

УДК 616-036.12, 544.431.15, 577.334

ОЦЕНКА РЕДОКС-БАЛАНСА В КЛЕТКАХ МОЗГА ПРИ ДЕФИЦИТЕ ФЕРМЕНТА ГИПОКСАНТИГУАНИНФОСФОРИБОЗИЛТРАНСФЕРАЗЫ

Долгих А.И. (Лаборатория клеточной физиологии и патологии, ФГБОУ ВО «ОГУ им. И.С. Тургенева»), Тагунов П.А. (Лаборатория клеточной физиологии и патологии, ФГБОУ ВО «ОГУ им. И.С. Тургенева»)

Научный руководитель – кандидат технических наук Винокуров А.Ю.
(Лаборатория клеточной физиологии и патологии, ФГБОУ ВО «ОГУ им. И.С. Тургенева»)

Работа посвящена оценке скорости продукции активных форм кислорода (АФК) и содержания восстановленного глутатиона (GSH) в смешанной культуре астроцитов и нейронов, а также скорости образования АФК в острых срезах коры и среднего мозга мышей с мутацией гена HPRT1

Введение. Фермент гипоксантигуанинфосфорибозилтрансфераза (HPRT) участвует в пуриновом обмене, и его дефицит в первую очередь связан с избыточной продукцией мочевой кислоты, которая способна, в том числе, оказывать негативное влияние на работу митохондрий и поддержание редокс-баланса клеток. Согласно литературным источникам, содержание данного фермента значительно выше в тканях центральной нервной системы, чем в остальном организме, а максимальная активность обнаружена в базальных ганглиях, которые характеризуются наименьшей интенсивностью синтеза пуринов de novo. При дефиците фермента HPRT наблюдается развитие неврологических симптомов и системных нарушений метаболизма в целом. Так, полное отсутствие каталитической активности данного фермента ассоциируется с развитием орфанного синдрома Леша-Нихена, распространенность которого составляет 1-9 на 1000000 человек. Стоит отметить, что при этом развивается дисфункция дофаминергической нейромедиаторной системы, в наибольшей степени проявляющаяся в базальных ганглиях. На данный момент не существует эффективного лечения неврологических симптомов при синдроме Леша-Нихена, но детальное изучение механизмов развития патологии, в частности роли нарушения редокс-баланса, может способствовать решению этой проблемы.

Основная часть.

Редокс-баланс клеток определяется скоростью образования и нейтрализации АФК, оценка которых позволяет сделать вывод о физиологическом состоянии клеток. Данные соединения, являясь реакционноспособными формами кислорода, обладают высокой биологической активностью и участвуют в регуляции таких важнейших процессов, как апоптоз, старение организма, клеточное деление и внутриклеточная сигнализация. При этом гиперпродукция АФК приводит к повреждению мембранных структур, белков, ДНК и, в конечном итоге, к гибели клетки. Среди механизмов контроля образования данных соединений важное значение имеет фермент глутатионпероксидаза, принцип действия которой основывается на восстановлении пероксида водорода до воды и органических пероксидов до спирта и кофактором которой является GSH, имеющий, соответственно, важнейшее значение для поддержания необходимого редокс-баланса и предотвращения клеточной дисфункции в результате развития окислительного стресса. Оценка скорости продукции АФК по образованию супероксиданиона и антиоксидантного статуса клеток по уровню GSH может дать информацию о роли нарушения редокс-баланса в развитии той или иной патологии.

Для исследования использовали как срезы, так и смешанную культуру, в целях подтверждения полученных данных как на тканевом, так и на клеточном уровнях. Экспериментальные исследования проводили на первичной культуре нейронов и астроцитов среднего мозга и коры 0-3-дневных детенышей мышей, без мутаций и несущих в геноме мутацию del24-del26 delCGT, приводящую к развитию синдрома Леша-Нихена (N = 4). Для получения первичной нейроглиальной культуры отделы мозга после изолирования помещали в ледяной HBSS для

сохранения их жизнеспособности, затем ткани измельчали и выдерживали в трипсине (0,1% в течение 15 мин при 37 °С), после чего клетки высевали на обработанные полиэтиленгликолем покровные стекла и культивировали в среде Neurobasal A с добавлением B-27 и L-глутамина при температуре 37 °С в увлажненной атмосфере с 5% CO₂ в течение 11-15 дней. Острые срезы коры и среднего мозга также получали в соответствии со стандартным протоколом (N=4). После декапитации животного извлеченный мозг сразу помещали в ледяной HBSS, после чего выполняли срезы толщиной около 500 мкм, которые хранили перед экспериментами не менее 1 часа при 37 °С. Все 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).

Исследования параметров редокс-баланса проводили с помощью лазерного сканирующего микроскопа LSM 900 с системой Airyscan 2 и установки на базе флуоресцентного микроскопа Olympus IX73P1F и системы возбуждения и регистрации флуоресценции Cairn Research Ltd. Для оценки внутриклеточного содержания GSH использовали флуоресцентный зонд monochlorobimane (MCB), который, взаимодействуя с GSH, приобретает способность к флуоресценции (максимумы возбуждения/эмиссии ~ 380/461 нм). Клетки инкубировали в 50 мкМ растворе MCB в течение 30 мин при 37°C в темноте. Анализ результатов проводили с учетом прямопропорциональной зависимости между интенсивностью флуоресценции и содержанием GSH в образце. Выработку супероксиданиона оценивали при помощи зонда дигидроэтидия (HEt) (5 мкМ) (максимумы возбуждения/эмиссии ~ 360/460 нм) без предварительной инкубации для избежания накопления токсичных для клеток продуктов окисления. Окисленная форма HEt в результате интеркаляции в ДНК приобретает способность к флуоресценции (максимумы возбуждения/эмиссии ~ 360/460 нм). Оценку образования супероксиданиона определяли по скорости прироста флуоресценции продукта окисления HEt. Кроме того, для дифференцирования продукции АФК астроцитами и нейронами в процессе исследования к первичной нейроглиальной культуре добавляли АТФ (100 мкМ) и глутамат (10 мкМ) соответственно, способные к стимуляции активности НАДФН-оксидазы.

Выводы. Согласно результатам статистической обработки, в острых срезах коры головного мозга уровень продукции супероксиданиона в образцах, полученных от гомозиготных по мутации в гене HPRT животных, несколько ниже, чем в образцах от гетерозиготных. В клеточной культуре коры как по уровню базового сигнала, так и при стимулировании с помощью АТФ и глутамата, данный показатель выше в астроцитах, полученных от мышей, не имеющих мутации в гене HPRT, и нейронах, полученных от гомозиготных по мутации в данном гене животных. При этом уровень GSH в нейроглиальной культуре коры выше в образцах, полученных от гомозиготных по мутации в гене HPRT мышей. Согласно полученным данным на острых срезах и смешанной культуре среднего мозга, скорость продукции супероксиданиона значительно выше (~ в 2 раза) у образцов, полученных от гомозиготных по мутации гена HPRT животных, по сравнению с теми, которые получены от гетерозиготных по данной мутации и не имеющих мутации мышей, причем по уровню как базового, так и стимулированного сигнала. При этом уровень GSH, определенный в клеточной культуре среднего мозга, не отличается у образцов, полученных от гомозиготных по мутации в гене HPRT животных и не имеющих ее. Полученные данные отражают возможное развитие хронического окислительного стресса именно в среднем мозге, для которого в литературе показаны изменения, происходящие при синдроме Леша-Нихена. В последующем это можно использовать для более полного понимания развития данной патологии.

Работа выполнена при поддержке гранта Правительства Российской Федерации № 075-15-2019-1877.

Долгих А.И.

Винокуров А.Ю. (научный руководитель)