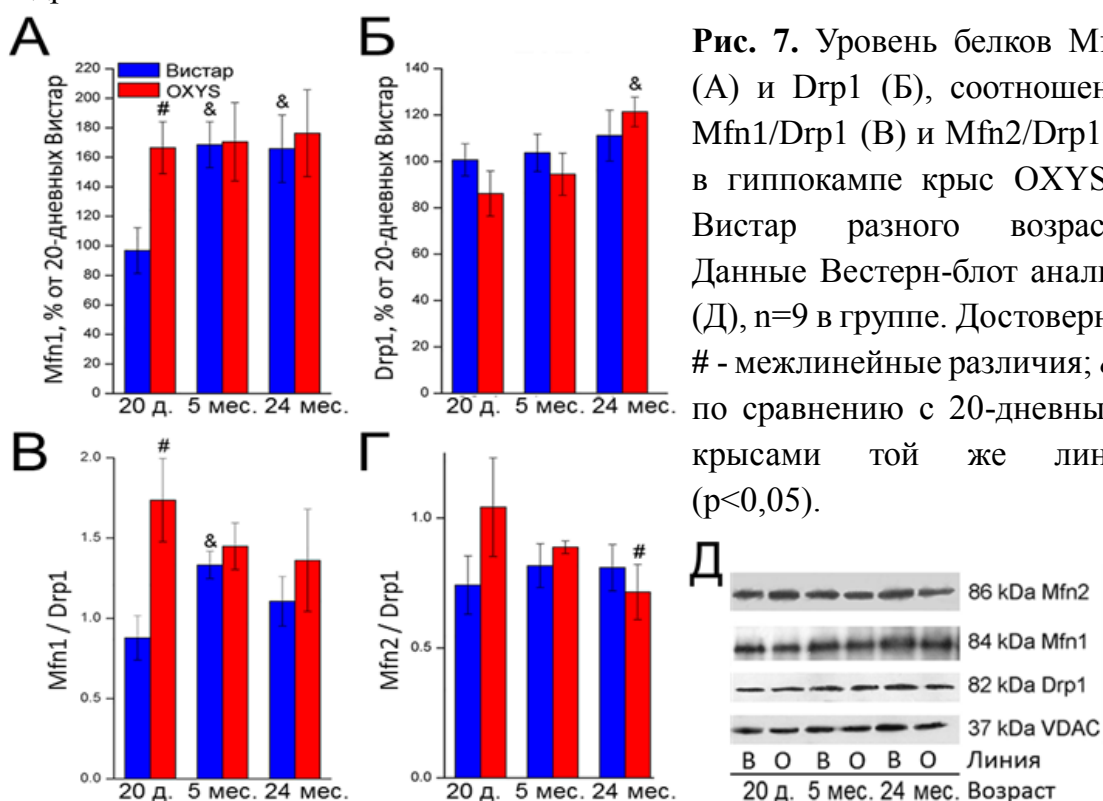


Рис. 6. Изменения с возрастом доли митохондрий, участвующих в межмитохондриальных контактах в нейронах гиппокампа крыс Вистар и OXYS (А). Репрезентативные фотографии митохондрий, участвующих в процессах митохондриальной динамики (Б). Данные представлены как процентное отношение количества митохондрий, участвующих в образовании контактов, к общему количеству митохондрий нейрона. # - $p < 0,05$ по сравнению с одновозрастными крысами Вистар. Бар – 500 нм. Белая стрелка – липофусцин.

Далее оценивали в гиппокампе изменения с возрастом уровня белков, участвующих в слиянии и делении митохондрий - MFN1, MFN2 и DRP1 (рис. 7 Д). У 20-дневных крыс OXYS уровень MFN1 в гиппокампе был выше чем у крыс Вистар ($p < 0,02$; рис. 7 А), что в комплексе с выявленным у них увеличением средней площади среза митохондрий может отражать активизацию процесса слияния. На повышение активности этого процесса у 20-дневных крыс OXYS указывает и увеличение по сравнению с одновозрастными крысами Вистар соотношения уровней белков MFN1/DRP1 ($F_{1,34} = 6.6$, $p < 0,02$; рис. 7 В), отражающего баланс между слиянием и делением митохондрий. С возрастом уровень MFN1 повышался только у крыс Вистар ($p < 0,03$), также как и соотношение MFN1/DRP1 ($p < 0,02$). У крыс OXYS, напротив, выросло содержание DRP1 ($p < 0,05$; рис. 7 Б), в то время как соотношение MFN2/DRP1

снижалось ($p < 0,05$; рис. 7 Г), что отражает увеличение активности деления митохондрий.



Как признак нарушения процессов митохондриальной динамики мы рассматриваем увеличение в отростках нейронов коры мозга крыс ОХУС количества митохондрий с необычным фенотипом - “митохондрий на нитке” (“mitochondria-on-a-string”, MOAS, рис. 8), который недавно Zhang и соавт. (2016) обнаружили в нейронах мозга пациентов с БА и мышей - моделей БА и связали с незавершенным делением. Удельное количество MOAS в нейропиле с возрастом не менялось и было повышено у крыс ОХУС ($F_{1,407} = 6,51$, $p < 0,02$), наиболее существенно, в 8 раз, в 20 дней ($p < 0,02$). При этом доля содержащих MOAS отростков нейронов у крыс Вистар с возраста 20 дней до 18 мес. выросла с 1,7 до 8,3%, а у ОХУС - несущественно, поскольку уже в 20 дней достигала 13,9%, а в 18 мес. составила 16% и была вдвое больше, чем у крыс Вистар. Рост количества MOAS в отростках нейронов крыс ОХУС может быть связан с нарушением деления протяженных митохондрий на округлые органеллы, что затрудняет их аксональный транспорт. У крыс Вистар количество протяженных митохондрий, рассчитанное на один отросток, с возрастом не менялось, а у крыс ОХУС – снижалось и было в возрасте 5 мес. в 1,8 раз ($p < 0,036$), а в 12 и 18 мес. – в 3 и 2,4 раза меньше, чем в 20 дней ($p < 0,005$ и $p < 0,011$, соответственно). При этом доля протяженных митохондрий – их процент от общего количества митохондрий нейропиля – у крыс ОХУС с возраста 20 дней к 12 мес. снижалась вдвое ($p < 0,002$), а доля округлых митохондрий не менялась, как и суммарное количество митохондрий всех морфологических классов.

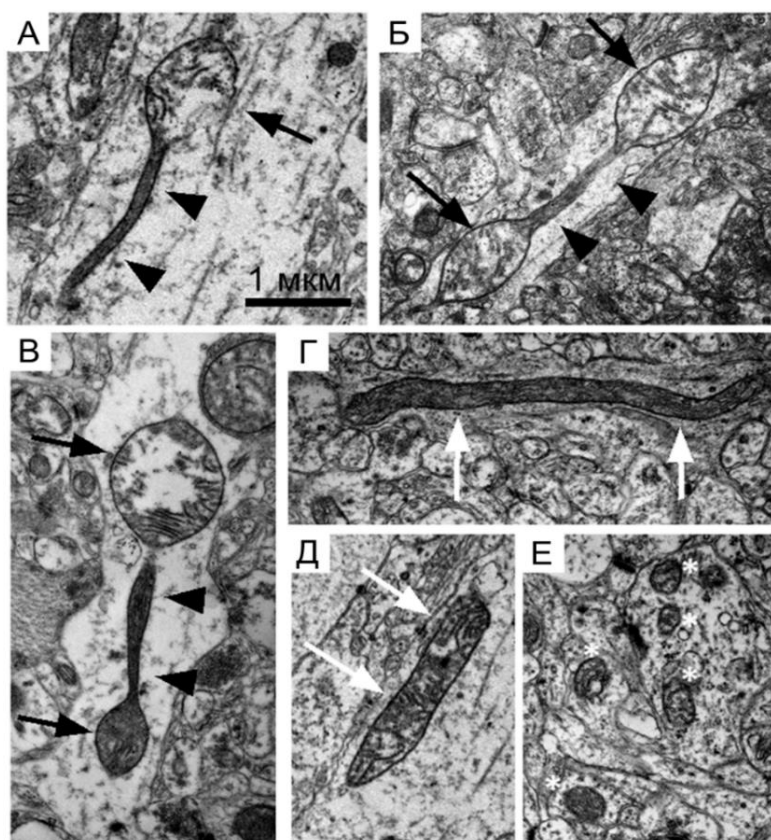


Рис. 8. MOAS в отростках нейронов крыс OXYS (А-В) представлены округлыми сегментами (черные стрелки), соединенными тонкими участками длиной порядка 1 мкм (короткие черные стрелки). Протяженные митохондрии (белые стрелки), встречающихся в отростках крыс Вистар (Г) и OXYS (Д). Отдельные округлые митохондрии (белые звездочки) составляют большинство митохондрий нейропиля мозга (Е). Бар 1 мкм.

Образование мембранных контактов между митохондриями и ЭПР является основным механизмом молекулярного взаимодействия между митохондриями и остальными системами клетки (Rowland, Voeltz, 2012). В возрасте 5 мес. количество контактов митохондрий с ЭПР (Рис. 9 А) у крыс OXYS было в 1,5 раза больше, чем у одновозрастных Вистар ($p < 0,002$). С возрастом у крыс OXYS этот параметр снизился вдвое ($p < 0,001$) и в 24 мес. был ниже чем у одновозрастных крыс Вистар ($p < 0,001$). У крыс Вистар этот параметр увеличивался только к возрасту 24 мес. ($p < 0,01$) и приближался к значению, зарегистрированному у пятимесячных крыс OXYS.

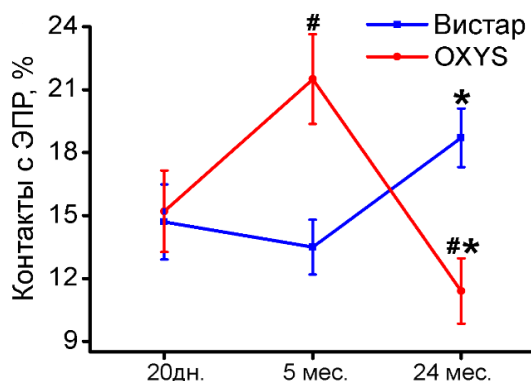


Рис. 9. Изменения с возрастом доли митохондрий, контактирующих с ЭПР, в нейронах гиппокампа крыс Вистар и OXYS. # - $p < 0,05$ по сравнению с крысами Вистар, * - $p < 0,05$ по сравнению с предыдущим возрастом.

3. Локализация мономерных форм Аβ в мозге крыс OXYS

Токсичность Аβ для митохондрий показана как в экспериментах с выделенными митохондриями, так и на моделях БА – трансгенных животных и культурах клеток. Но только недавно на клеточных линиях было доказано (Schaefer et al., 2016), что именно Аβ, а не APP является основным токсическим продуктом, а для реализации токсических эффектов важна его локализация в митохондриях. Исследование

локализации А β в нейронах поля СА1 гиппокампа крыс OXYS в период активной прогрессии признаков БА (10 мес.) методом иммуногистохимии с помощью меченных наночастицами золота антител показало, что А β присутствует как в мембранах митохондрий и их матриксе, так и в цитоплазме и ядре нейронов, а также их отростках (Рис. 10).

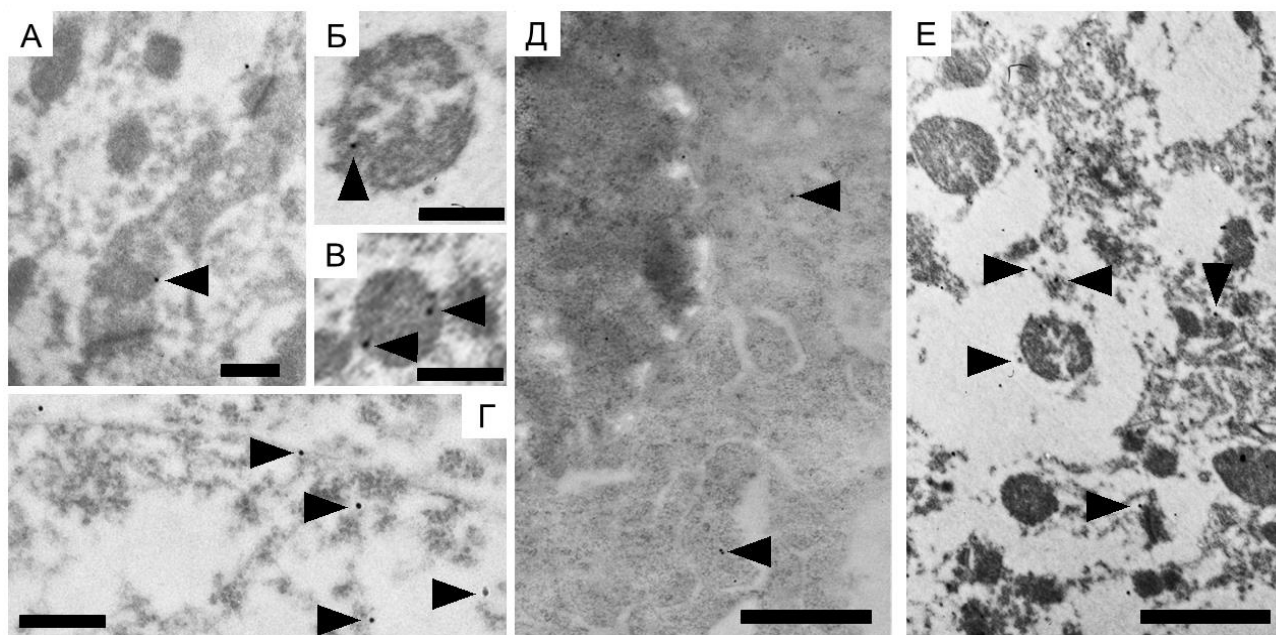


Рис. 10. Растворимые формы А β (черные стрелки) определяются в митохондриях (А-В), ядре (Г), цитоплазме нейронов (Д) и нейропиле (Е) крыс OXYS в возрасте 10 месяцев. Бары 300 нм (А-В), 1 мкм (Г-Е).

4. Генерация АФК митохондриями мозга крыс разного возраста

Генерацию АФК выделенными митохондриями мозга крыс Вистар и OXYS исследовали в возрасте 20 дней, 3 и 24 мес. при окислении ими различных субстратов: пирувата, глутамата, сукцината, малата. Только в возрасте 20 дней и при окислении одной комбинации субстратов (пируват+малат) скорость образования АФК митохондриями мозга крыс OXYS была достоверно выше, чем у крыс Вистар (рис. 11 А). Малат не является полноценным субстратом окисления, но необходим для «замыкания» цикла Кребса. Пируват является NADH-зависимым субстратом, то есть электроны, высвобождаемые при окислении пирувата, поступают на комплекс 1 цепи переноса электронов. Это позволяет заключить, что именно этот комплекс дыхательной цепи митохондрий 20-дневных крыс OXYS усиленно генерирует АФК.

В возрасте 3 мес., когда у крыс OXYS проявляются фенотипические признаки БА, и в возрасте 24 мес., когда они ярко выражены, различий в скорости образования АФК выявлено не было (Рис. 11 Б, В). Мы предположили, что митохондрии крыс OXYS могут находиться в состоянии «мягкого разобщения», благодаря которому достигается значительное снижение образования АФК. Считается, что основную роль в таком снижении трансмембранного потенциала играют белки-разобщители, в частности, белок UCP2.

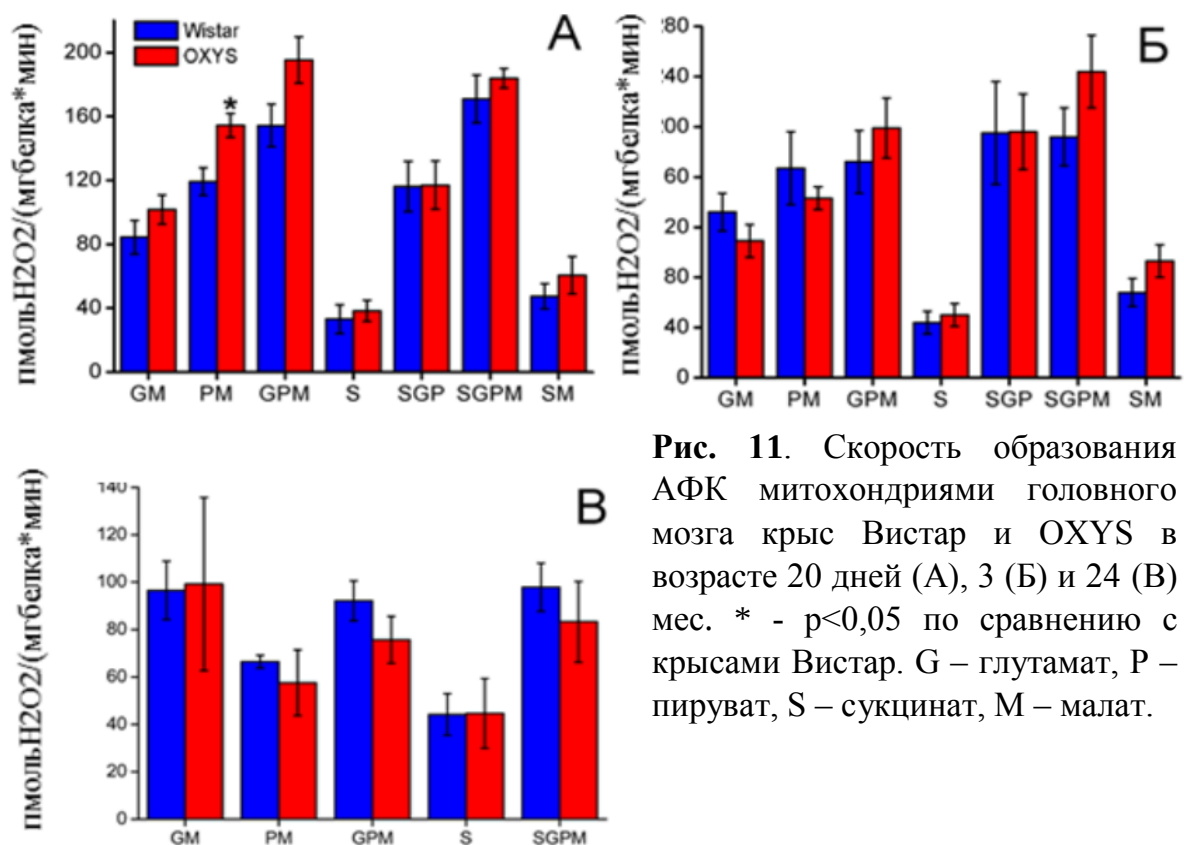


Рис. 11. Скорость образования АФК митохондриями головного мозга крыс Вистар и OXYS в возрасте 20 дней (А), 3 (Б) и 24 (В) мес. * - $p < 0,05$ по сравнению с крысами Вистар. G – глутамат, P – пируват, S – сукцинат, М – малат.

5. Содержание белка UCP2 в мозге крыс OXYS и Вистар разного возраста

Содержание белка UCP2 (Таблица 1) с возрастом изменялось как в гиппокампе ($F_{2,25} = 61$, $p < 0,001$), так и в коре мозга ($F_{2,30} = 59$, $p < 0,001$) крыс обеих линий. С возраста 20 дней к возрасту 3 мес. оно возрастало у крыс Вистар и OXYS втрое в коре ($p < 0,001$ и $p < 0,001$, соответственно) и гиппокампе ($p < 0,001$ и $p < 0,03$). У крыс обеих линий в возрасте 24 мес. содержание UCP2 в гиппокампе было выше, чем в 3 мес. ($p < 0,001$), в то время как в коре мозга с возраста 3 до 24 мес. значимо не изменялось. При этом его содержание было несколько ниже, чем у крыс Вистар (на уровне тенденции) в коре 3-месячных ($p = 0,065$) и гиппокампе 24-месячных ($p = 0,058$) крыс OXYS. Однако существенное снижение биомассы митохондрий позволяет предполагать, что и при отсутствии межлинейных различий в уровне UCP2, содержание этого белка на одну митохондрию у крыс OXYS может быть повышенным.

Таблица 1. Содержание белка UCP2 в гиппокампе и коре мозга крыс OXYS и Вистар разного возраста. Данные представлены в нг UCP2/мг белка.

	Гиппокамп		Кора	
Возраст	Вистар	OXYS	Вистар	OXYS
20 дн.	0.91±0.27	1.03±0.49	2.57±0.28	2.55±0.58
3 мес.	2.75±1.1 [#]	2.7±0.4 [#]	9.16±0.57 [#]	7.58±0.51 [#]
24 мес.	6.75±0.6 [#]	4.91±0.45 [#]	8.89±1.03	8.98±0.67

[#] - достоверные изменения с возрастом ($p < 0,05$)

Активность комплексов дыхательной цепи митохондрий гиппокампа крыс Вистар и OXYS. Активность комплексов дыхательной цепи митохондрий позволяет оценить эффективность синтеза АТФ, снижение которой рассматривается как один из ключевых признаков БА. Далее оценивали изменения с возрастом активности комплексов I, IV и V дыхательной цепи в митохондриях, выделенных из гиппокампа и коры мозга крыс Вистар и OXYS.

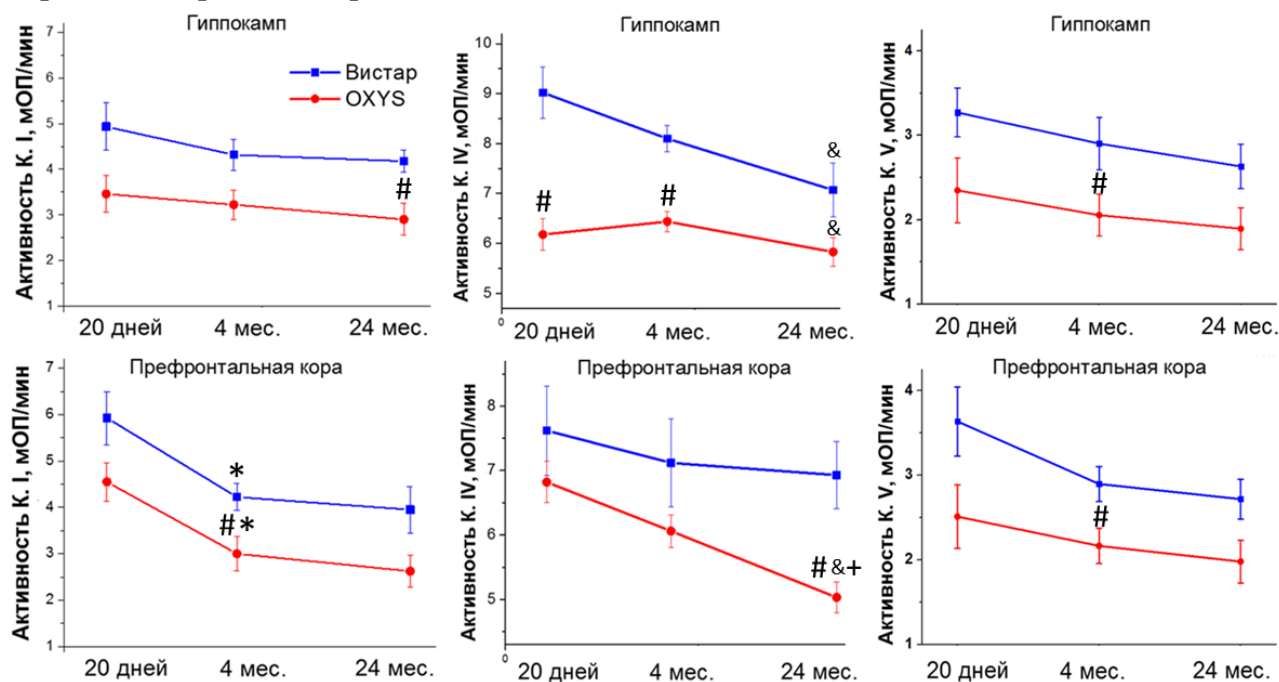


Рис. 12. Изменения с возрастом активности I, IV и V комплексов электрон-транспортной цепи митохондрий в коре и гиппокампе крыс Вистар и OXYS. ОП – оптическая плотность; К. I – V - комплексы дыхательной цепи. Достоверны различия: # - межлинейные; * - по сравнению с предыдущим возрастом; & - $p < 0,05$ по сравнению с 20-ти дневными крысами одной линии; + - $p < 0,05$ по сравнению между 4- и 24-месячными крысами одной линии.

Согласно дисперсионному анализу, активность комплекса I (рис. 12) не зависела от возраста ($F_{2,23} = 1.6$, $p = 0.23$) и была ниже у крыс OXYS ($F_{1,23} = 17.4$, $p < 0,001$). При этом при парных сравнениях только в возрасте 24 мес. активность комплекса I в митохондриях гиппокампа крыс OXYS была значимо ниже чем у одновозрастных крыс Вистар ($p < 0,03$). Активность комплекса IV с возрастом снижалась у крыс обеих линий ($F_{2,23} = 4.8$, $p < 0,02$) и была у крыс OXYS ниже, чем у Вистар ($F_{1,23} = 36.5$, $p < 0,0001$), начиная с возраста 20 дней ($p < 0,002$). В митохондриях коры с возрастом активность комплекса IV снижалась у крыс обеих линий, но достоверными её изменения были между 20-дневными и 24-месячными животными ($p < 0,05$). Активность комплекса V также была у крыс OXYS ниже, чем у крыс Вистар ($F_{1,39} = 12.2$, $p < 0,005$), при этом межлинейные различия были значимы в возрасте 4 месяца, когда разница в активности достигала 30% ($p < 0,03$ в гиппокампе и $p < 0,05$ в коре).

6. Влияние митохондриального антиоксиданта SkQ1 на структурно-функциональные параметры митохондрий старых крыс OXYS

Для оценки связи нейропротекторных эффектов митохондриального антиоксиданта SkQ1 с его влиянием на структурно-функциональные параметры митохондрий крысы OXYS и Вистар с возраста 19 до 24 мес. ежедневно получали по 250 нмоль SkQ1 на кг массы тела животных. Приём SkQ1 значимо не повлиял на удельное содержание

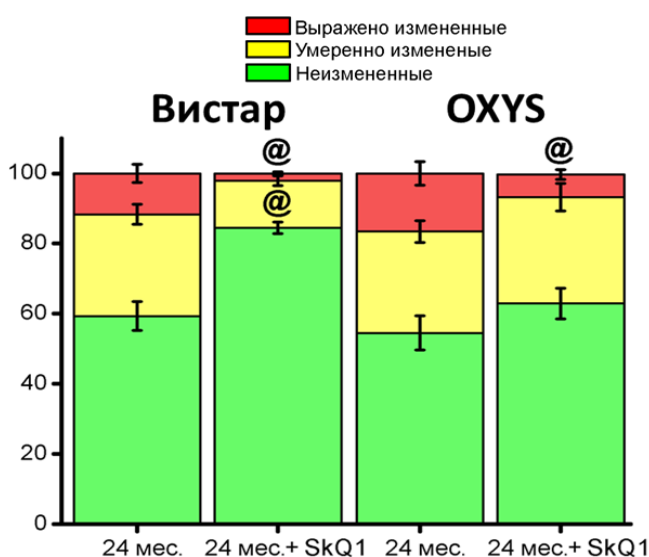


Рис. 13. Влияние приёма SkQ1 на ультраструктуру митохондрий в нейронах гиппокампа крыс Вистар и OXYS. Данные представлены как средний размер митохондрии в $\mu\text{м}^2$. @ - $p < 0,05$ достоверный эффект антиоксиданта SkQ1.

митохондрий в нейронах гиппокампа – оно оставалось у крыс OXYS сниженным по сравнению с крысами Вистар. При этом SkQ1 повлиял на структурно-функциональные параметры митохондрий крыс обеих линий, но в разной степени. У крыс Вистар он повысил (Рис. 13) долю неизмененных митохондрий ($p < 0,0001$) за счет снижения доли умеренно и выражено измененных митохондрий ($p < 0,0001$ и $p < 0,005$ соответственно), у крыс OXYS SkQ1 снизил содержание значительно измененных митохондрий ($p < 0,02$). При этом у крыс OXYS антиоксидант повысил среднюю площадь митохондрий ($p < 0,01$) и не изменил ее у крыс Вистар (рис. 14 Б). Также только у крыс OXYS SkQ1 повысил долю контактирующих с ЭПР митохондрий ($p < 0,05$) до уровня крыс Вистар (рис. 14 Г), но не повлиял на

количество митохондрий (рис. 14 А) и активность митохондриальной динамики - количество межмитохондриальных контактов (рис. 14 В).

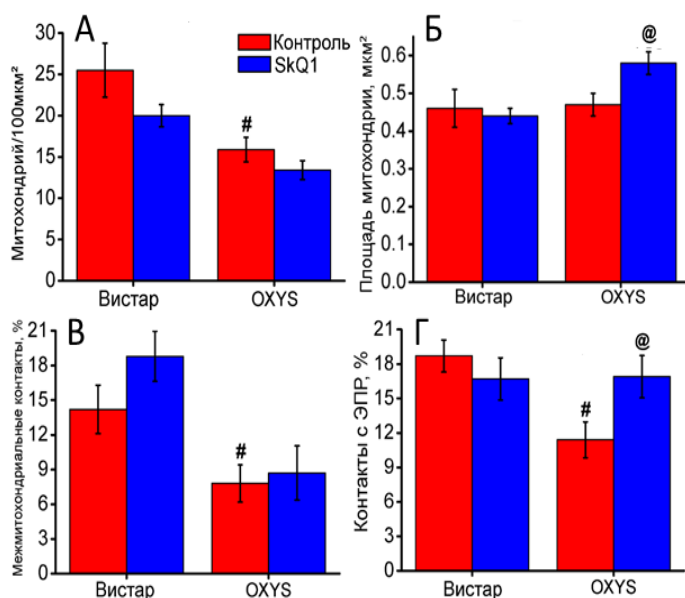


Рис. 14. Влияние антиоксиданта SkQ1 на удельное количество (А) и площадь (Б) митохондрий, долю митохондрий, образующих межмитохондриальные контакты (В) и контакты с ЭПР (Г) у крыс Вистар и OXYS. # - $p < 0,05$ по сравнению с крысами Вистар, @ - $p < 0,05$ достоверный эффект антиоксиданта SkQ1.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Согласно предложенной Swerdlow гипотезе «митохондриального каскада», митохондриальная дисфункция является вершиной пирамиды связанных с развитием БА патологических изменений (Swerdlow et al., 2017). На рис. 15 мы обобщили наши и полученные ранее данные. Как видим, они позволяют предположить, что у крыс OXYS, воспроизводящих ключевые признаки спорадической формы БА (Stefanova et al., 2014-2018), митохондриальная дисфункция характеризуется ранним началом и по времени ее развитие значительно опережает манифестацию первых признаков БА. В ходе развития признаков БА у крыс OXYS митохондриальная дисфункция усугубляется, способствуя прогрессии нейродегенеративных изменений. Таким образом, полученные результаты позволяют заключить, что митохондриальная дисфункция может способствовать развитию молекулярных каскадов, участвующих в развитии БА, или даже инициировать его, оказываясь таким образом в основании пирамиды патогенеза заболевания у крыс OXYS и, возможно, спорадической формы БА у людей.



Рис. 15. Структурно-функциональные изменения митохондрий мозга, предшествующие и сопутствующие развитию признаков БА у крыс OXYS.

ВЫВОДЫ

1. Развитию признаков БА у крыс OXYS предшествуют структурно-функциональные изменения митохондрий мозга: в возрасте 20 дней на доклинической стадии заболевания снижена по сравнению с крысами Вистар активность дыхательной цепи митохондрий мозга (за счет комплекса IV), усилено слияние митохондрий на фоне смещения баланса основных белков митохондриальной динамики - повышения

содержания белка MFN1, выявляются митохондрии с характерным для пациентов с БА фенотипом – «митохондрии-на-нитке».

2. Манифестация признаков БА у крыс OXYS в возрасте 3-5 месяцев происходит на фоне значительного снижения удельного количества митохондрий в нейронах гиппокампа, их деструктивных изменений, снижения активности дыхательной цепи (за счет комплексов IV и V – в гиппокампе, комплексов I и V – в префронтальной коре), нарушения динамики митохондрий и увеличением активности образования контактов с ЭПР.
3. У крыс OXYS с выраженными признаками БА существенно снижены удельное количество митохондрий и активность дыхательной цепи, значительно повышена доля митохондрий с выраженными деструктивными изменениями, митохондриальная динамика смещена в направлении усиления деления за счет увеличения содержания белка DRP1.
4. Анализ распределения растворимых форм амилоида бета в нейронах гиппокампа крыс OXYS в период прогрессии признаков БА показал, что он локализуется в мембранах митохондрий и их матриксе, в ядре и отростках нейронов крыс OXYS.
5. Только в возрасте 20 дней и только при окислении одного субстрата - пирувата – генерация АФК в выделенных митохондриях мозга крыс OXYS выше, чем у крыс Вистар. В период манифестации и прогрессии признаков БА у крыс OXYS отличия по этому показателю от одновозрастных крыс Вистар отсутствовали.
6. Содержание митохондриального белка-разобщителя UCP2 - регулятора генерации АФК - растет с возрастом в гиппокампе и коре мозга как у крыс Вистар, так и у OXYS при отсутствии значимых межлинейных различий при нормировании на единицу массы ткани. Однако более, чем двукратное снижение удельного количества митохондрий в нейронах гиппокампа крыс OXYS косвенно указывает на повышение плотности UCP2 на внутренней мембране митохондрий.
7. Установлено, что нейропротекторные эффекты митохондриального антиоксиданта SkQ1 связаны с его способностью улучшать структурно-функциональные параметры митохондрий даже у старых крыс OXYS с выраженными признаками БА. Прием SkQ1 (250 нмоль на кг. массы тела) с возраста 19 до 24 мес. повысил частоту образования контактов с ЭПР у крыс OXYS до уровня одновозрастных Вистар, в 2,5 раза снизил долю существенно поврежденных митохондрий, но не изменил активность митохондриальной динамики и не повлиял на количество митохондрий.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Kolosova N.G, **Tyumentsev M.A**, Muraleva N.A, Kiseleva E, Vitovtov A.O, Stefanova N.A. Antioxidant SkQ1 Alleviates Signs of Alzheimer's Disease-like Pathology in Old OXYS Rats by Reversing Mitochondrial Deterioration // Current Alzheimer Research. 2017. Vol. 14. №. 12. P. 1283 – 1292.

2. **Tyumentsev M.A**, Stefanova N.A, Muraleva N.A, Rumyantseva Y.V, Kiseleva E, Vavilin V.A, Kolosova N.G. Mitochondrial Dysfunction as a Predictor and Driver of

Alzheimer's Disease-Like Pathology in OXYS Rats // Journal of Alzheimer's Disease. 2018. J Alzheimers Dis.; 63(3):1075-1088.

3. **Tyumentsev M.A.**, Stefanova N.A., Kiseleva E.V., Kolosova N.G. Mitochondria with Morphology Characteristic for Alzheimer's Disease Patients Are Found in the Brain of OXYS Rats // Biochemistry (Moscow), 2018. Vol. 83, No. 9, pp. 1083-1088.

4. Stefanova N.A., Ershov N.I., Maksimova K.Yi., Muraleva N.A., **Tyumentsev M.A.**, Kolosova N.A. Rat prefrontal cortex transcriptome: effects of aging and sporadic Alzheimer's disease-like pathology // J Gerontol A Biol Sci Med Sci, 2018. In press. doi: gly198

5. Колосова Н.Г., Максимова К.Ю., **Тюменцев М.А.**, Муралева Н.А., Рудницкая Е.А., Телегина Д.В., Киселева Е.В., Стефанова Н.А. Дисфункция митохондрий как мишень для профилактики спорадической формы болезни Альцгеймера: экспериментальное исследование // Сборник материалов форума «Биомедицина-2016». Новосибирск, 2016. С. 34.

6. **Tyumentsev M.A.**, Kiseleva E.V., Vavilin V.A., Kolosova N.G., Stefanova N.A. Mitochondrial dysfunction in development of sporadic Alzheimer's disease-like pathology in OXYS rats // The tenth international conference on bioinformatics of genome regulation and structure\Systems biology. Abstracts. Novosibirsk, 2016. С. 326.

7. **Тюменцев М.А.**, Муралева Н.А., Стефанова Н.А. Анализ связи развития признаков болезни Альцгеймера у крыс OXYS с дисфункцией митохондрий. // Беляевские чтения Тезисы докладов Международной конференции, посвященной 100-летию со дня рождения академика АН СССР Д.К. Беляева. Новосибирск, 2017. С. 154.

8. **Тюменцев М.А.**, Муралева Н.А., Стефанова Н.А. Дисфункция митохондрий в развитии связанных со старением нейродегенеративных процессов: экспериментальное исследование // Материалы XXIII съезда Физиологического общества им. И. П. Павлова. Воронеж, 2018. С. 1683–1684.

9. **Tyumentsev M.A.**, Muraleva N.A., Vavilin V.A., Stefanova N.A., Kolosova N.G. Contribution of mitochondrial dysfunction in the development of sporadic Alzheimer's disease: evidence from OXYS rats // Материалы докладов II всероссийской научной конференции с международным участием «Механизмы регуляции функций органелл эукариотической клетки». Иркутск, 2018. С. 136-138.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АТФ – аденозинтрифосфат
БА – болезнь Альцгеймера
ЭПР – эндоплазматический ретикулум
ЭТЦ – электрон-транспортная цепь
Аβ – бета-амилоид
DRP1 – dynamin-1-like protein

MFN1/2 – mitofusin 1/2
MOAS – Mitochondria-on-a-string
SkQ1 – пластохинонил-децил-трифенилфосфоний
UCP2 – uncoupling protein 2