

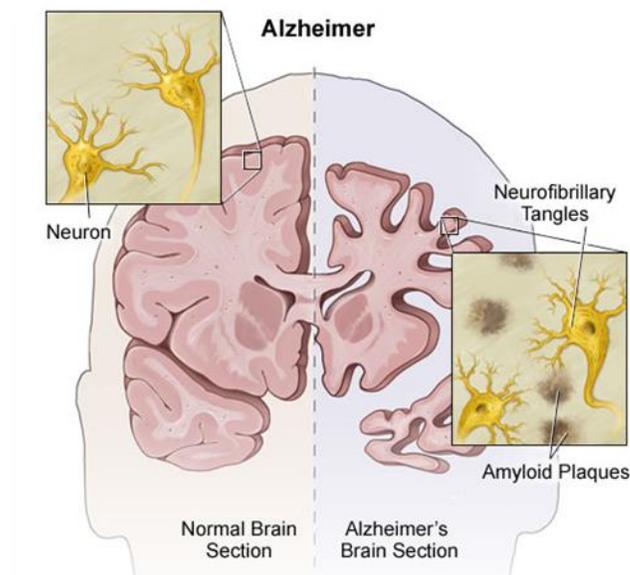
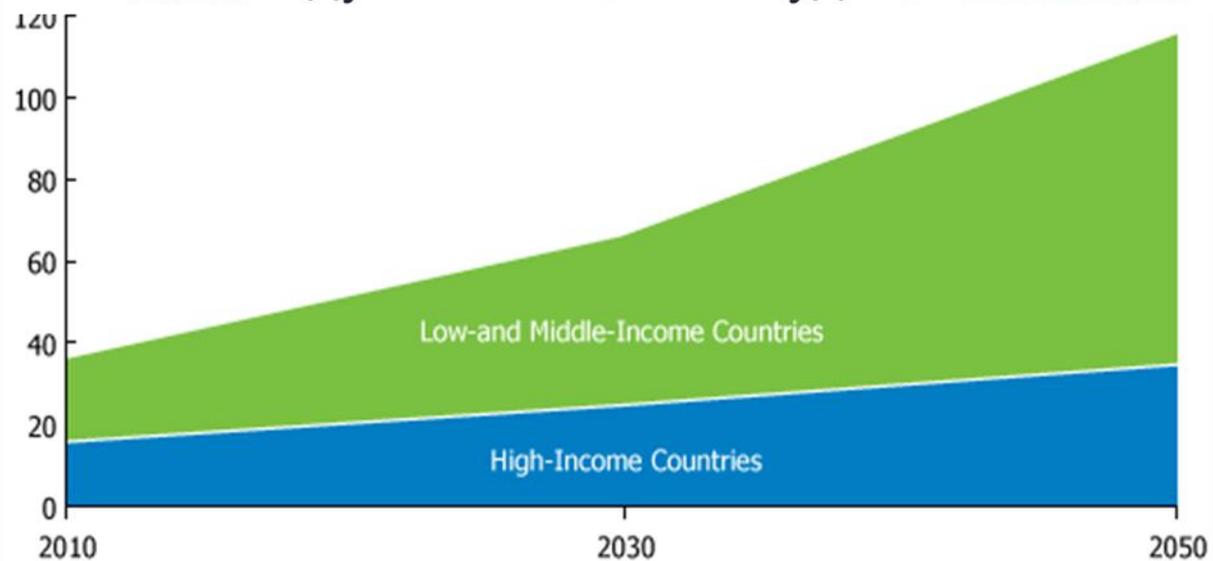
Тюменцев Михаил Алексеевич

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

03.03.04 – Клеточная биология, цитология, гистология

Научный руководитель д.б.н. профессор Н.Г.Колосова

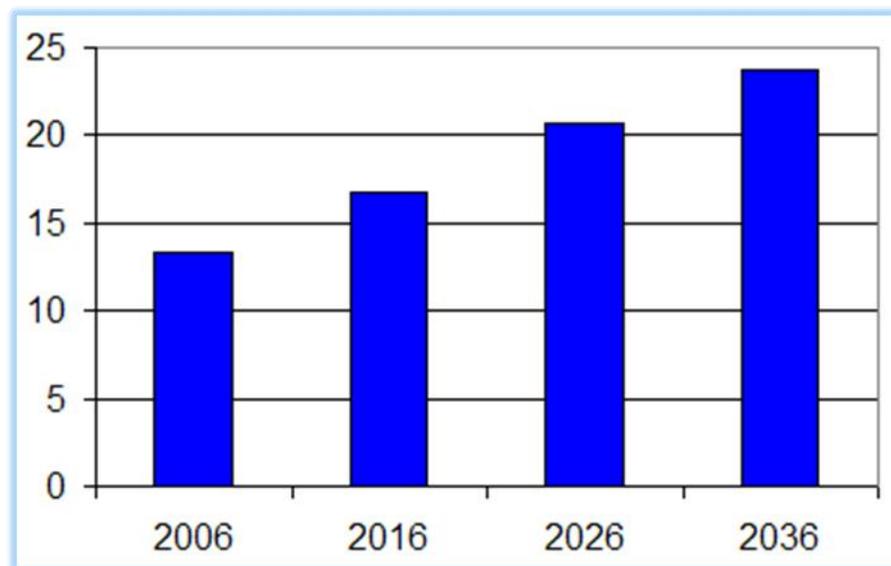
ВОЗ: в мире > 35 млн человек страдают БА;
к **2050** году таких больных будет **> 115 млн.**



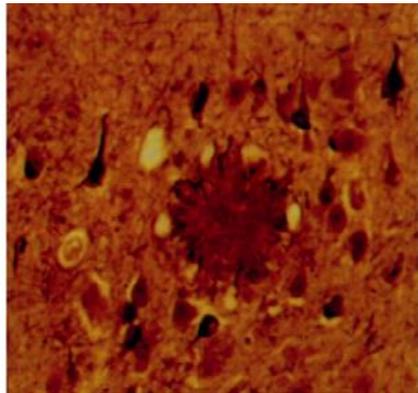
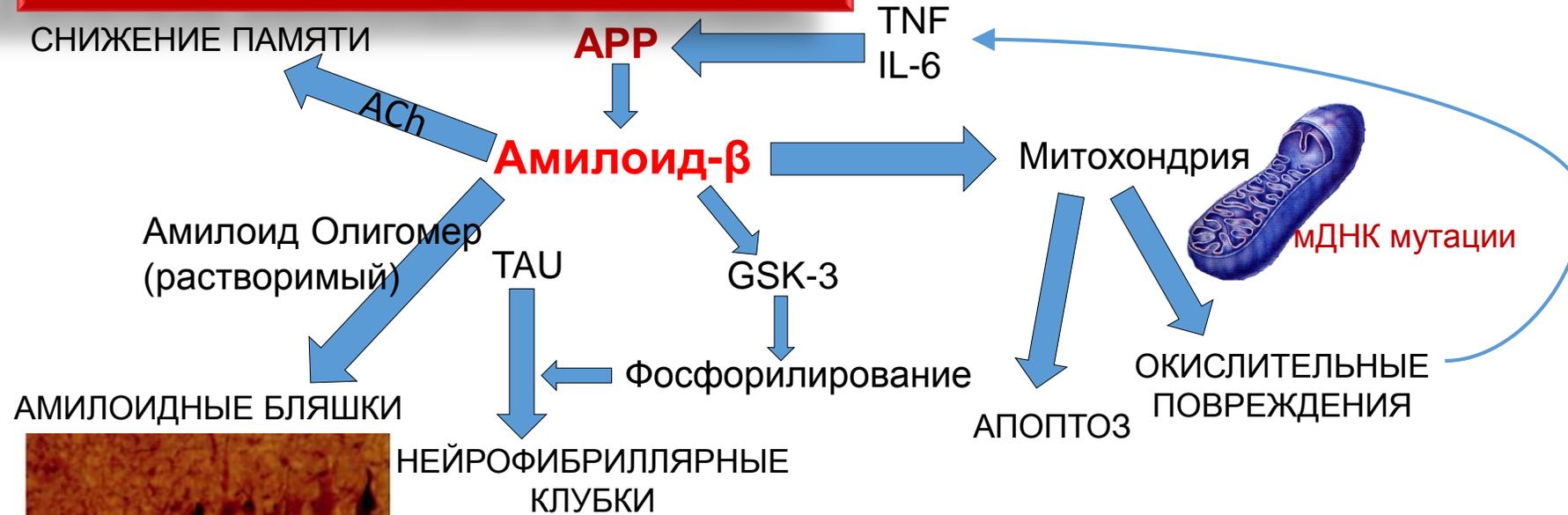
Увеличение доли
пожилых в
популяции



%



Гипотеза амилоидного каскада



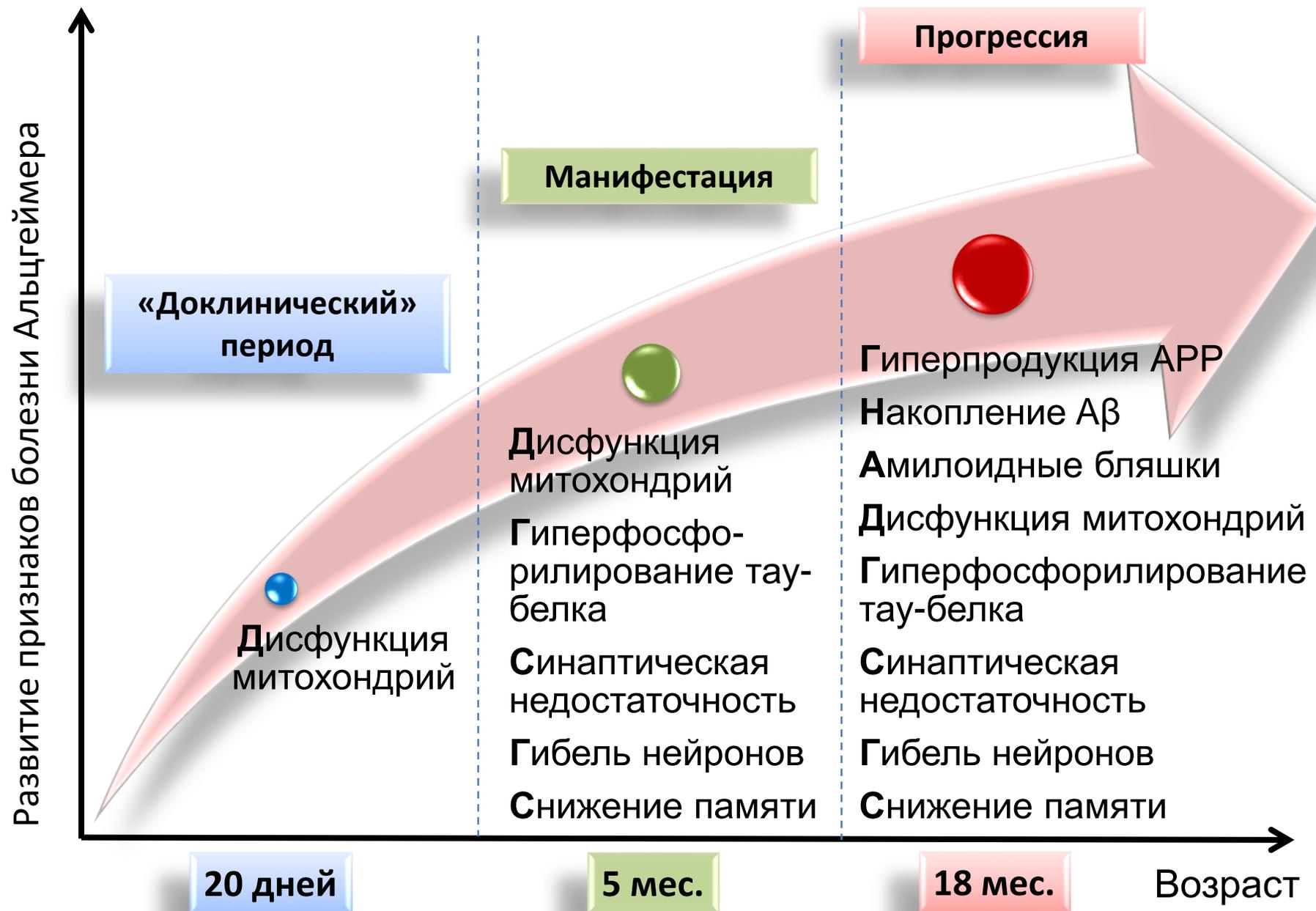
Гипотеза митохондриального каскада (Swerdlow, Kahn, 2004)



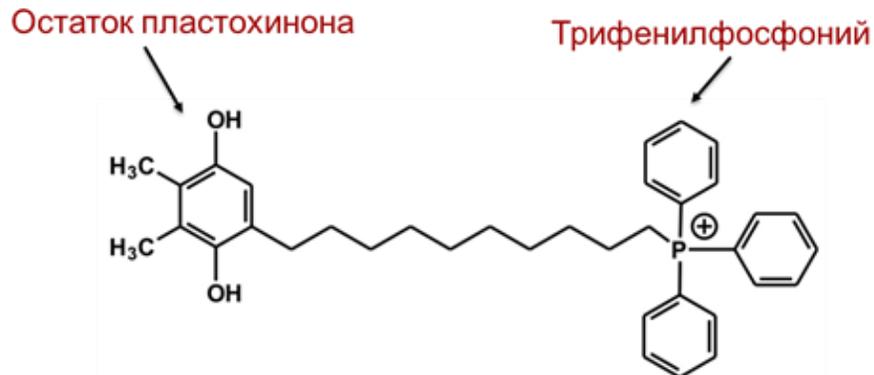
Признаки болезни Альцгеймера у людей и у крыс OXYS

	Пациенты с болезнью Альцгеймера	Крысы OXYS
Гиперпродукция амилоида- β	+	+
Амилоидные бляшки	+	+
Фосфорилированный тау-белок	↑	↑
Потеря нейронов	+	+
Дисфункция синапсов	+	+
Нарушение памяти и обучения	+	+
Митохондриальные нарушения	+	+
Оксидативные повреждения	+	+

Этапы развития признаков БА у крыс OXYS



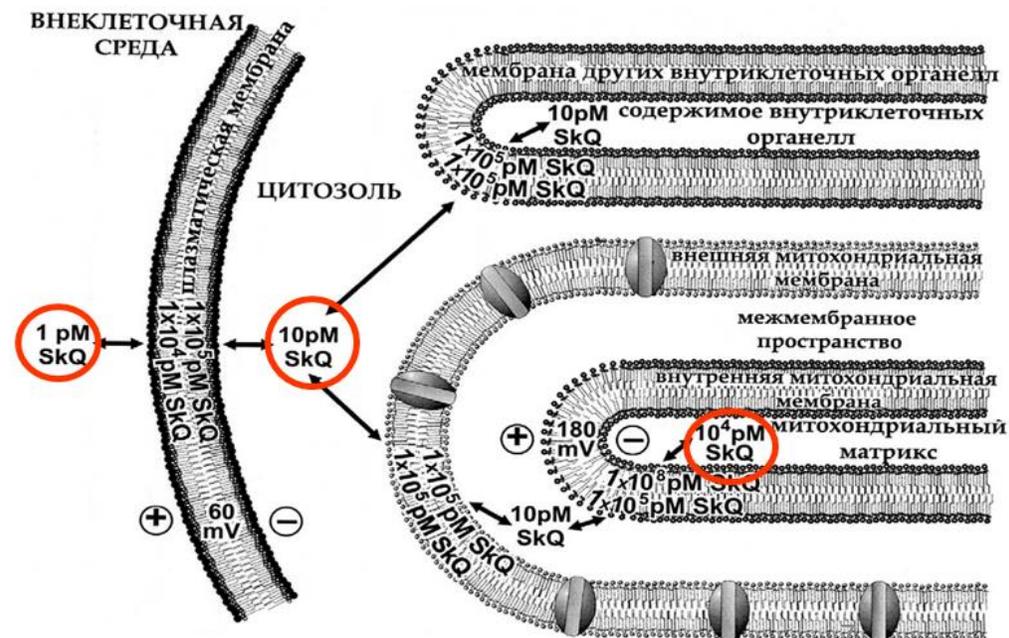
Исследование связи нейропротекторных эффектов митохондриального антиоксиданта пластохинонил-децил-трифенилфосфония - SkQ1 - с его влиянием на ультраструктурные параметры митохондрий нейронов гиппокампа



SkQ1 – антиоксидант, адресованный в митохондрии

SkQ1 способен накапливаться в митохондриях клеток и влиять на «горячие точки» патогенеза БА – дисфункцию митохондрий и окислительный стресс.

SkQ1 может переносить через мембрану митохондрий жирные кислоты, что приводит к мягкому разобщению окисления и фосфорилирования, снижению мембранного потенциала и, как следствие, уменьшению продукции АФК (Severin et al., 2010).



Цель работы - исследовать пути нарушения функций митохондрий и их вклад в развитие и прогрессию признаков БА у крыс OXYS.

Задачи:

➤ В возрасте 20 дней – в период, предшествующий развитию признаков БА, в возрасте 4-5 месяцев – в период манифестации признаков заболевания и в возрасте 18-24 месяца – в период активной прогрессии признаков БА у крыс OXYS исследовать, используя крыс Вистар как контроль,

1) ультраструктуру митохондрий пирамидальных нейронов области CA1 гиппокампа;

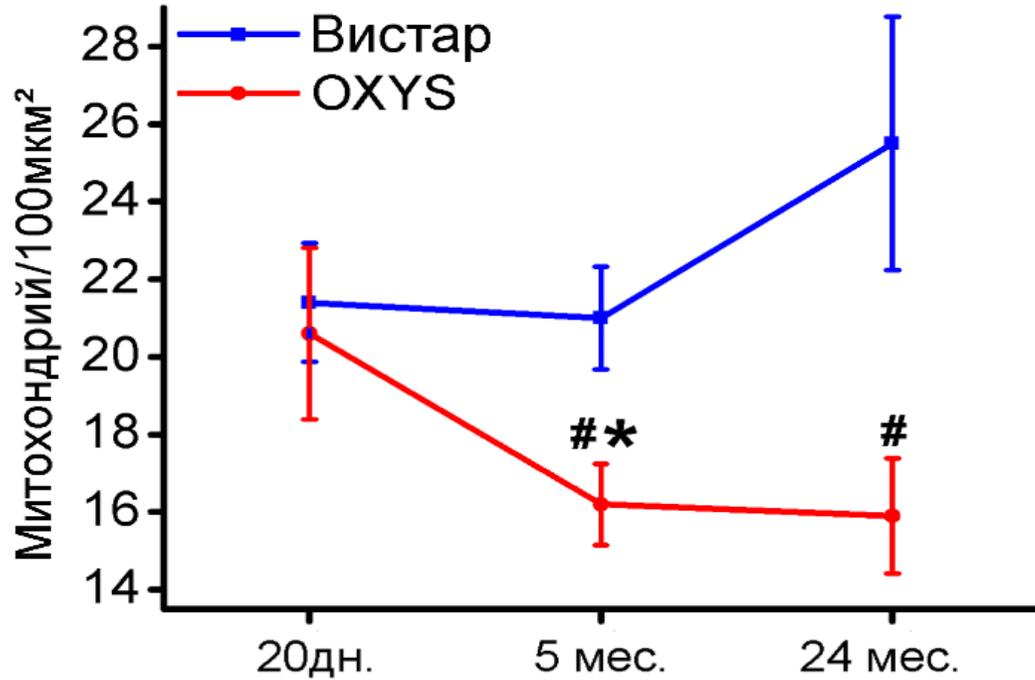
2) уровни основных белков, опосредующих процессы митохондриальной динамики - митофузинов MFN1 и MFN2 и динамин-1-подобного белка DRP1, в гиппокампе;

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

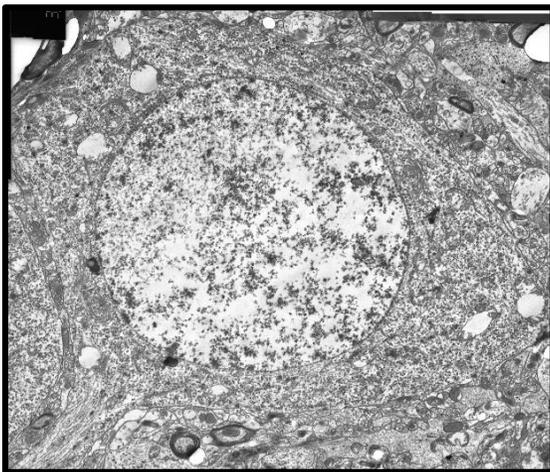
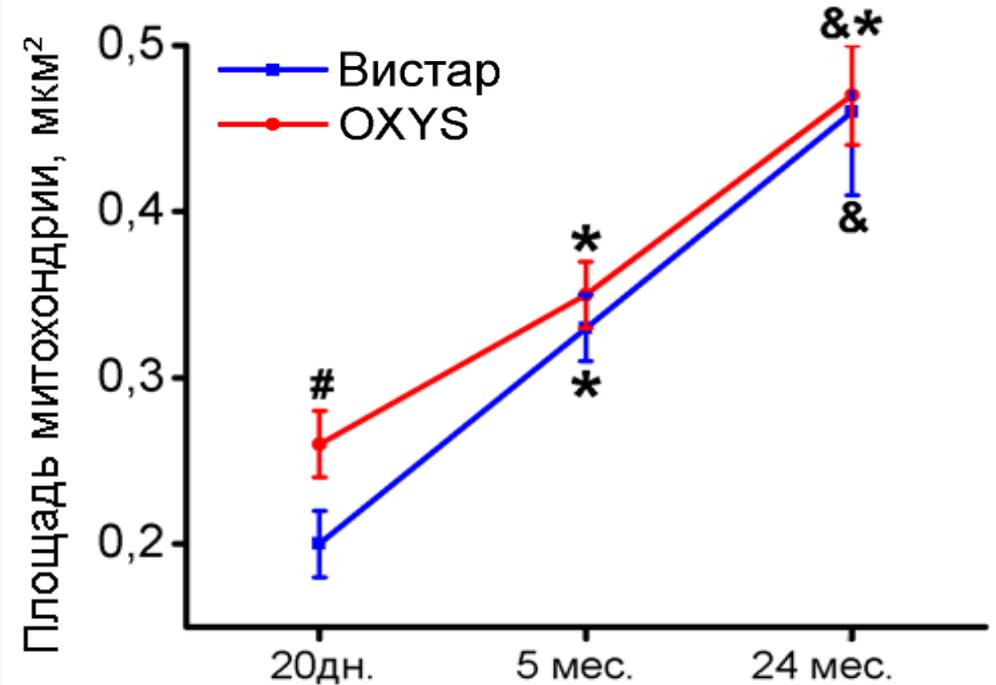
4) генерацию АФК митохондриями мозга в различных метаболических состояниях, а также уровень белкового продукта гена митохондриального белка-разобщителя UCP2 - регулятора генерации АФК в гиппокампе и коре мозга.

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

Удельное количество митохондрий в цитоплазме нейронов



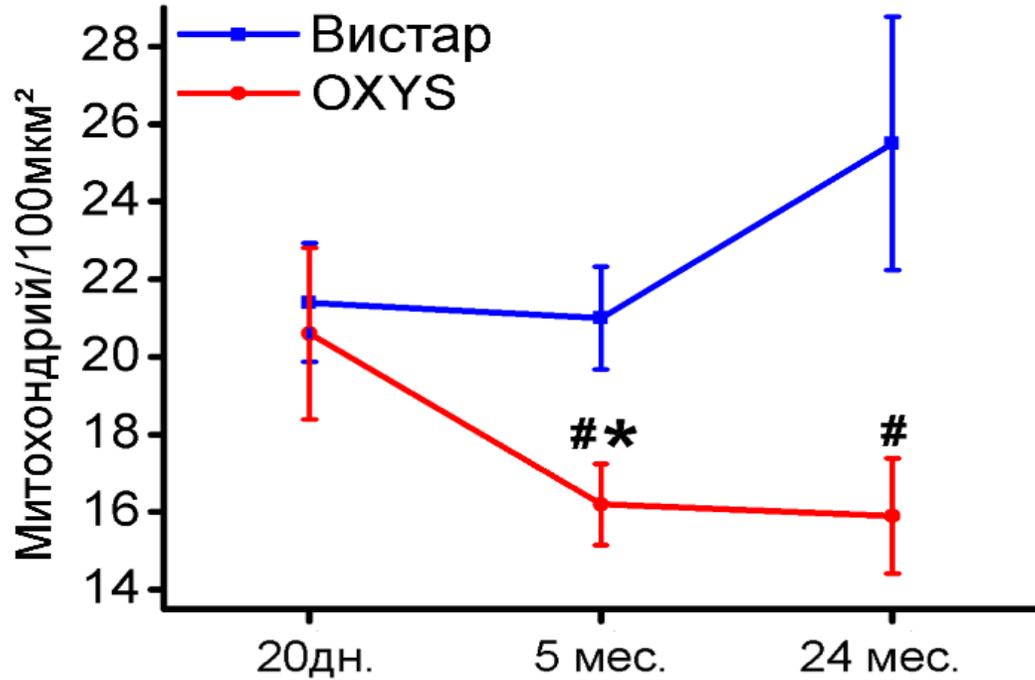
Средний размер митохондрии



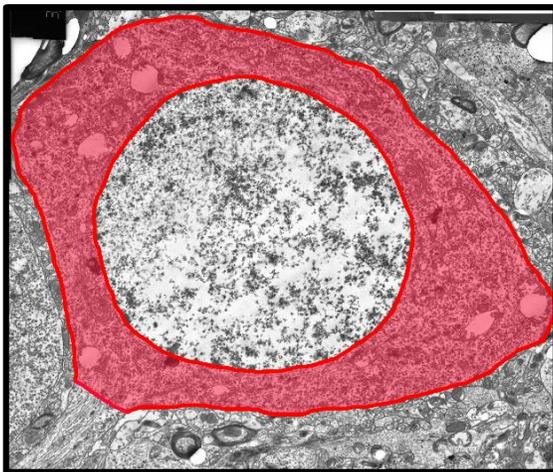
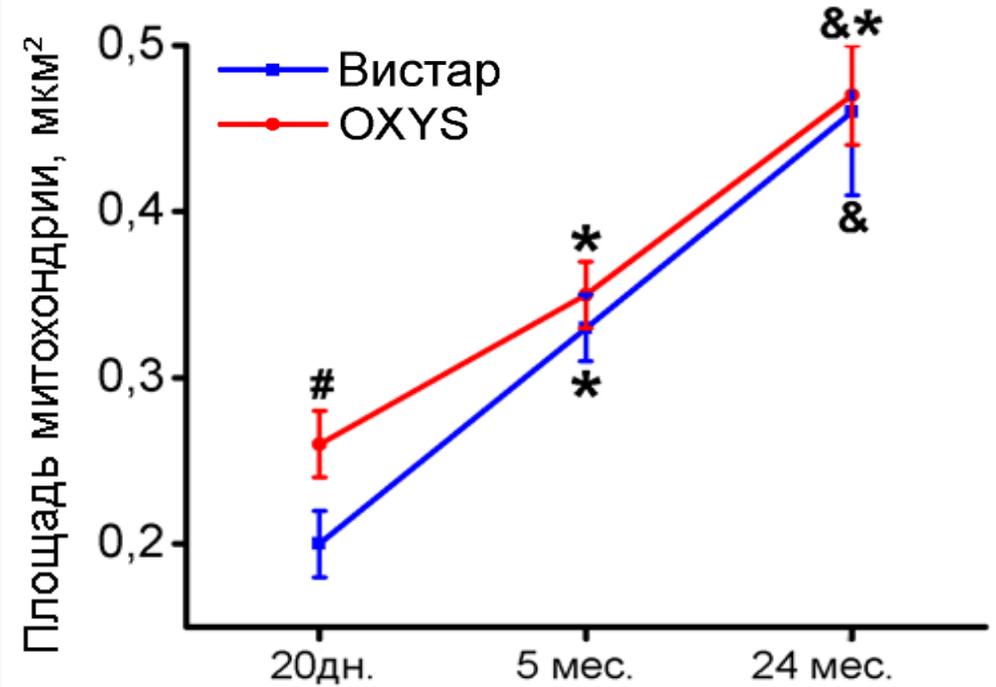
- Анализ состояния митохондриального аппарата проводили в телах пирамидных нейронов.
- Количество митохондрий нормировали на площадь цитоплазмы.

Достоверны: # - межлинейные различия
* - различия в сравнении с предыдущим возрастом
& - различия в сравнении с 20-ти дневными крысами одной линии

Удельное количество митохондрий в цитоплазме нейронов



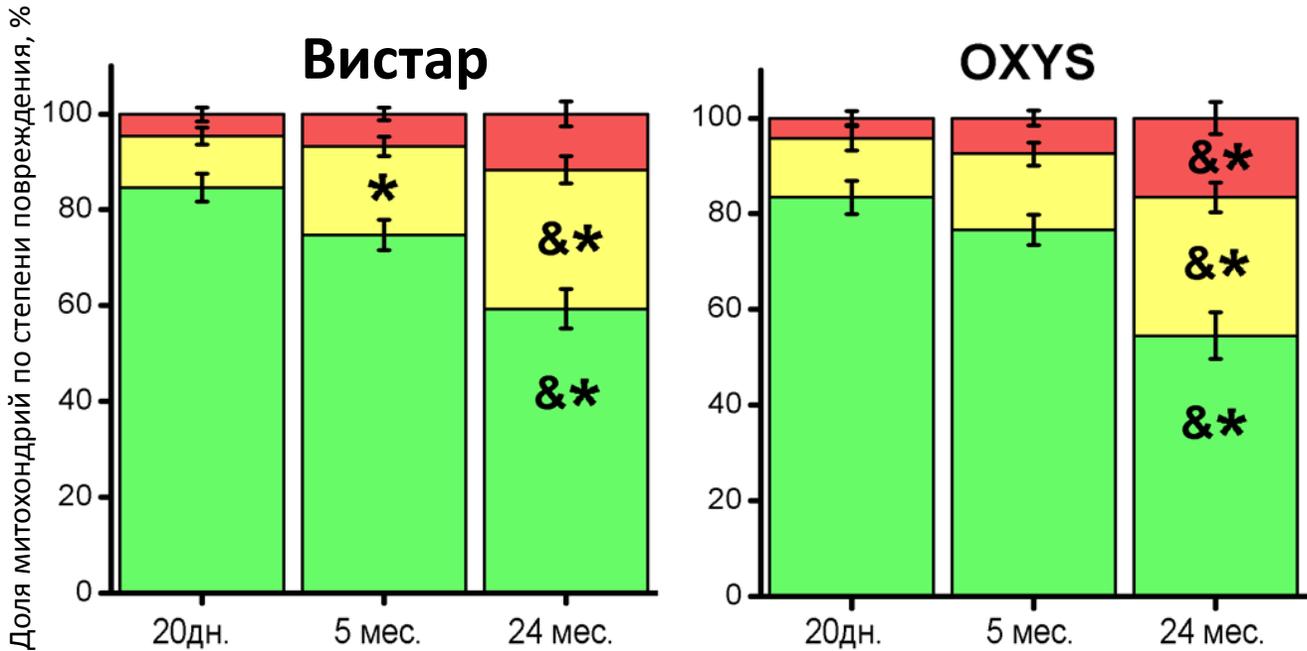
Средний размер митохондрии



- Анализ состояния митохондриального аппарата проводили в телах пирамидных нейронов.
- Количество митохондрий нормировали на площадь цитоплазмы.

Достоверны: # - межлинейные различия
 * - различия в сравнении с предыдущим возрастом
 & - различия в сравнении с 20-ти дневными крысами одной линии

Количественная оценка выраженности нарушений ультраструктуры в митохондриях нейронов гиппокампа



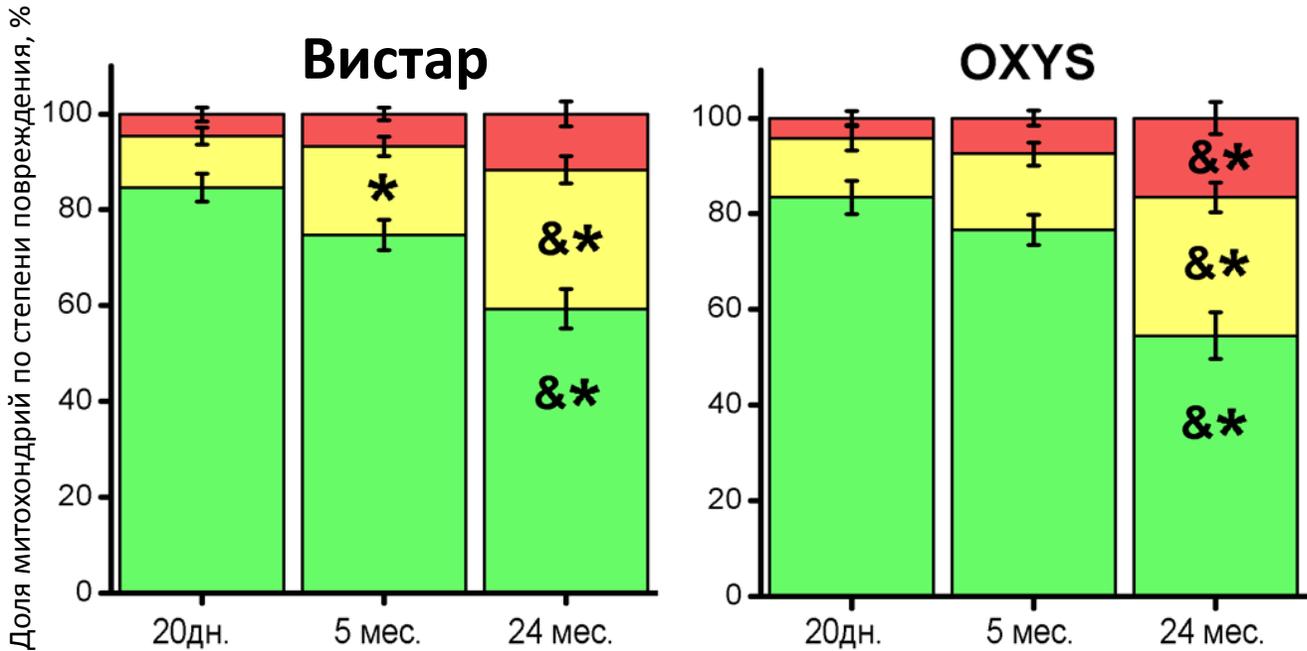
Изменение с возрастом ультраструктуры митохондрий в нейронах гиппокампа крыс Вистар и OXYS.

* - различия в сравнении с предыдущим возрастом
& - различия в сравнении с 20-ти дневными крысами одной линии



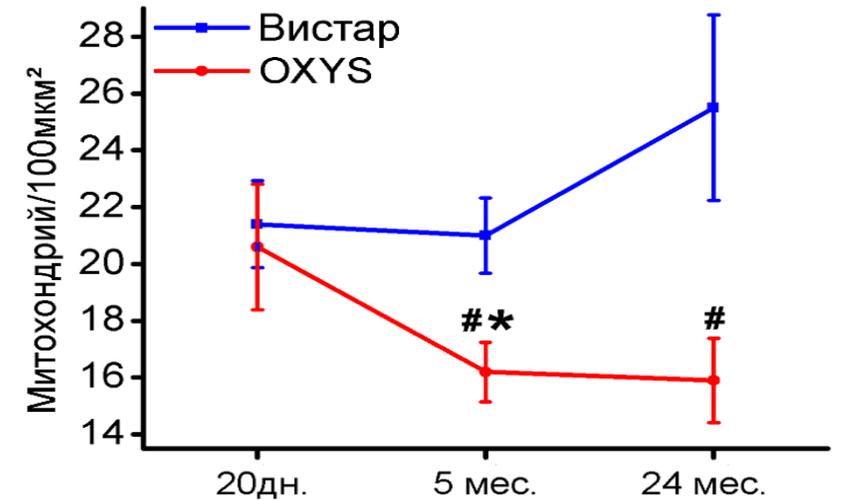
Критерии оценки состояния ультраструктуры митохондрий, бар 500 нм

Количественная оценка выраженности нарушений ультраструктуры в митохондриях нейронов гиппокампа



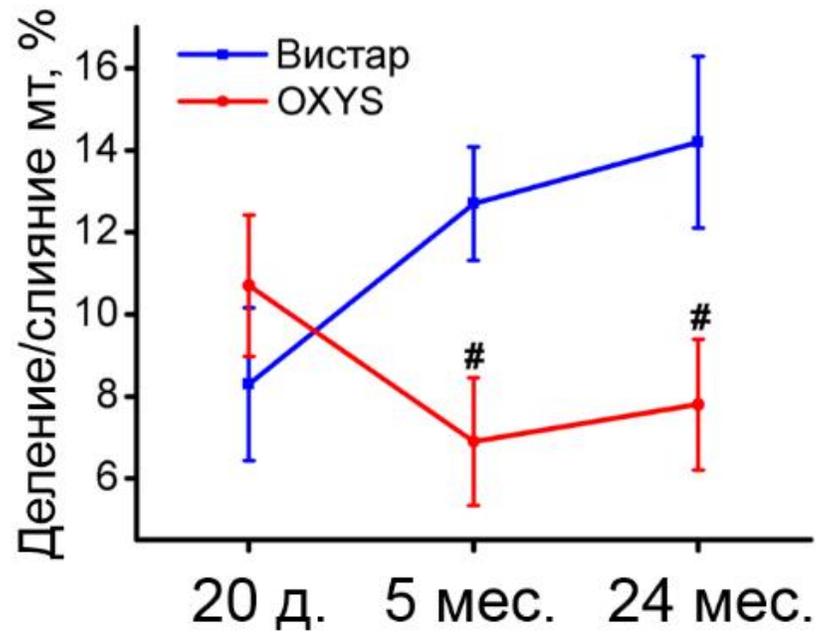
Изменение с возрастом ультраструктуры митохондрий в нейронах гиппокампа крыс Вистар и OXYS

* - различия в сравнении с предыдущим возрастом
& - различия в сравнении с 20-ти дневными крысами одной линии

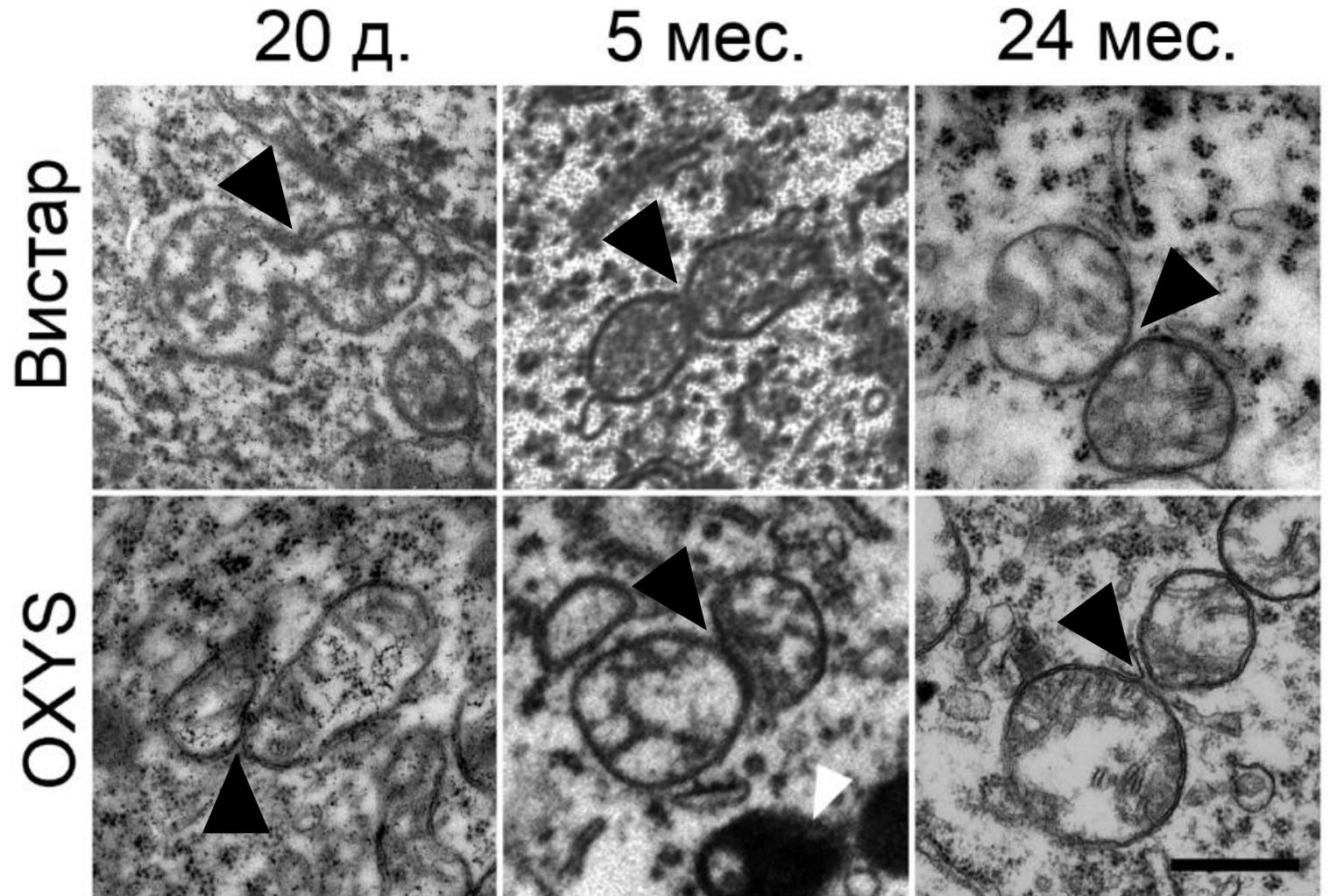


Критерии оценки состояния ультраструктуры митохондрий, бар 500 нм

Количество контактов между митохондриями отражает процессы митохондриальной динамики – способности к делению и слиянию – и зависит от энергетических потребностей клетки и ее функционального состояния.

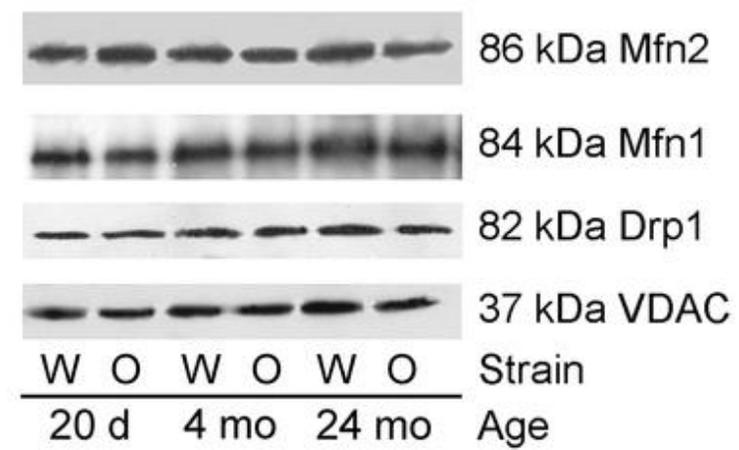
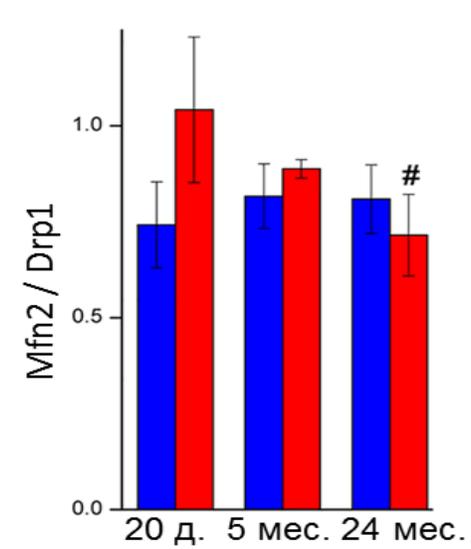
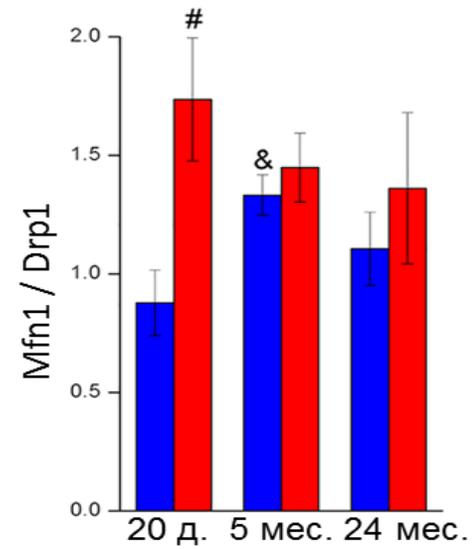
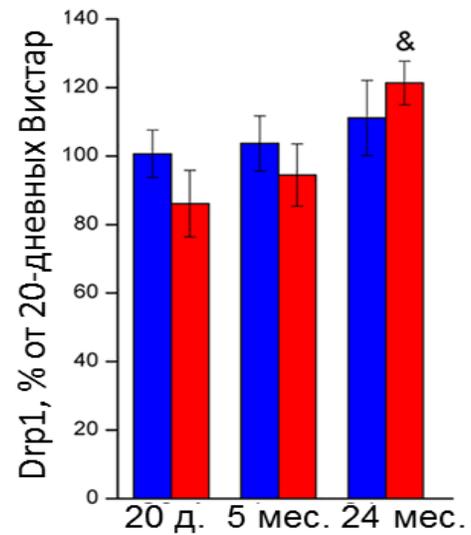
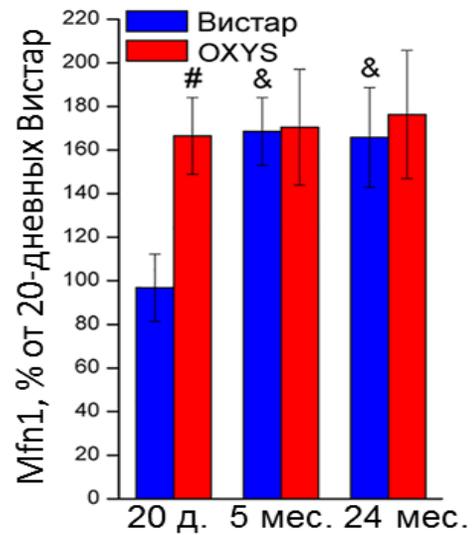


- межлинейные различия



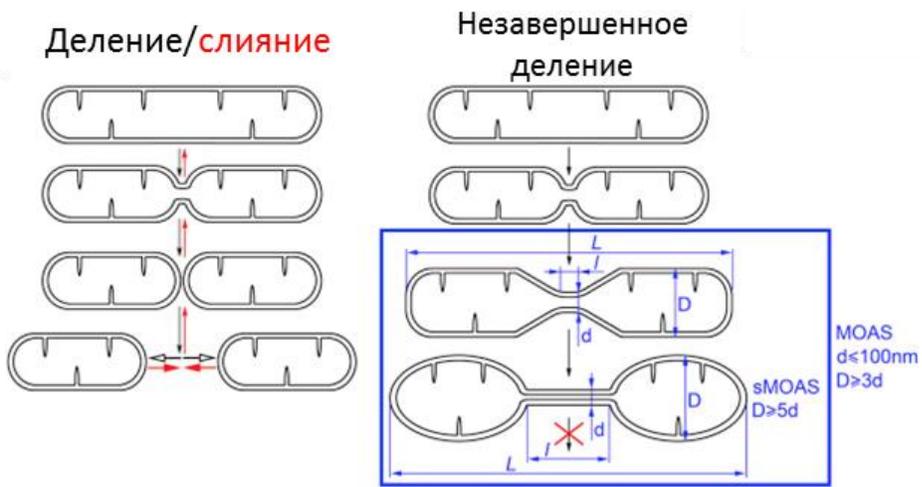
Черные стрелки – межмитохондриальные контакты. Белая стрелка – липофусцин. Бар – 500 нм

Нарушения динамики митохондрий на фоне изменения соотношения у крыс OXYS белков деления и слияния - Drp1, Mfn1 и Mfn2



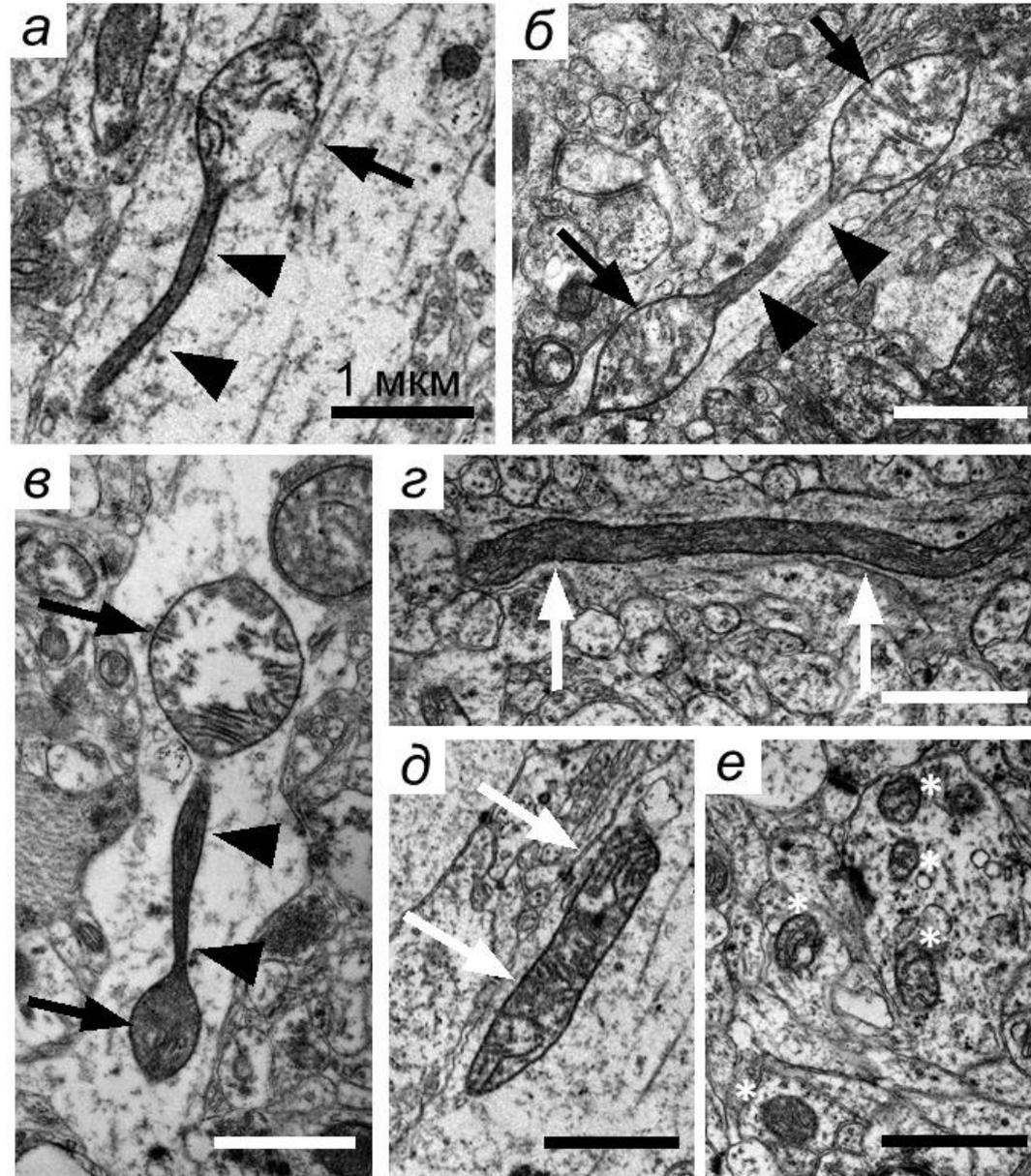
- межлинейные различия
& - по сравнению с 20-дневными крысами одной линии

Частота встречаемости MOAS в отростках нейронов коры мозга крыс OXYS повышена

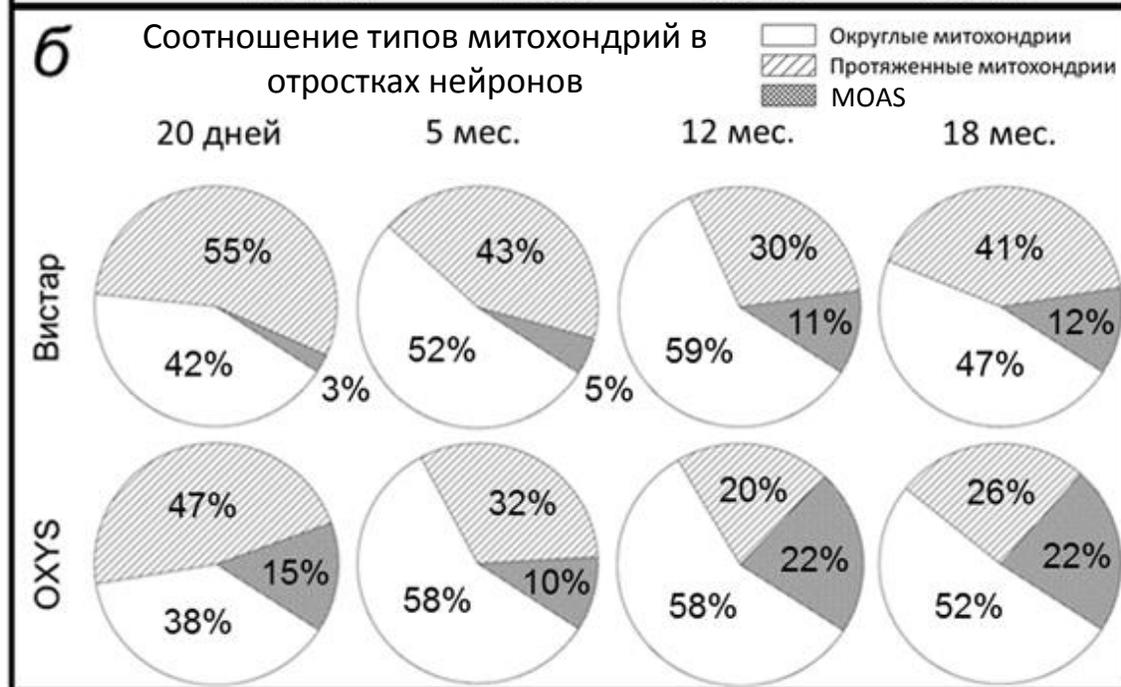
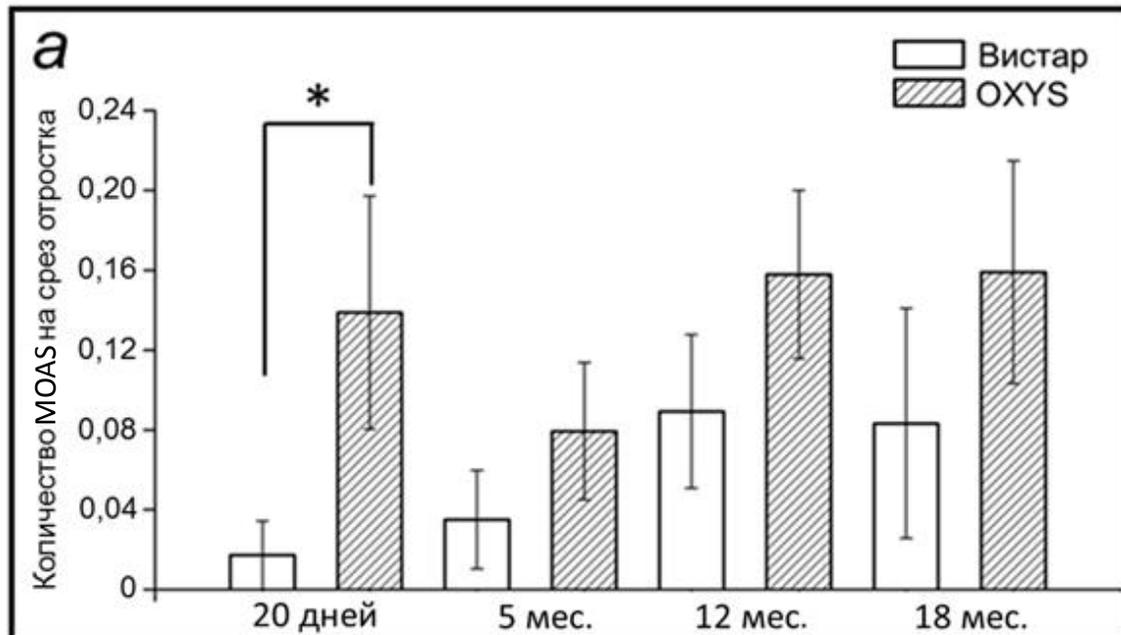


По Morozov, 2017

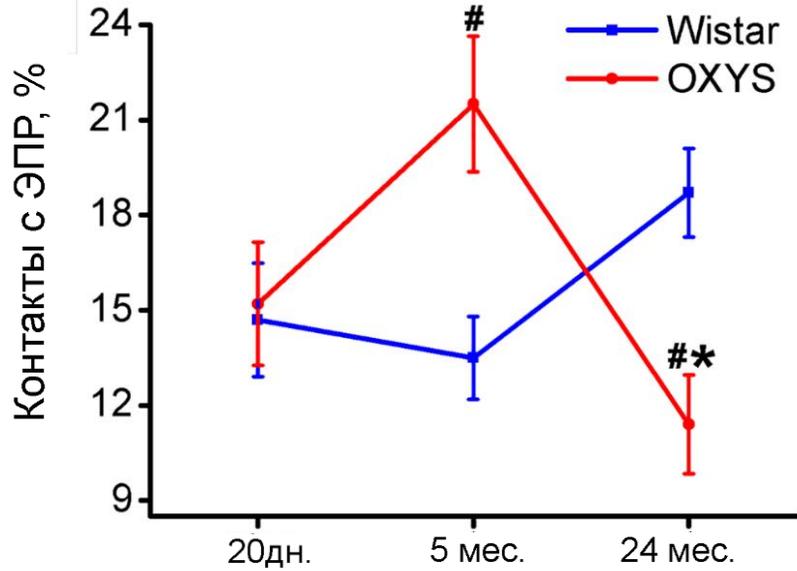
MOAS в отростках нейронов крыс OXYS (а-в) представлены веретеновидными сегментами (черные стрелки), соединенными тонкими мембранными трубками (короткие черные стрелки). Белые стрелки - протяженные митохондрии (г-д). Отдельные округлые митохондрии (белые звездочки) составляют большинство митохондрий нейропиля мозга (е). Бары: 1 мкм.



Тюменцев и др., 2018



В отростках нейронов коры мозга крыс OXYS повышено содержание MOAS (а). Увеличение доли MOAS от общего количества митохондрий отростков нейронов коры мозга крыс OXYS происходит на фоне снижения доли протяженных митохондрий (б).



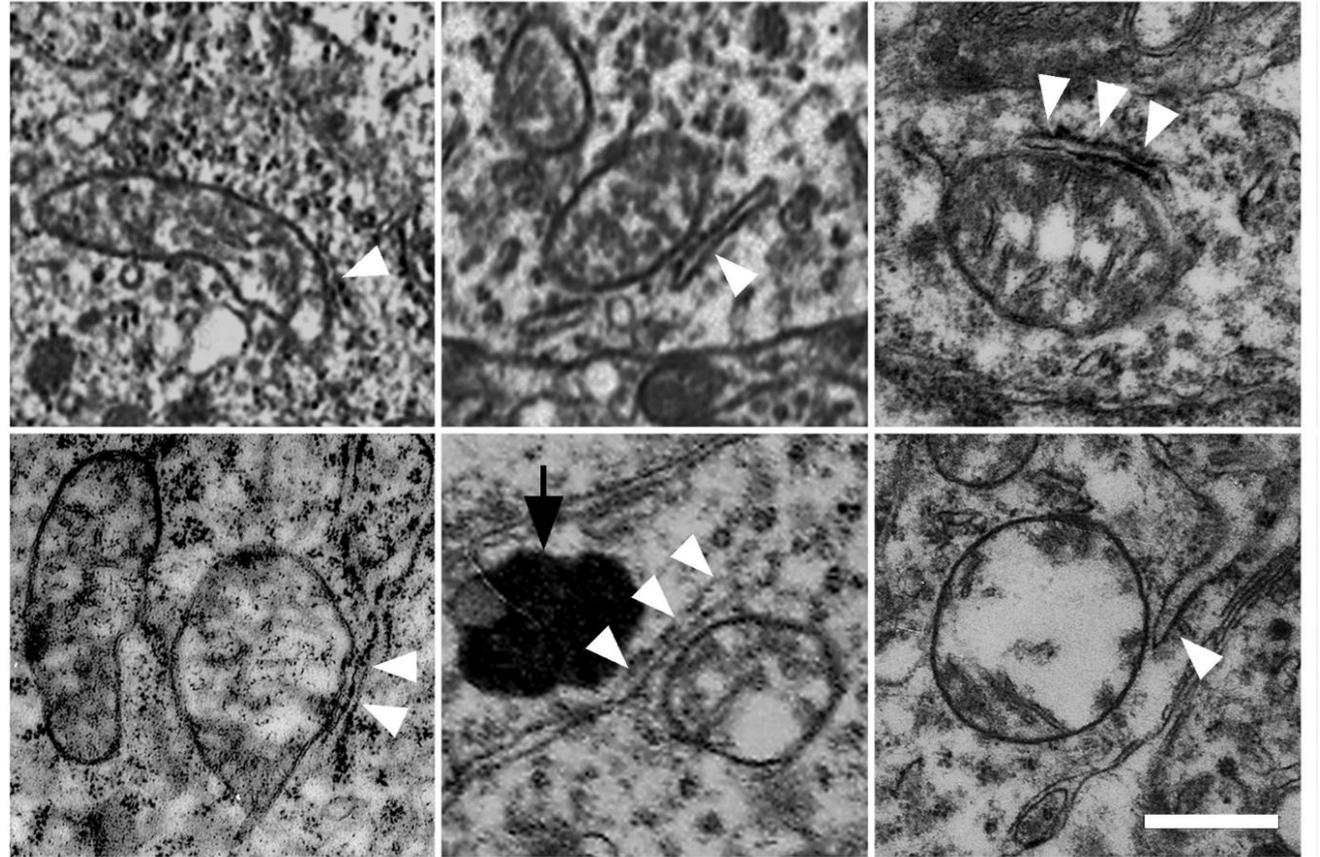
Вистар

OXYS

20 д.

5 мес.

24 мес.

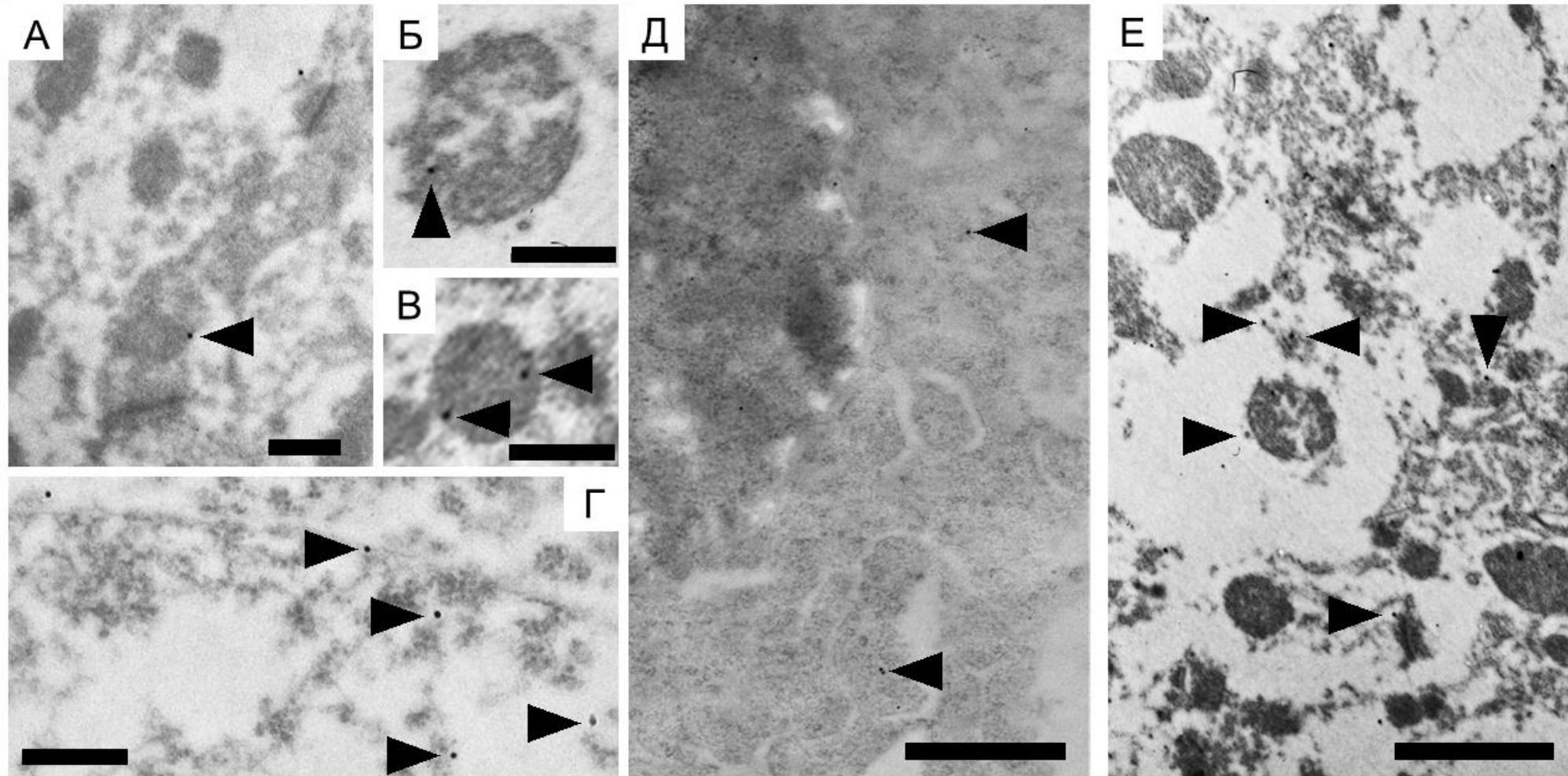


* - различия в сравнении с предыдущим возрастом
- межлинейные различия

Контакты митохондрий с ЭПР играют роль в митохондриальной динамике, митофагии, транспорте липидов и кальциевом сигналинге. После наблюдаемого в возрасте 5 месяцев увеличения количества митохондриальных контактов с ЭПР, к возрасту 24 месяца, на фоне прогрессии признаков БА, у крыс OXYS происходит значительное снижение этого параметра.

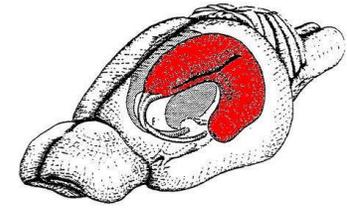
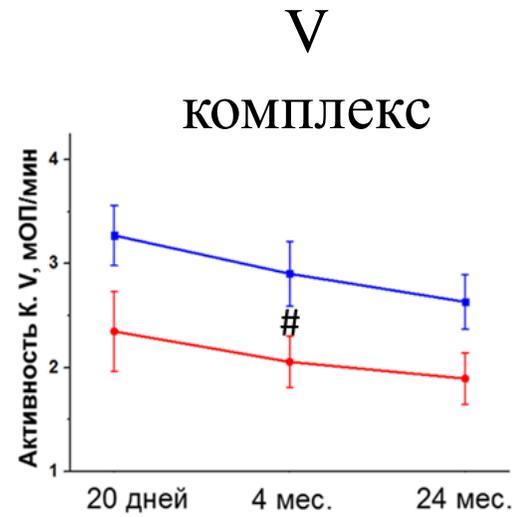
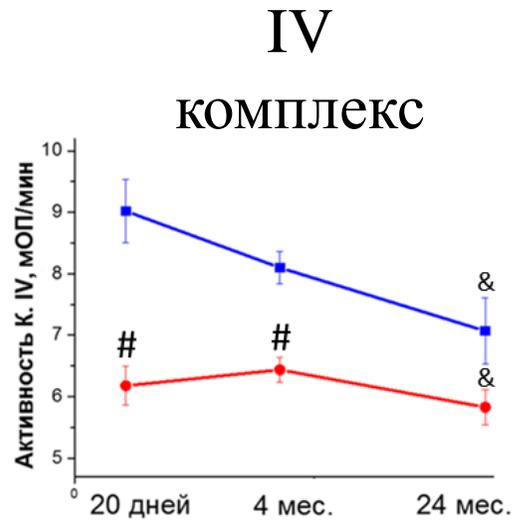
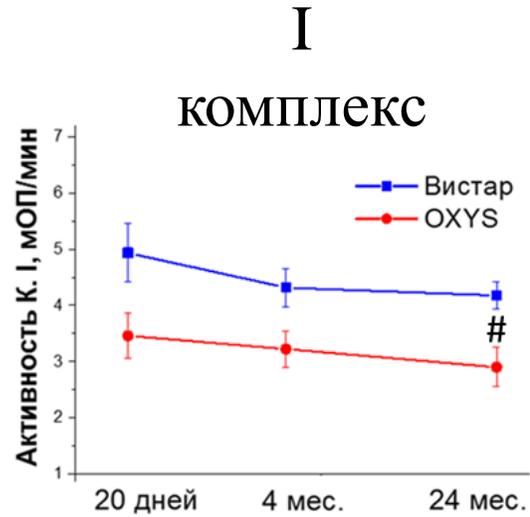
Белые стрелки – контакты митохондрий с ЭПР
Черная стрелка – липофусцин
Бар – 500 нм

Локализация бета-амилоидного пептида в митохондриях региона CA1 гиппокампа крыс OXYS

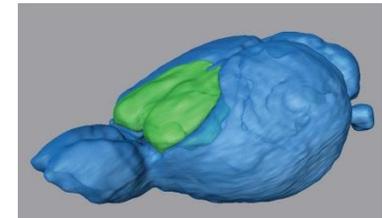
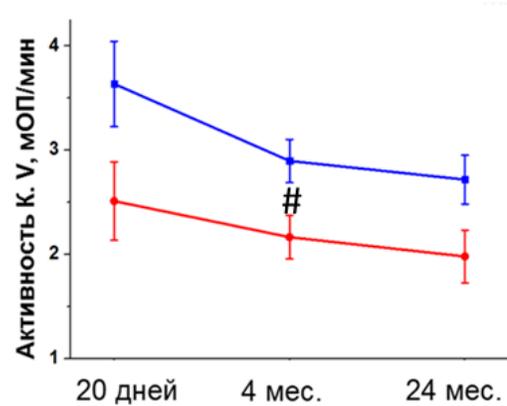
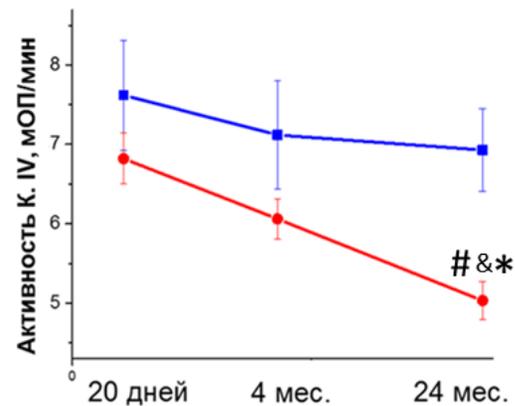
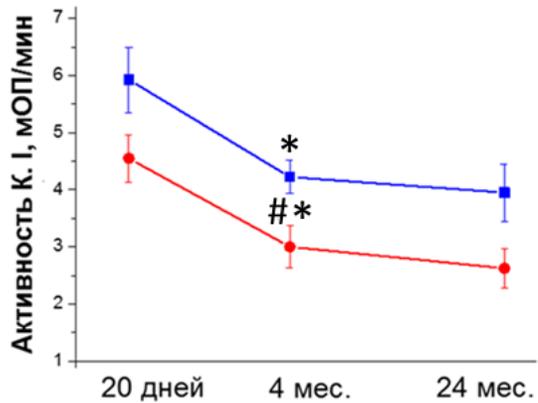


Меченные 10-нм частицами золота, конъюгированными с антителами, растворимые формы A β (черные стрелки) определяются в митохондриях (A-B), ядре (Г), цитоплазме нейронов (Д) и нейропиле (Е) крыс OXYS в возрасте 10 месяцев. Бары 300 нм (A-B), 1 мкм (Г-Е)

Активность комплексов дыхательной цепи митохондрий гиппокампа и коры крыс OXYS снижена



Гиппокамп



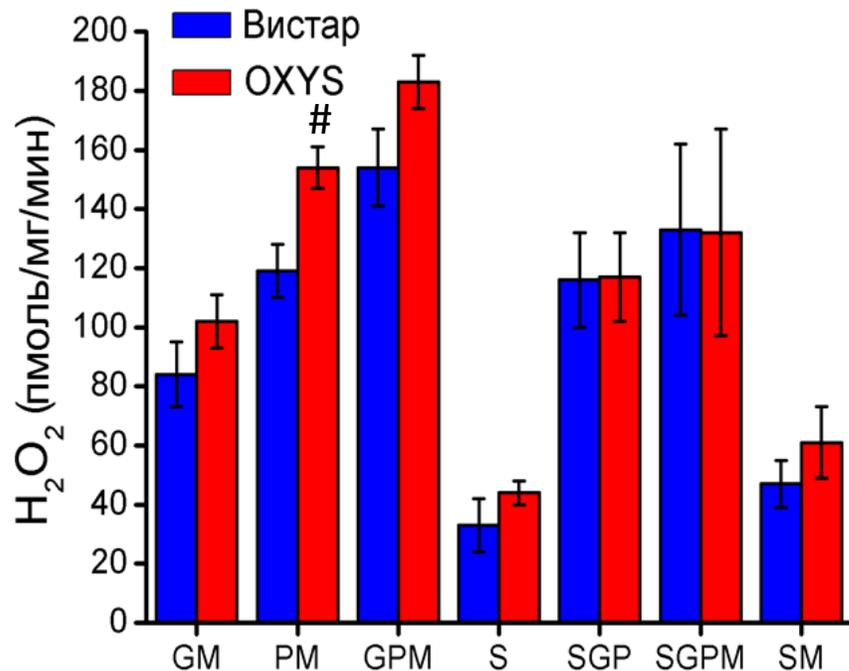
Префронтальная кора

* - по сравнению с предыдущим возрастом
 # - межлинейные различия
 & - по сравнению с 20-ти дневными крысами одной линии

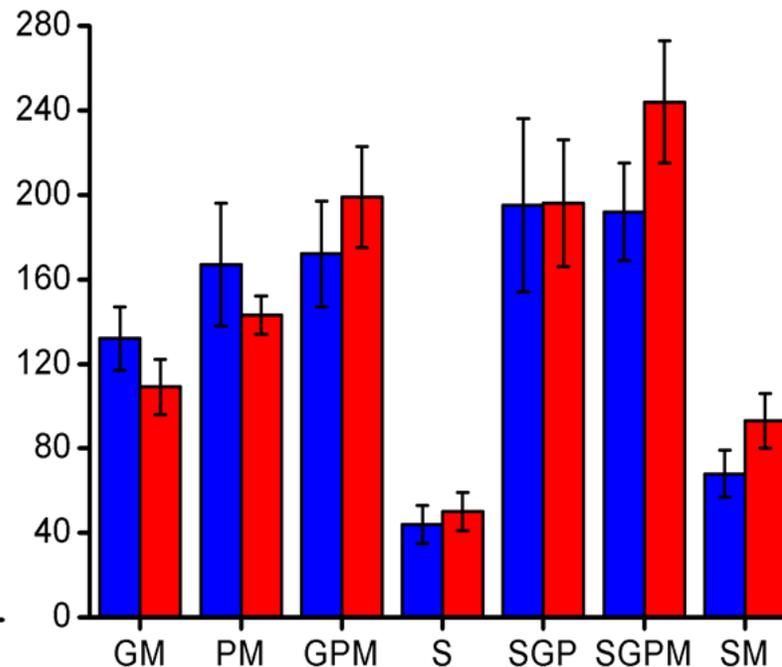
Продукция АФК митохондриями мозга крыс OXYS при развитии признаков болезни Альцгеймера не повышена

Только в «доклинический» период в возрасте 20 дней и при окислении одной комбинации субстратов (пируват+малат) генерация АФК изолированными митохондриями мозга у крыс OXYS выше, чем у Вистар

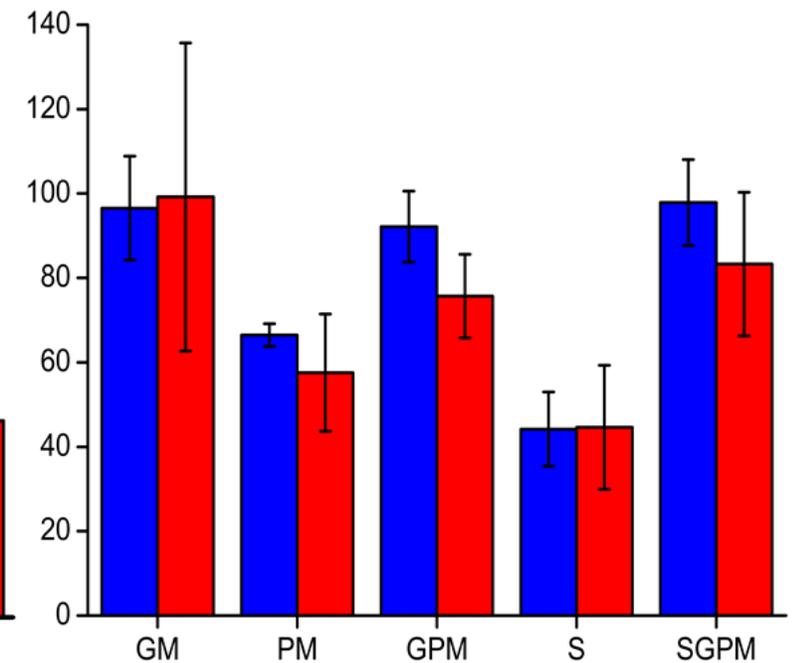
20 дней



3 месяца



24 месяца

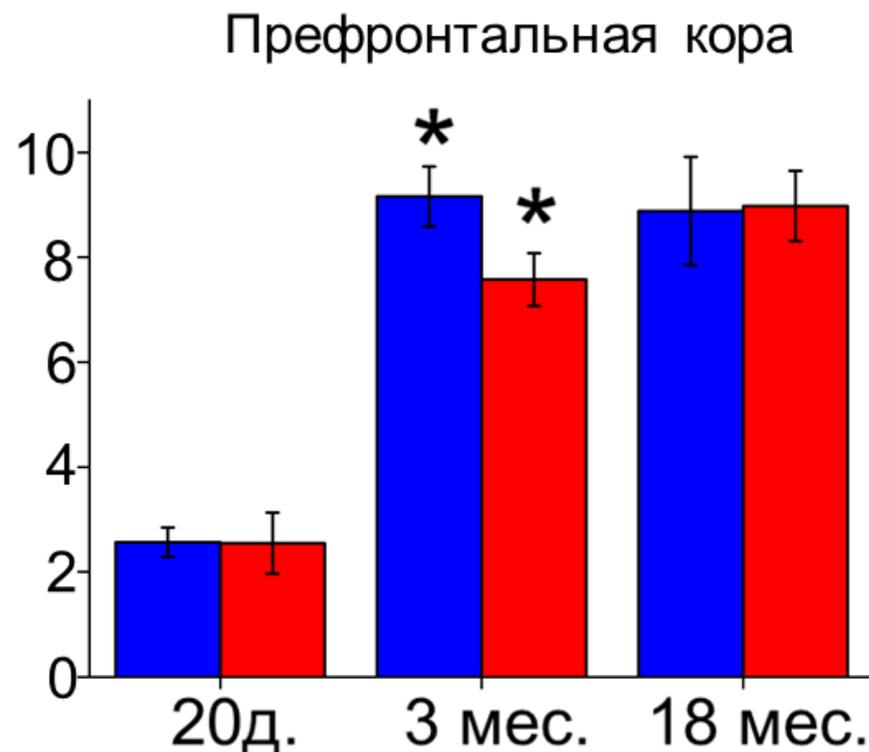
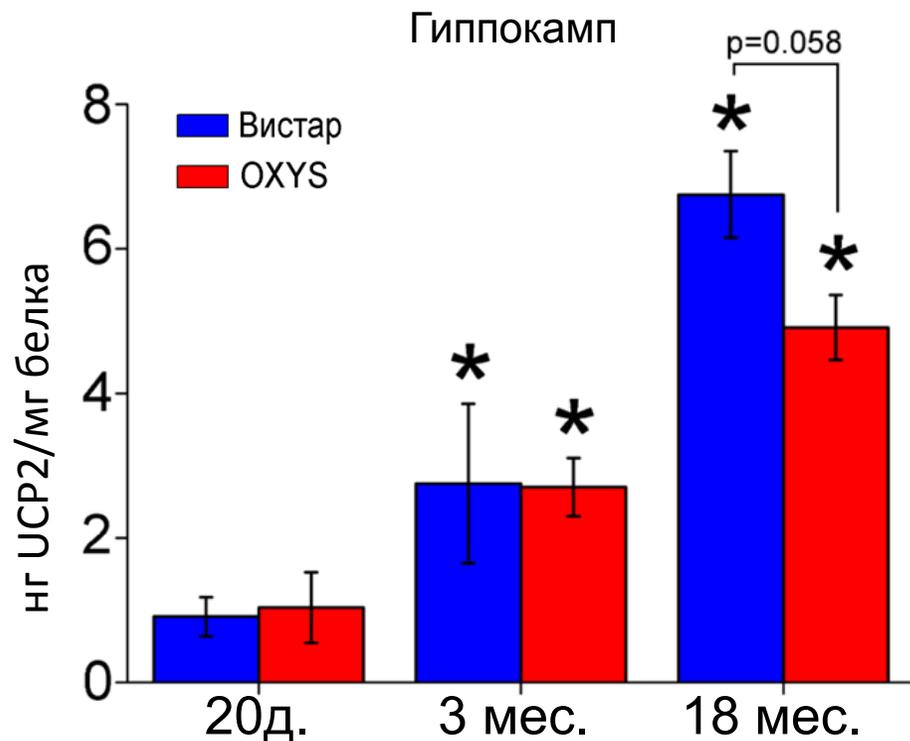


Использованные субстраты:

- G – глутамат
- P – пируват
- M – малат
- S – сукцинат

- межлинейные различия

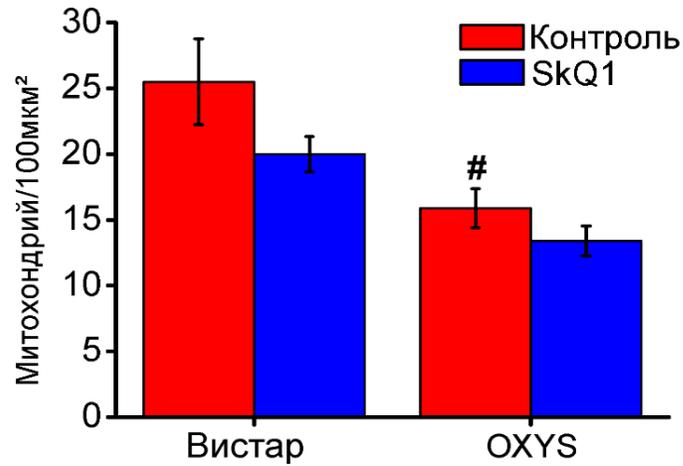
С возрастом происходит значительное увеличение содержания белка UCP2 в гиппокампе и в префронтальной коре



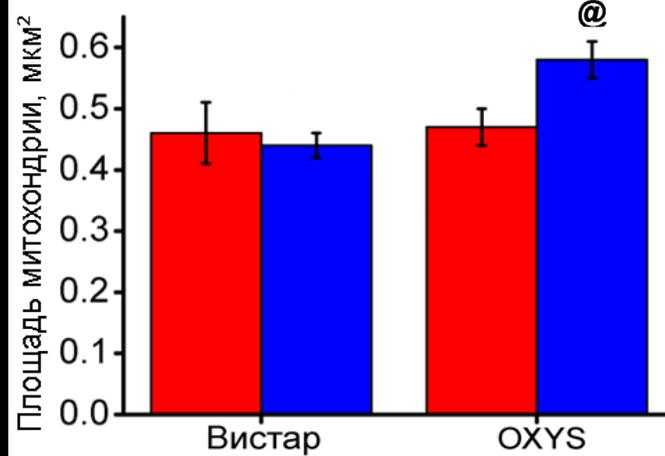
• - межвозрастные различия
p=0.058 межлинейные различия на уровне тенденции

Митохондриальный антиоксидант SkQ1 существенно улучшил ультраструктурные параметры митохондрий у крыс OXYS

Удельное количество митохондрий

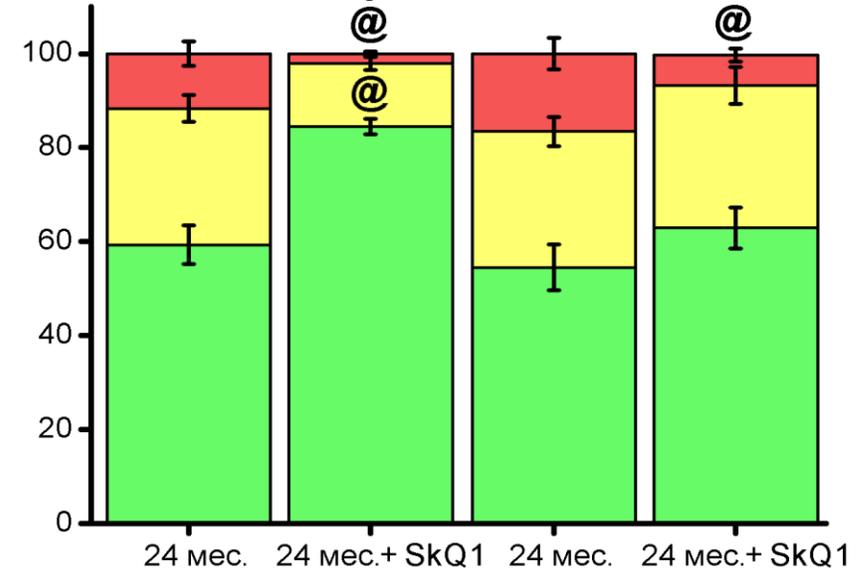


Средняя площадь митохондрии

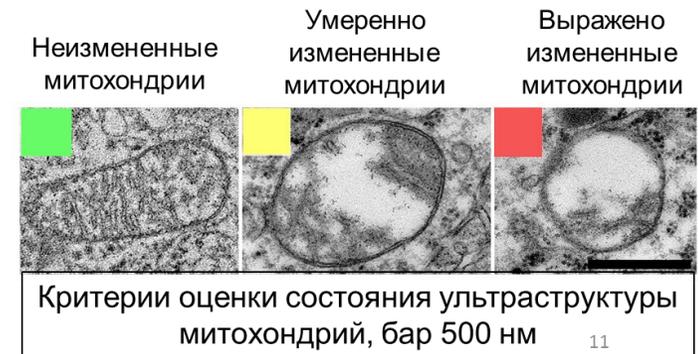


Вистар

OXYS

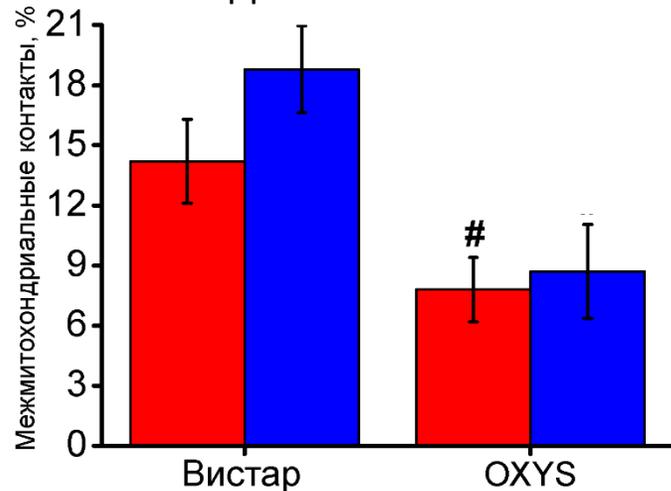


Изменение ультраструктуры митохондрий в нейронах гиппокампа крыс Вистар и OXYS при приеме SkQ1

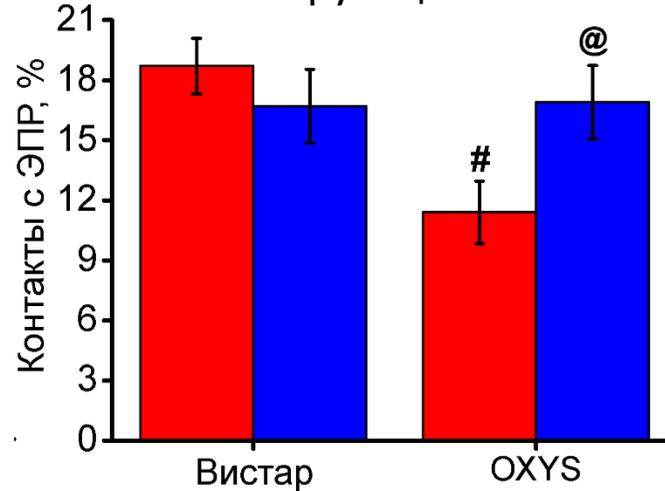


- межлинейные различия
@ - эффект SkQ1

Интенсивность митохондриальной динамики



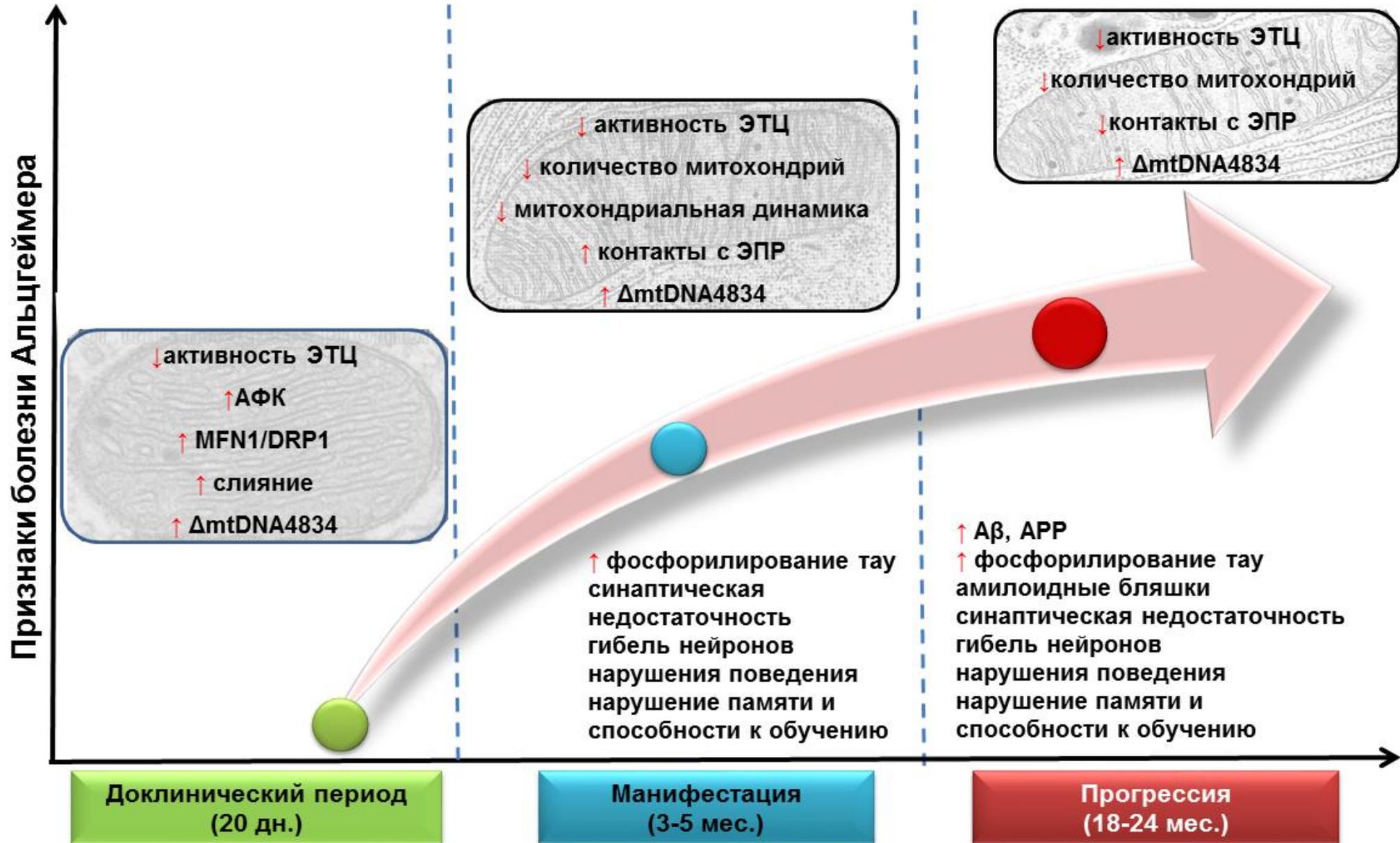
Доля митохондрий, контактирующих с ЭПР



Митохондриальный антиоксидант SkQ1 существенно улучшил ультраструктурные параметры митохондрий у крыс OXYS

Способность митохондриального антиоксиданта SkQ1 смягчать проявление ключевых проявлений БА у старых крыс OXYS связана с частичным восстановлением структурно-функциональных параметров митохондрий нейронов.

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-регуляторов 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.

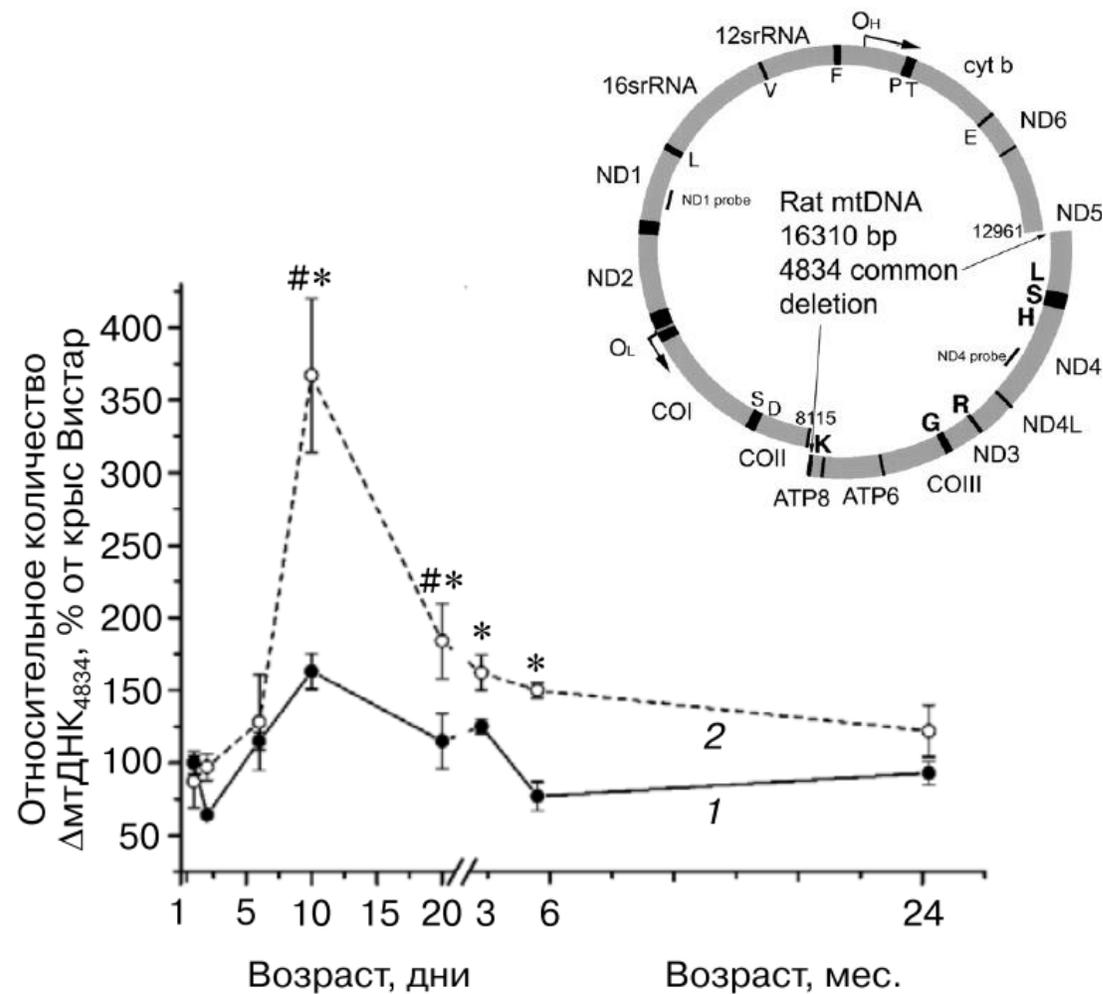
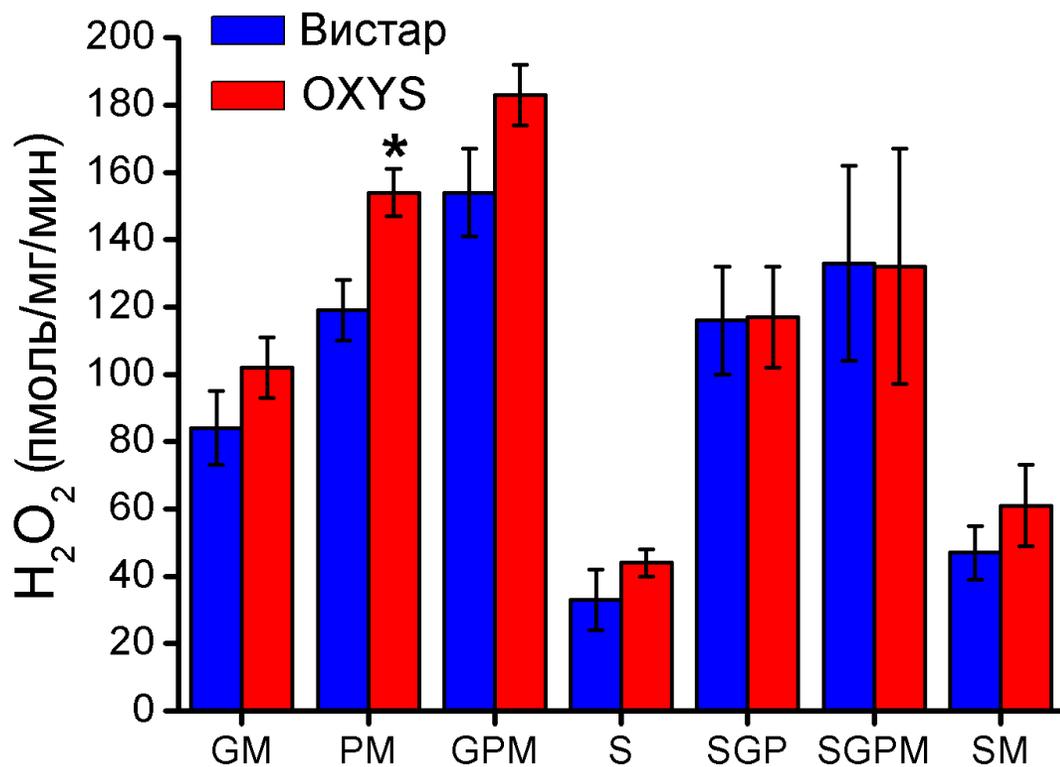
5. Только в возрасте 20 дней и только при окислении одного субстрата - пирувата – генерация АФК в выделенных митохондриях мозга крыс OXYS выше, чем у крыс Вистар. В период манифестации и прогрессии признаков БА у крыс OXYS отличия по этому показателю от одновозрастных крыс Вистар отсутствовали.
6. Содержание митохондриального белка-разобщителя UCP2 растет с возрастом 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 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.

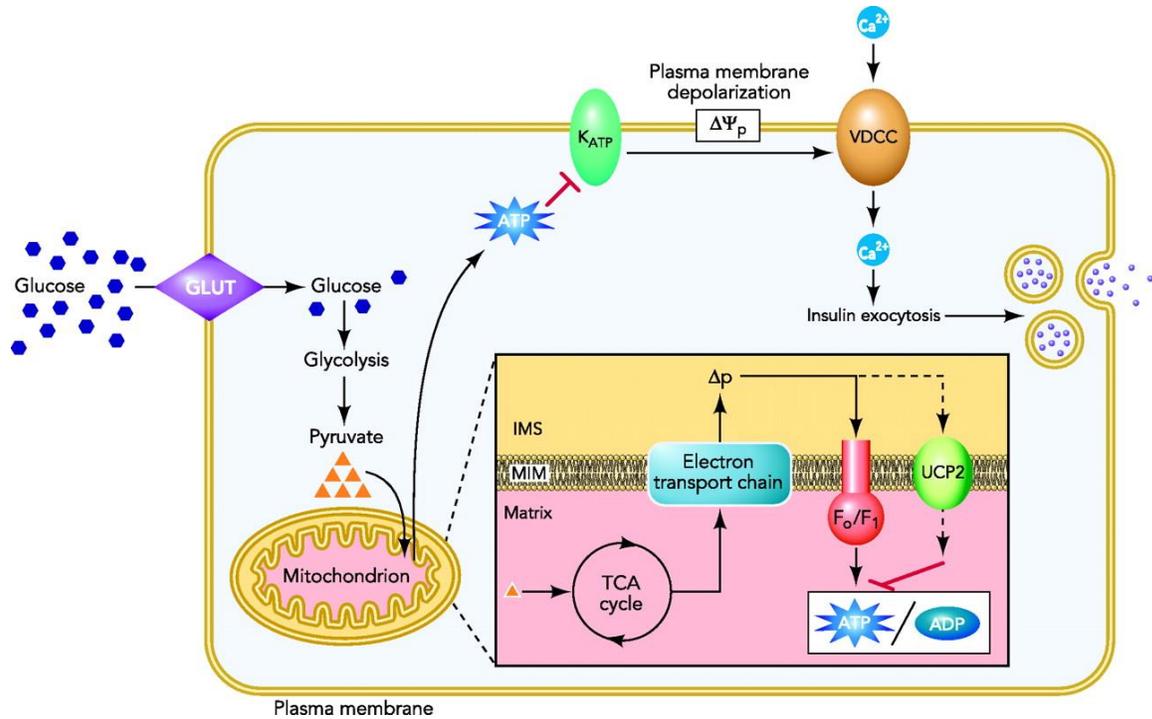
Список работ, опубликованных по теме диссертации

- 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.
- **Tyumentsev M.A**, Stefanova N.A, Muraleva N.A, Rummyantseva 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: JAD. 2018. Vol. 63. №. 3. P. 1075-1088.
- **М.А. Тюменцев**, Н.А. Стефанова, Е.В. Киселева, Н.Г. Колосова. Митохондрии с характерной для пациентов с болезнью Альцгеймера морфологией в мозге крыс OXYS // Биохимия. 2018. – т. 83, вып. 9. – 2018 (в печати).
- 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.
- **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.
- **М.А. Тюменцев**, Н.А. Муралева, Н.А. Стефанова. «Анализ связи развития признаков болезни Альцгеймера у крыс OXYS с дисфункцией митохондрий». // Тезисы докладов Международной конференции, посвященной 100-летию со дня рождения академика АН СССР Д.К. Беляева. Новосибирск, 2017. С. 154.
- **М.А. Тюменцев**, Н.А. Муралева, Н.А. Стефанова. «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.
- **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.

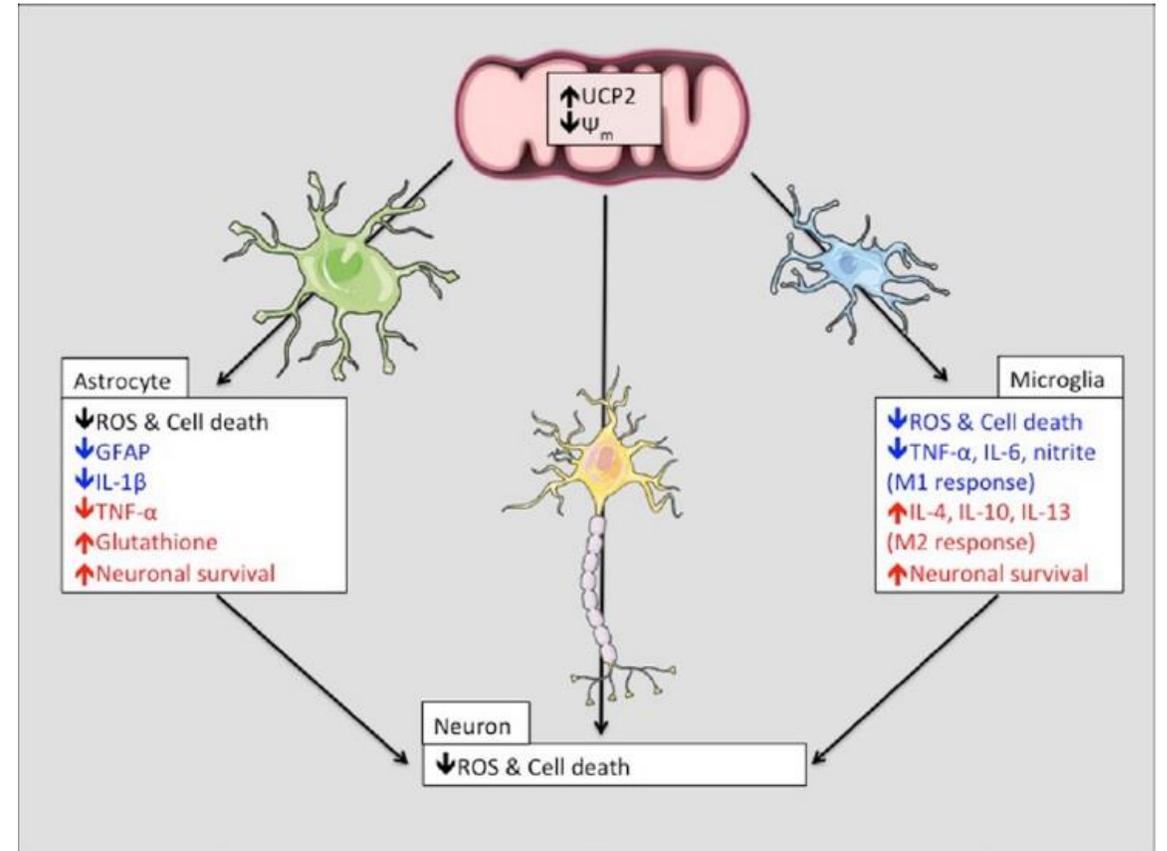
Генерация активных форм кислорода

20 дней



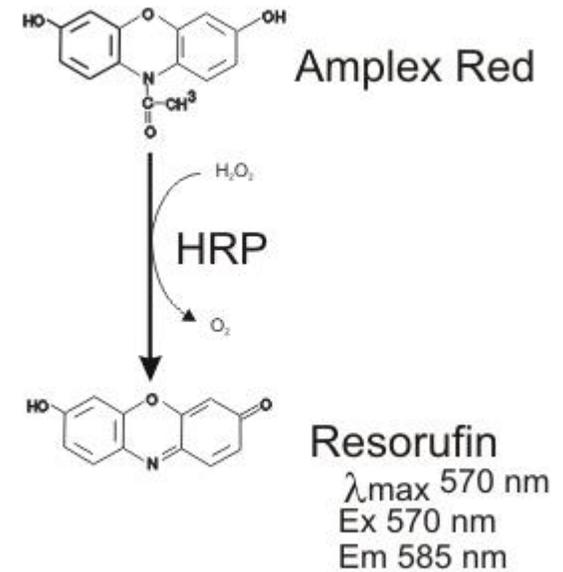
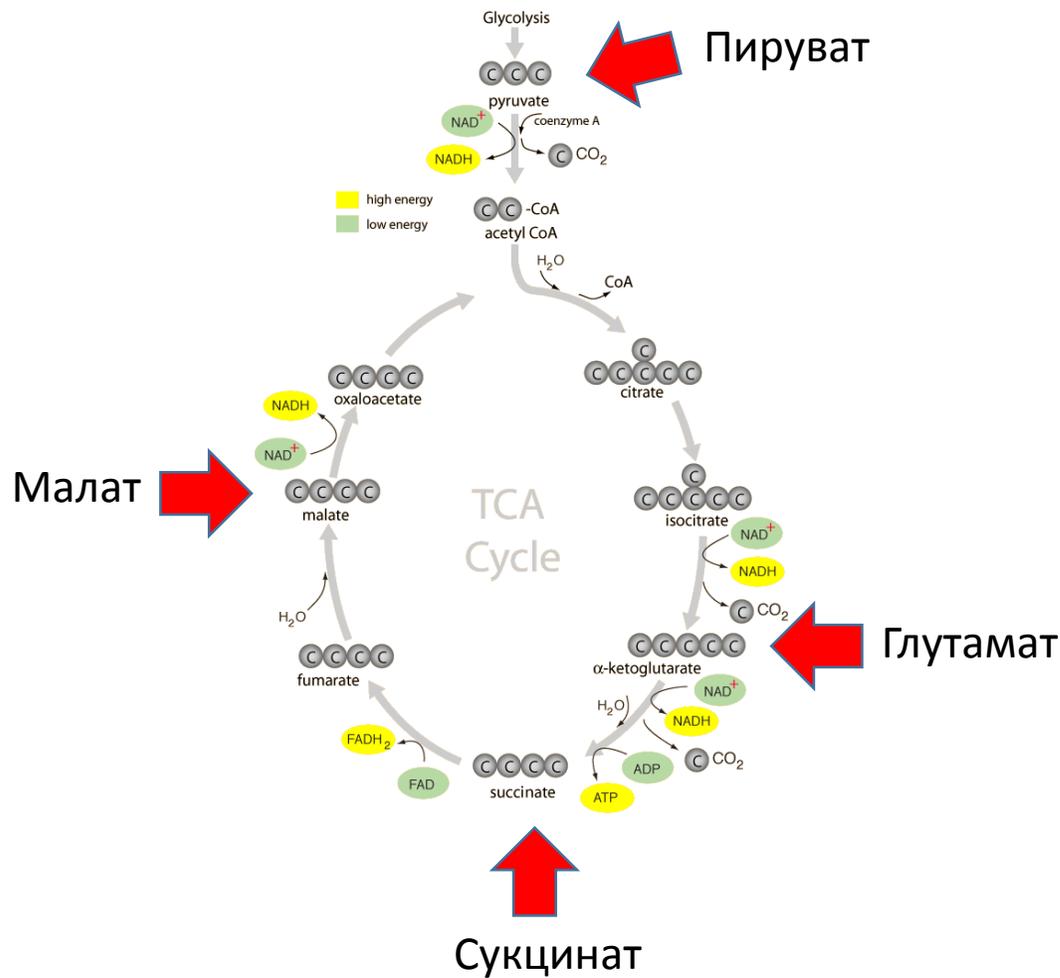


Divakaruni, Brand 2011



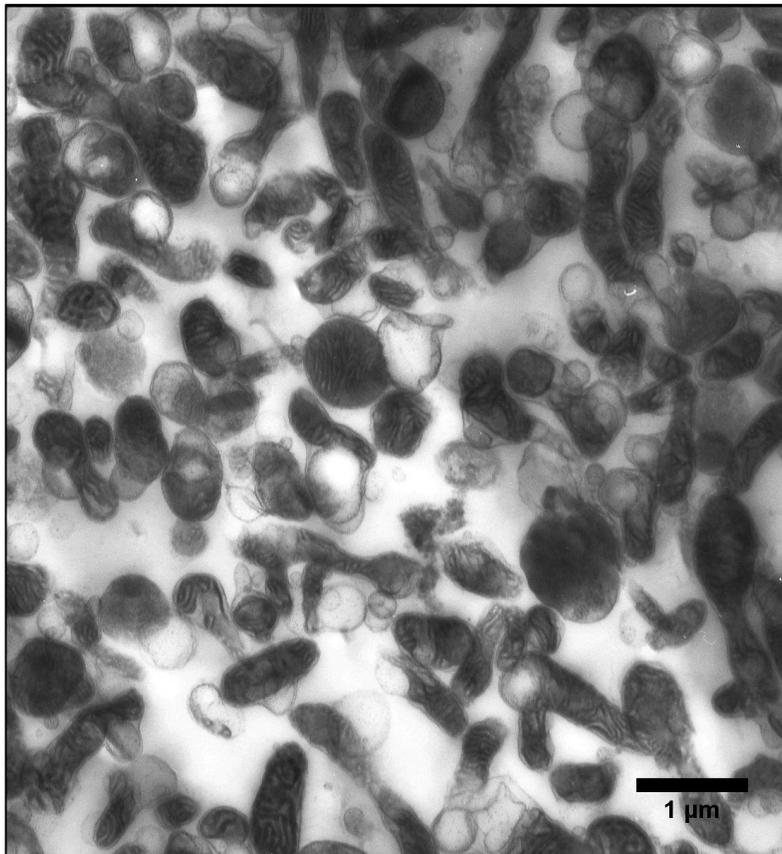
Hass, Barnstable 2016

Генерация активных форм кислорода

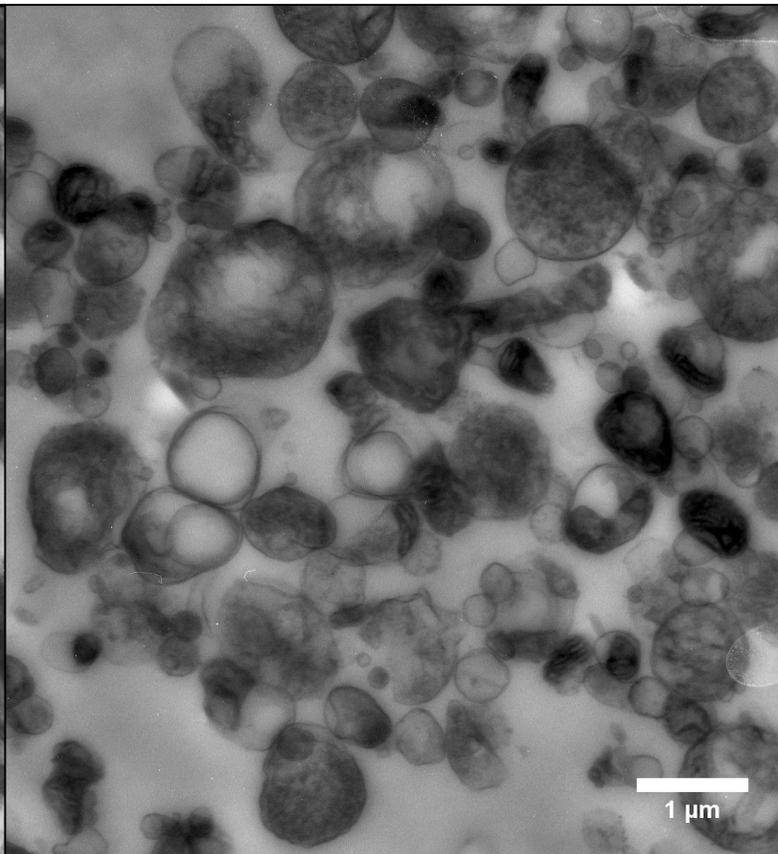


Контроль структурного и функционального
состояния выделенных митохондрий

Электронная микроскопия



Митохондриальная фракция мозга
крысы OXYS в возрасте 1,5 мес.

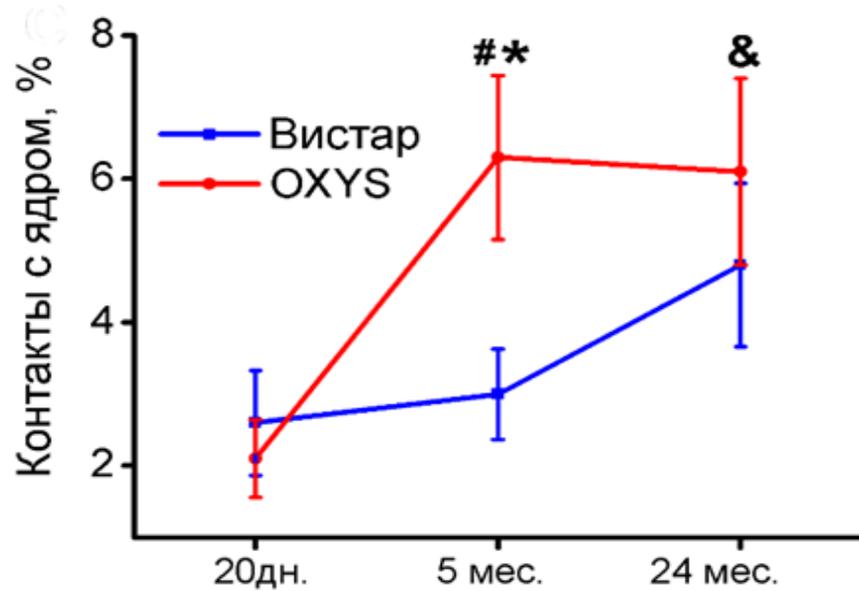


Синапсосомальная фракция мозга
крысы Вистар в возрасте 1,5 мес.

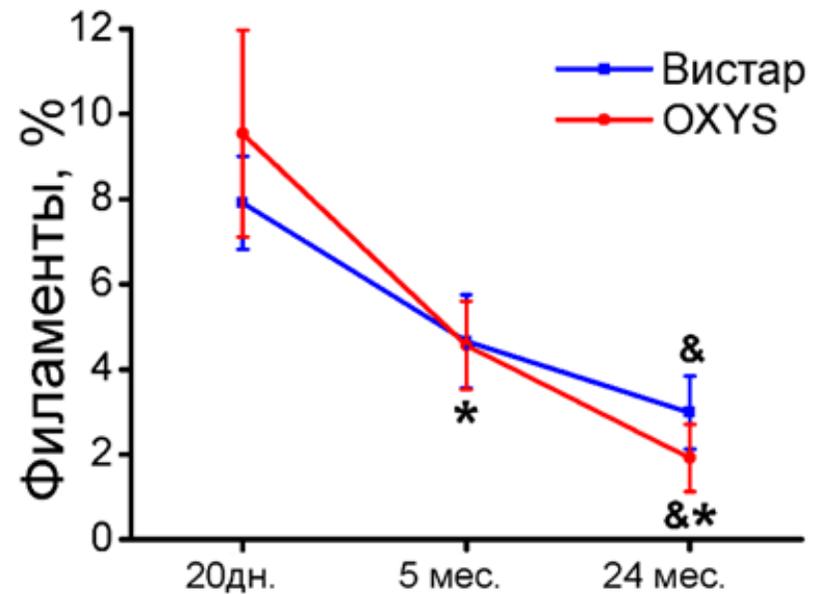


Синапсосомы

Митохондрии

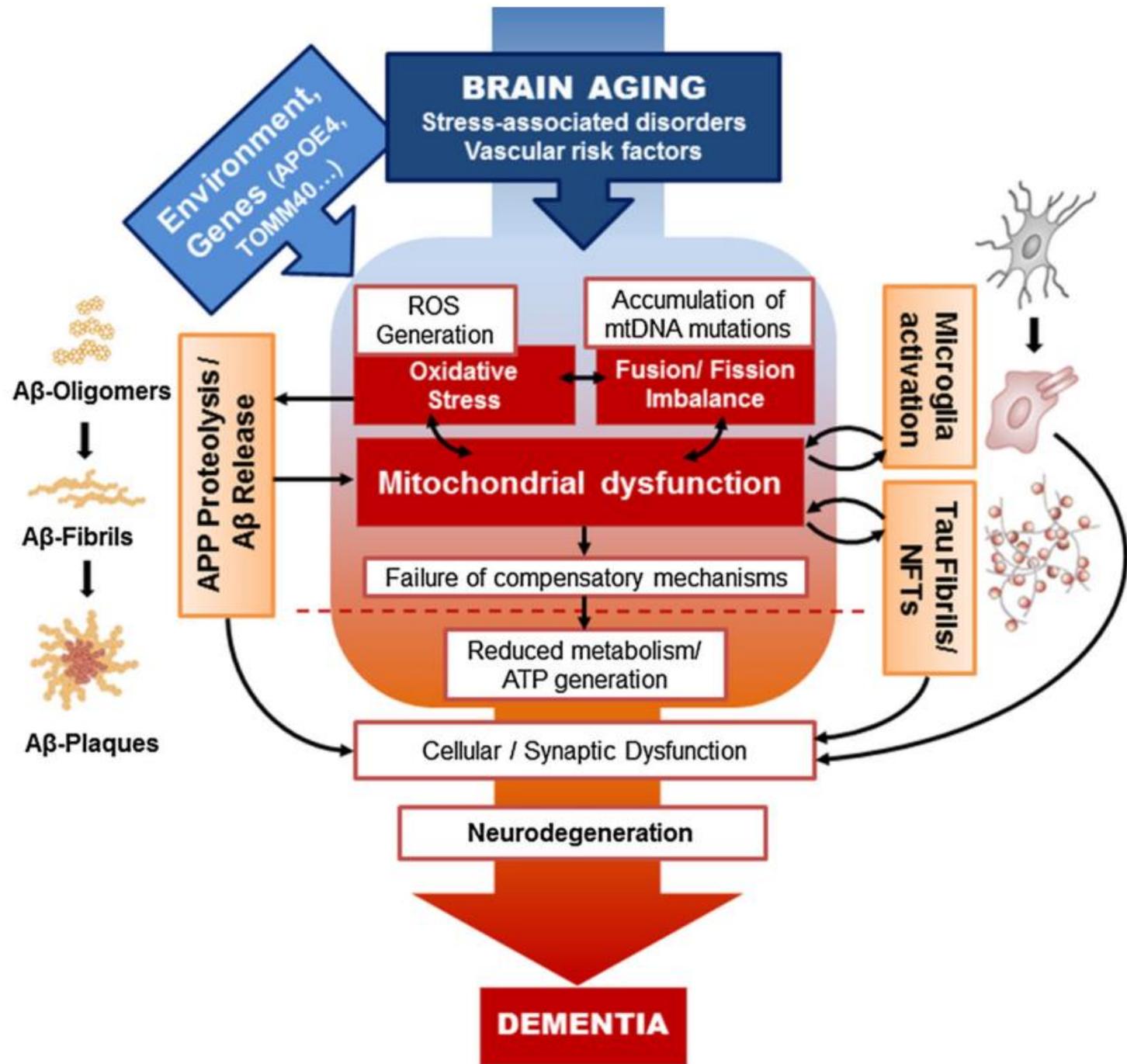


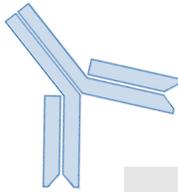
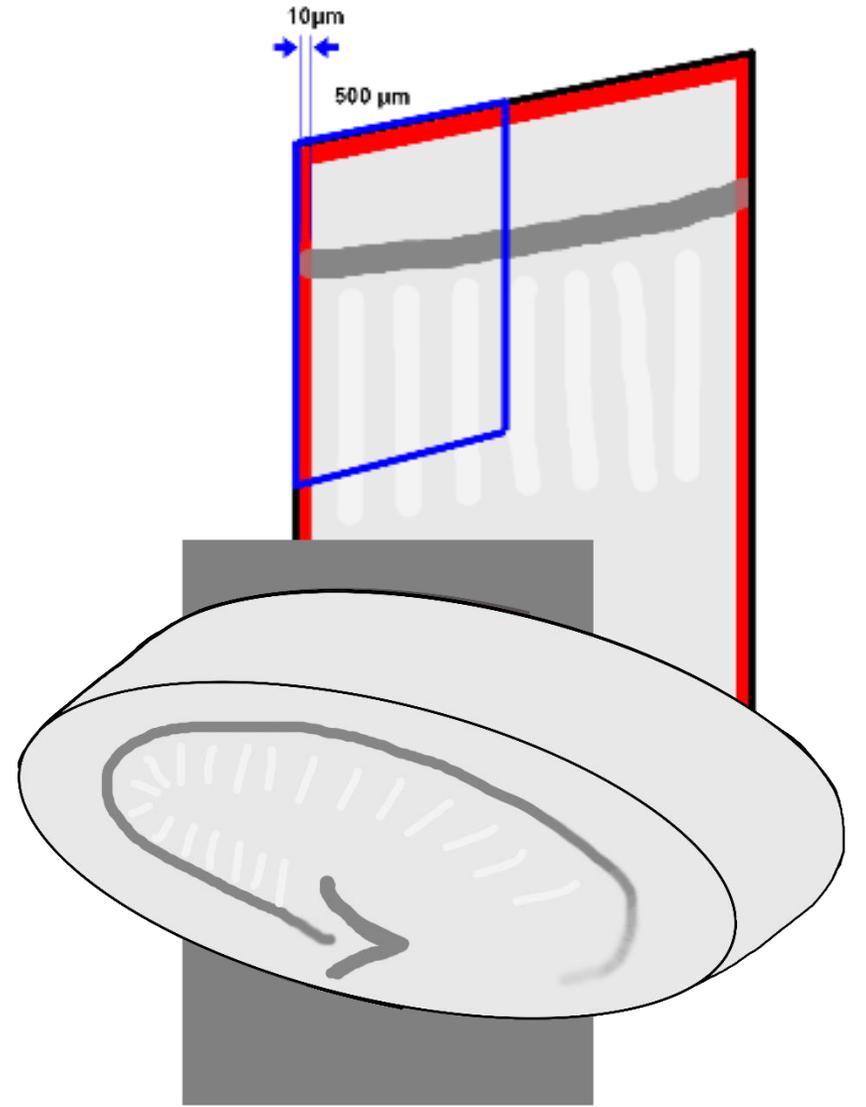
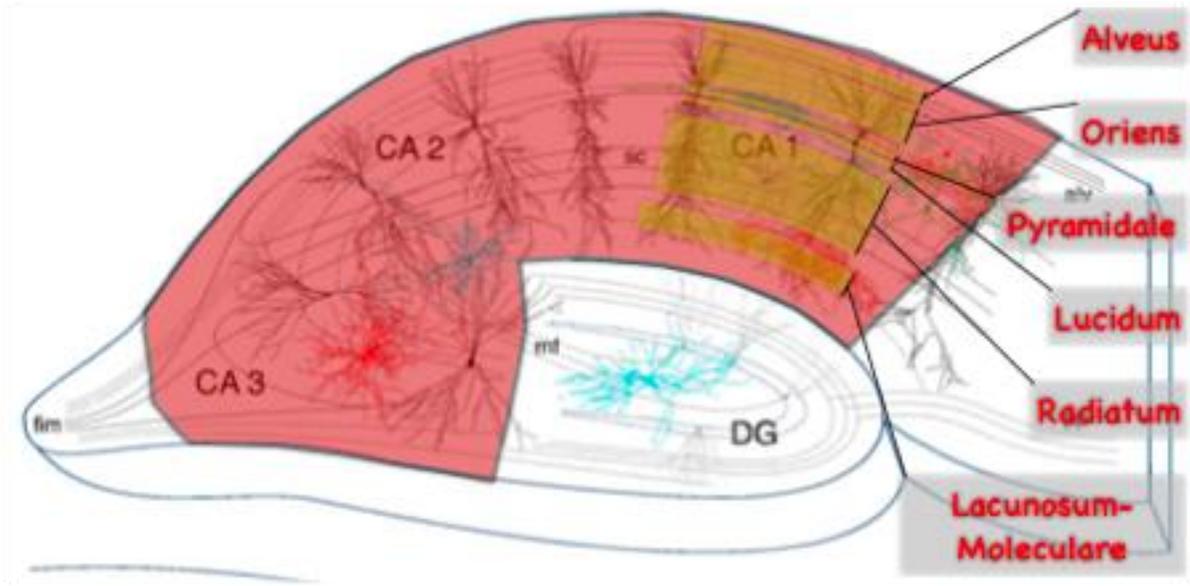
Изменения доли митохондриальных филаментов в нейронах гиппокампа крыс Вистар и OXYS с возрастом.

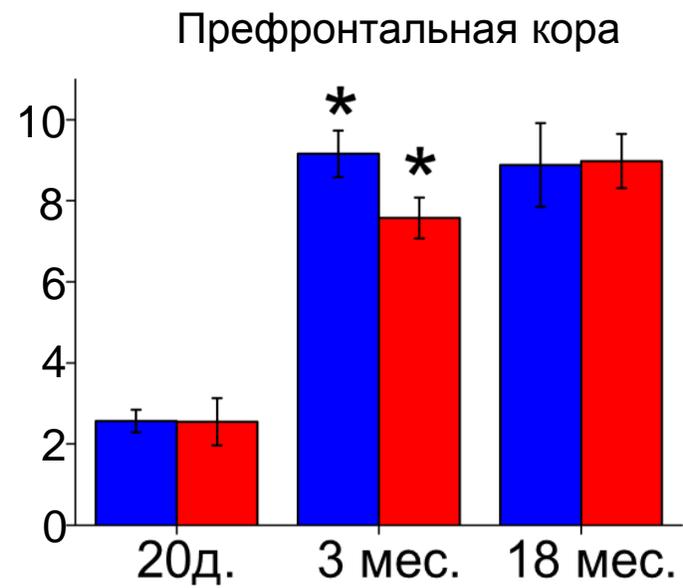


Изменения доли митохондриальных филаментов в нейронах гиппокампа крыс Вистар и OXYS с возрастом.

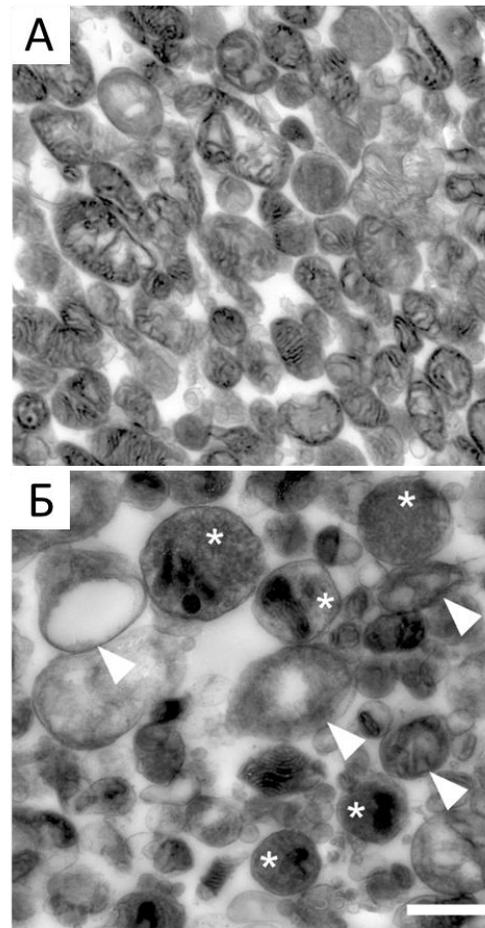
* - по сравнению с предыдущим возрастом
 # - межлинейные различия
 & - по сравнению с 20-ти дневными крысами одной линии







(А) Митохондриальная и
(Б) синапсосомальная
фракции гомогената
мозга,

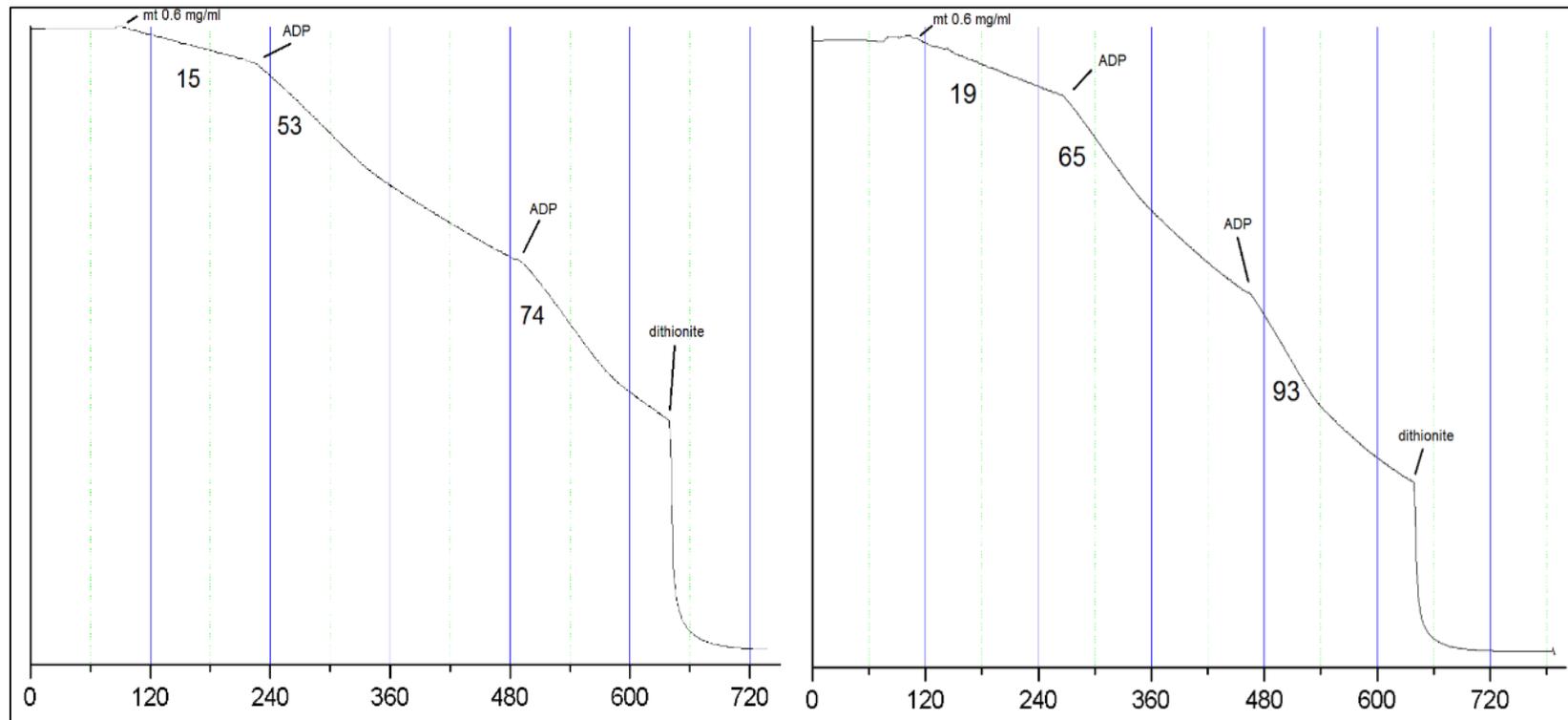


Контроль структурного и функционального состояния выделенных митохондрий

Полярография

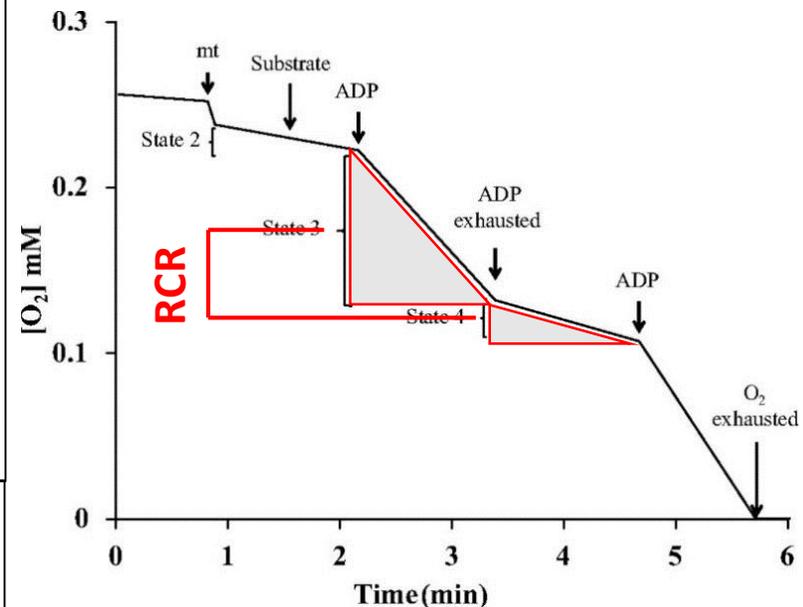
OXY5

Вистар



Окисление глутамат+пируват+малат митохондриями мозга. Значения под графиком – скорости дыхания, нмоль O_2 /мг/мин. mt - митохондрии

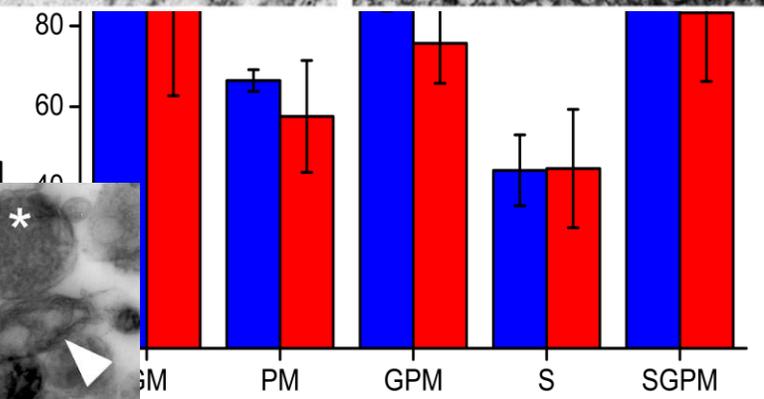
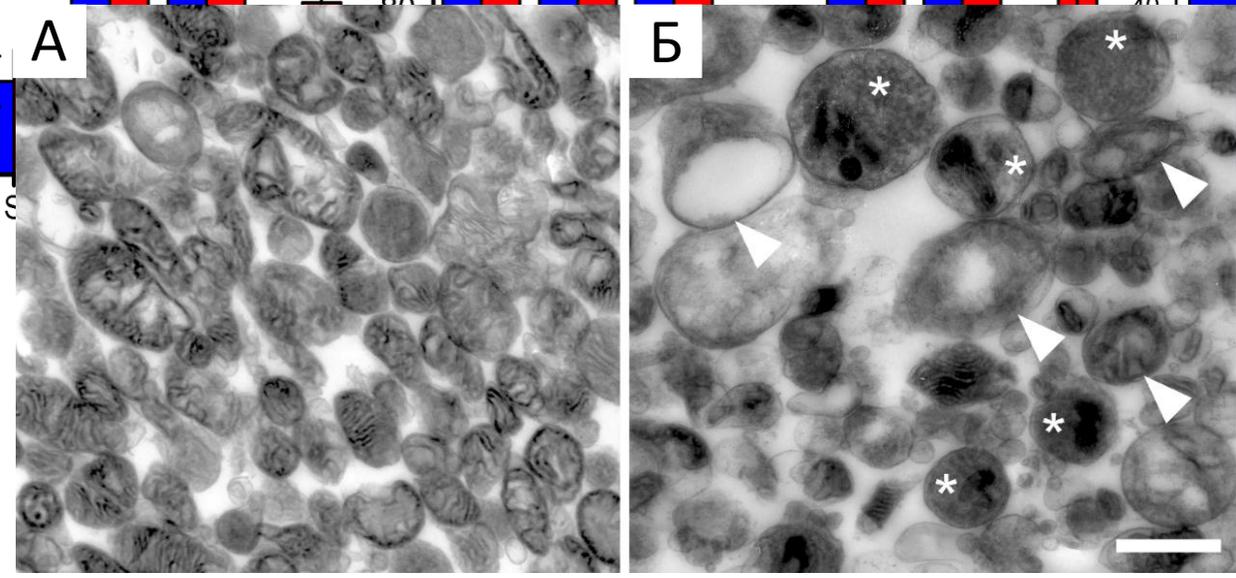
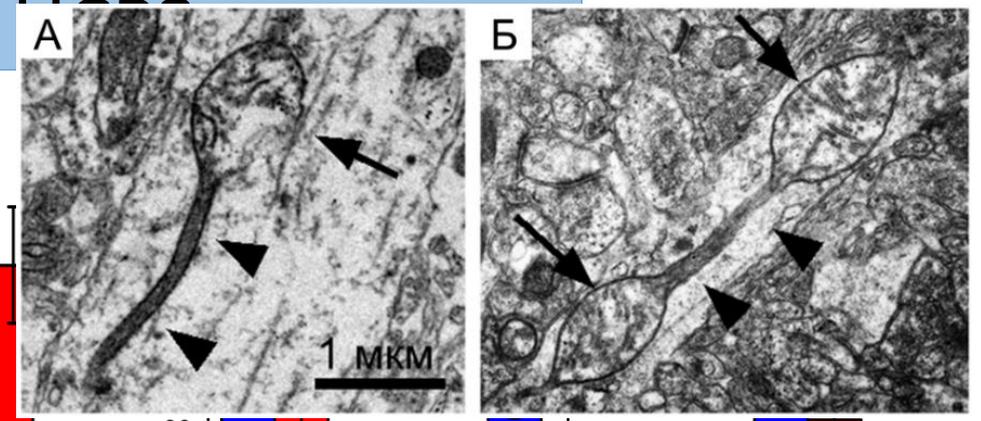
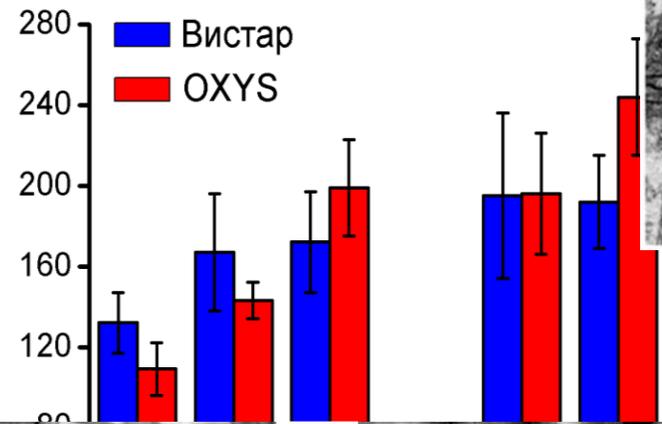
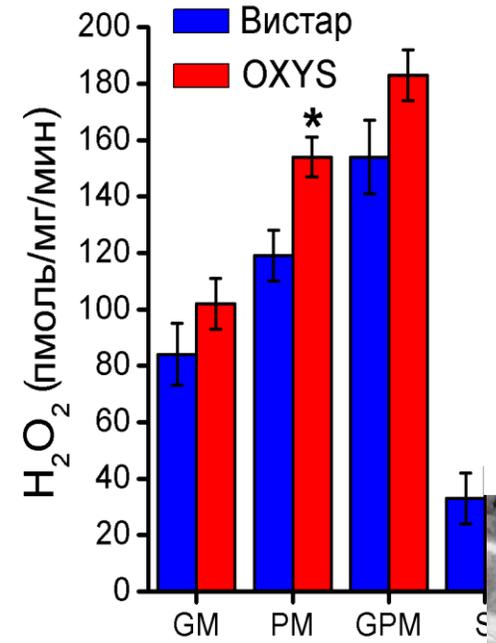
Дыхательный контроль (Respiratory Control Ratio) – отношение скоростей фосфорилирующего и нефосфорилирующего дыхания



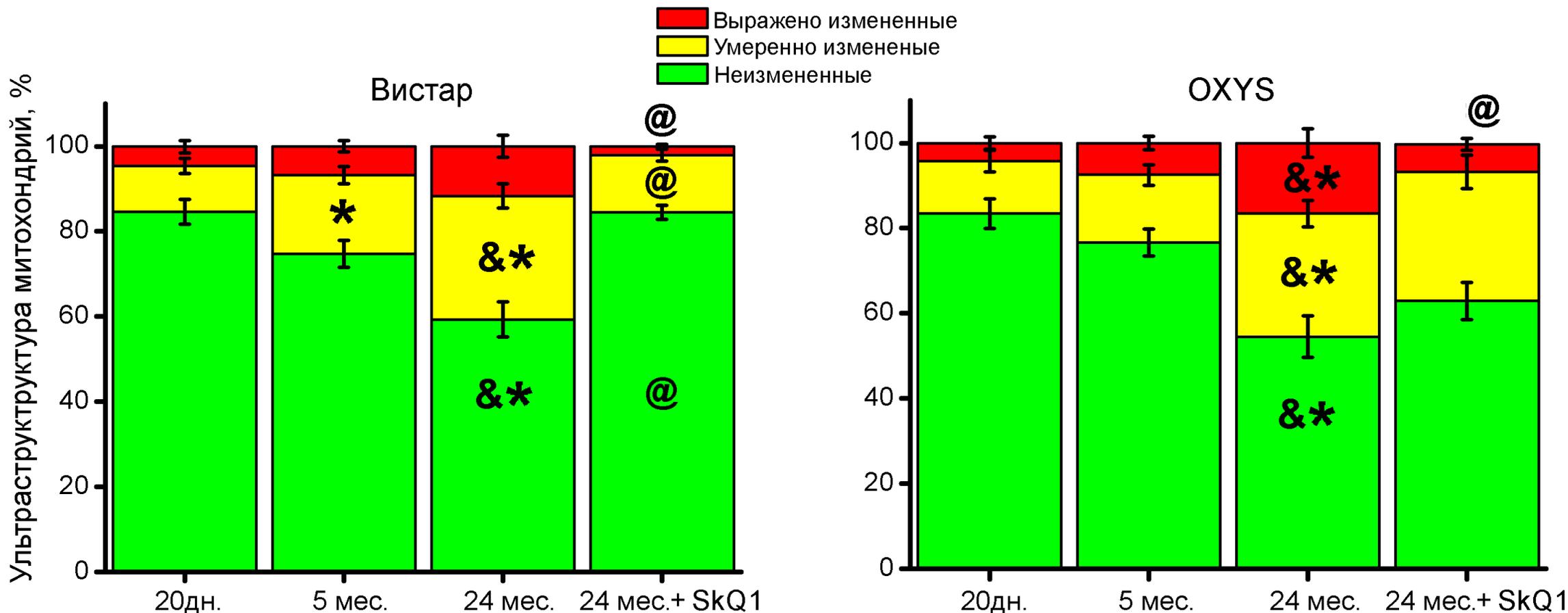
Изменение содержания белка-разобщителя

20 дней

3 месяца



Ультраструктура митохондрий



Изменение с возрастом соотношения количества митохондрий в нейронах гиппокампа интактных крыс Вистар и OXYS и влияние на него антиоксиданта SkQ1. * - $p < 0,05$ по сравнению с предыдущим возрастом, & - $p < 0,05$ по сравнению с 20-ти дневными крысами одной линии, @ - $p < 0,05$ достоверный эффект антиоксиданта SkQ1.

Формальные сведения

- Специальность: *03.03.04* - клеточная биология, цитология, гистология
- Утверждена тема диссертации: “Анализ вклада дисфункции митохондрий в развитие спорадической формы болезни Альцгеймера у крыс OXYS” одобрена на заседании Аттестационной комиссии (Протокол № 1 от 24.12.2014), утверждена Приказом директора №245 от 26.12.2015

- Сданы кандидатские экзамены:

Философия: *отлично*

Английский язык: *отлично*

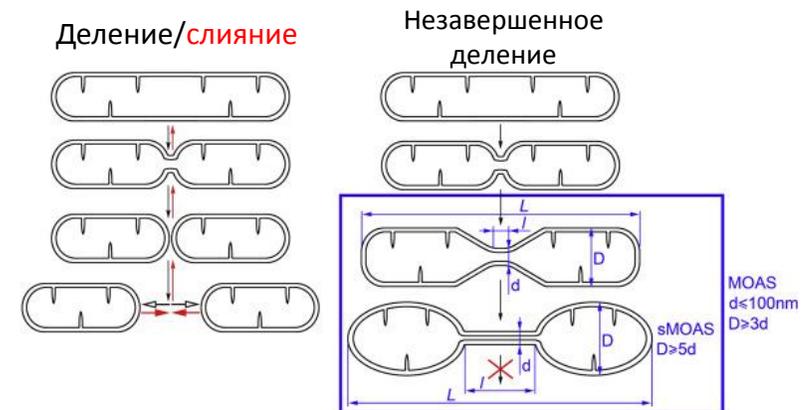
Специальность: *отлично*

- Доклады

- **М.А. Tyumentsev**, E.V. Kiseleva, V.A. Vavilin, N.G. Kolosova, N.A. Stefanova, Mitochondrial Dysfunction In development Of sporadic Alzheimer’s Disease-like Pathology In OXYS Rats, BGRS`16, *постерный доклад*

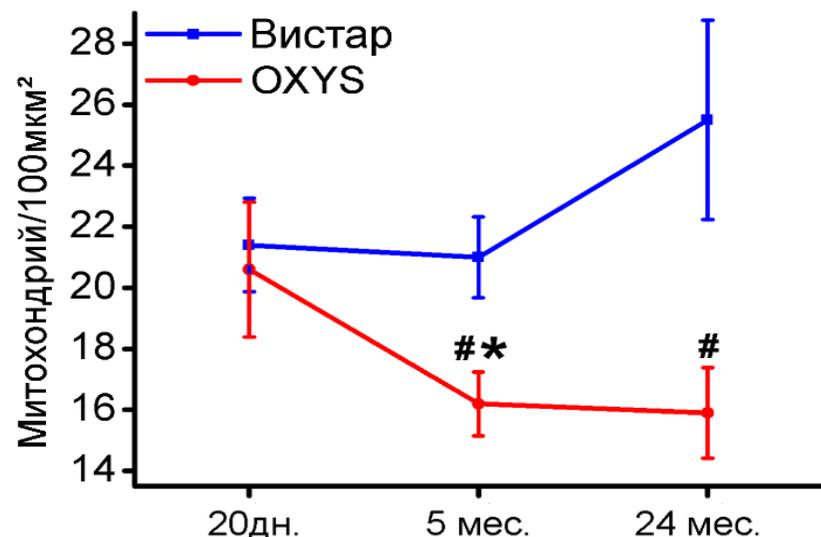
- Публикации

- Nataliya G. Kolosova, **Mikhail A. Tyumentsev**, Natalia A. Muraleva, Elena Kiseleva, Anton O. Vitovtov, Natalia A. Stefanova. Antioxidant SkQ1 Alleviates Signs of Alzheimer’s Disease-like Pathology in Old OXYS Rats by Reversing Mitochondrial Deterioration, Current Alzheimer Research, *submitted*

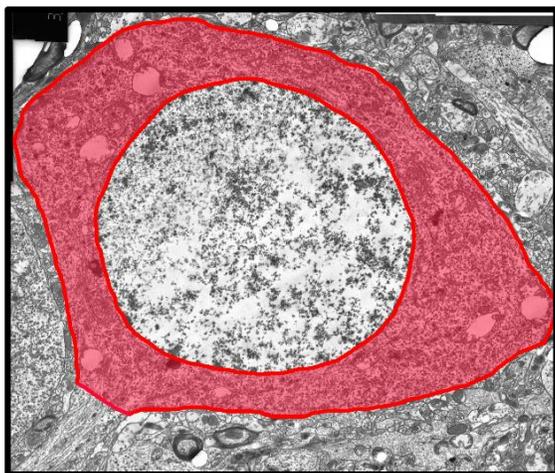
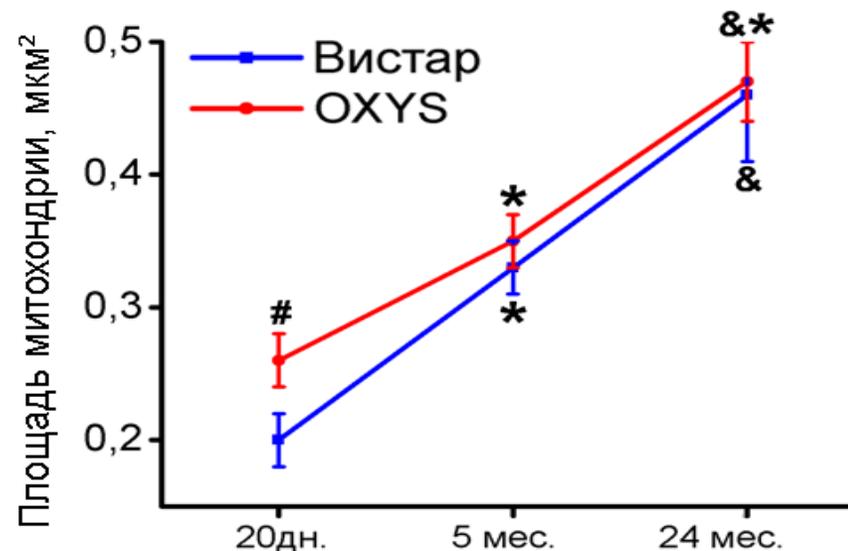


Изменения митохондриального аппарата пирамидных нейронов поля CA1 гиппокампа крыс Вистар и OXYS с возрастом

Удельное количество митохондрий



Средняя площадь митохондрии



- Анализ состояния митохондриального аппарата проводили в телах пирамидных нейронов
- Количество митохондрий нормировали на площадь цитоплазмы

- межлинейные различия $p < 0,05$

* - различия в сравнении с предыдущим возрастом $p < 0,05$

& - различия в сравнении с 20-ти дневными крысами одной линии $p < 0,05$