

Т. Ю. Король, О. П. Костюк

Ушкодження кальційзахоплюючої функції мітохондрій при експериментальній хворобі Альцгеймера

(Представлено академіком НАН України П. Г. Костюком)

Методом двохвильового вимірювання внутрішньоклітинної концентрації кальцію з використанням флуоресцентного барвника fura-2/AM виявлено ушкоджуючий вплив білка β -амілоїду (основного компонента сенільних бляшок при хворобі Альцгеймера) на кальційзахоплюючу функцію мітохондрій нейронів культури гіпокампа щурів.

Нейродегенерація, асоційована з хворобою Альцгеймера, залучає складну систему клітинних та молекулярних взаємодій, включаючи компоненти збуджуючої відповіді, зокрема, ексайтотоксичне та окисне пошкодження, що призводить до метаболічних порушень, ненормальних відкладень білка, цитоскелетних аномалій та клітинної смерті. Накопичення протеїну β -амілоїду ($A\beta$) в мозку, а саме у гіпокампі, медіобазальних відділах лобних частин мозку, а також амігдалярних ядрах, медіальних відділах скроневої частин кори [1] у вигляді сенільних бляшок є визначальною ознакою при маніфестації діагнозу даної хвороби, і цей феномен тісно пов'язаний з порушеннями когнітивної діяльності [2]. β -Амілоїд являє собою основний патологічний маркер при хворобі Альцгеймера та є нерозчинним дериватом великого трансмембранного глікопротеїну — білка-попередника амілоїдного пептиду (APP) [3]. Точна функція останнього невідома, але найбільш імовірним є те, що він бере безпосередню участь у синаптогенезі [4]. В організмі людини в умовах як норми, так і патології була виявлена велика кількість різновидів β -амілоїдів, котрі різняться довжиною амінокислотного ланцюга (від 39 до 43 амінокислотних залишків) [5]. Експериментально було показано, що при хворобі Альцгеймера збільшується концентрація порівняно довгих молекул амілоїдів, а саме молекул із 42 амінокислотними залишками [3, 5].

Відомо, що кальцій має істотне значення для функціонування клітини взагалі і нейронів зокрема. Іони кальцію відіграють важливу роль в опосередкуванні таких процесів, як екзоцитоз і, відповідно, синаптична передача, транскрипція генів, синаптична пластичність [6]. Зміни концентрації кальцію всередині клітини відбуваються завдяки функціонуванню не тільки мембранних каналів, але й внутрішньоклітинних кальційрегулюючих структур (ендоплазматичного ретикулуму, мітохондрій) та ензимів (кальційзалежних АТФаз). Дослідження останніх років дають підґрунтя вважати, що мітохондрії беруть безпосередню участь у регуляції внутрішньоклітинної концентрації кальцію не тільки при його патологічному рівні, але й у фізіологічних умовах [7]. Відкриття в останні роки нових флуоресцентних індикаторів іонів кальцію зробило доступним дослідження мітохондріального захоплення кальцію в живих клітинах. Кальцієві сигнали у клітинах, завантажених мітохондріальним барвником екворіном, супроводжувались швидким та потужним збільшенням внутрішньо-мітохондріальної концентрації кальцію [7, 8].

Встановлено, що β -амілоїд може порушувати кальцієвий гомеостаз шляхом посилення вивільнення кальцію з внутрішньоклітинних депо ендоплазматичного ретикулуму [9], а також внаслідок утворення каналів, сформованих самим β -амілоїдом [10] та, відповідно,

призводити до порушення функціонування мітохондрій. Як відомо з літературних джерел, Гібсон був одним з перших, хто запропонував ідею того, що ХА обов'язково супроводжується порушенням енергетичного метаболізму нейрона [11].

У даній роботі ми намагались прослідкувати зміни у функціонуванні кальційзахоплюючої функції мітохондрій у культивованих нейронах гіпокампа щурів за умов 24-годинної інкубації з β -амілоїдом.

Матеріали та методи. Експерименти проводили на культивованих нейронах гіпокампа самців щурів лінії Вістар. Для отримання експериментальної моделі хвороби Альцгеймера β -амілоїд додавали до культурального середовища в кінцевій концентрації 2 мкМ за 24 год до експериментів для вимірювання внутрішньоклітинної концентрації кальцію ($[Ca^{2+}]_i$) в нейронах культури гіпокампа. Культивування нейронів гіпокампа здійснювали за методикою, описаною раніше в [12]. Для вимірювання $[Ca^{2+}]_i$ культивовані клітини гіпокампа завантажували мембранопроникною формою барвника fura-2/AM у концентрації 5 мкМ. Сигнали, які відповідали двом довжинам хвиль збудження, зберігали за допомогою комп'ютера з програмним забезпеченням "Tida" ("Batelle", ФРН). Зміни $[Ca^{2+}]_i$ в цитоплазмі клітин гіпокампа розраховували за формулою Grynkiewicz [13].

Числові дані представлені як середньоарифметичні \pm середньоквадратична похибка (SEM) ($M \pm m$).

Після кожного результату наводиться значення n , яке дорівнює кількості досліджених клітин у незалежних експериментах.

Для оцінки достовірності відмінностей використовувалась величина P , розрахована з використанням t -тесту Ст'юдента. Критерієм достовірності відмінностей було обрано значення $P < 0,05$.

Результати та їх обговорення. Для дослідження впливу мітохондрій на амплітуду та кінетику кальцієвих сигналів, викликаних гіперкалієвою деполяризацією, ми використовували позаклітинну аплікацію СССР (carbonyl cyanide 3-chlorophenylhydrazone) — протонифора, який у концентрації 1–10 мкМ викликає руйнування протонного градієнта на внутрішній мембрані мітохондрій та блокує роботу мітохондріального уніпортера, що призводить до порушення акумулювання мітохондріями цитозольного кальцію та підвищення концентрації $[Ca^{2+}]_i$.

У контрольних умовах амплітуда кальцієвого транзйєнта у відповідь на аплікацію гіперкалієвого розчину становила 508 ± 30 нМ ($n = 15$). При деполяризації ж контрольних клітин гіперкалієвим розчином в присутності СССР (10 мкМ) відбувалось додаткове підвищення $[Ca^{2+}]_i$ (рис. 1), амплітуда якого достовірно перевищувала величину кальцієвого транзйєнта, викликаного прикладанням гіперкалієвого розчину, досягаючи значення 625 ± 39 нМ ($P < 0,05$, $n = 15$). Крім того, відбувалось уповільнення фази спаду транзйєнта, особливо виражене протягом його перших кількох десятків секунд. Це вказує на те, що мітохондрії певною мірою обмежують амплітуду кальцієвого транзйєнта, викликаного деполяризацією, загальмовуючи його початкову фазу, а також на те, що концентрація кальцію у мітохондріях зростає під час наростання та під час спаду транзйєнта.

Після преінкубації культури нейронів гіпокампа з β -амілоїдом відбувалась зміна кінетики кальцієвих сигналів, викликаних прикладанням СССР, розчиненого в гіперкалієвому розчині в концентрації 10 мкМ, порівняно з відповідними значеннями при застосуванні гіперкалієвого розчину без СССР (рис. 2). Співвідношення амплітуд транзйєнтів достовірних змін не зазнало: при аплікації гіперкалієвого розчину значення амплітуди транзйєнта становило 644 ± 62 нМ, а при прикладанні гіперкалієвого розчину з СССР — 697 ± 66 нМ ($n = 9$).

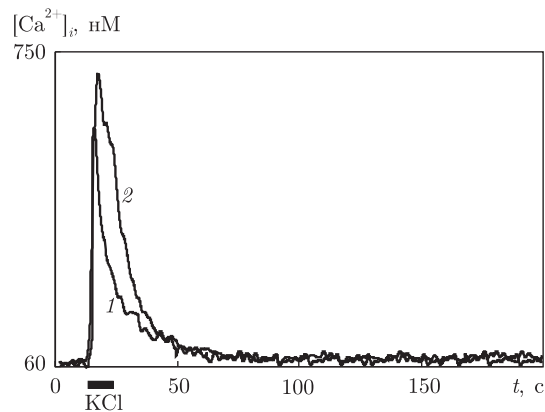


Рис. 1

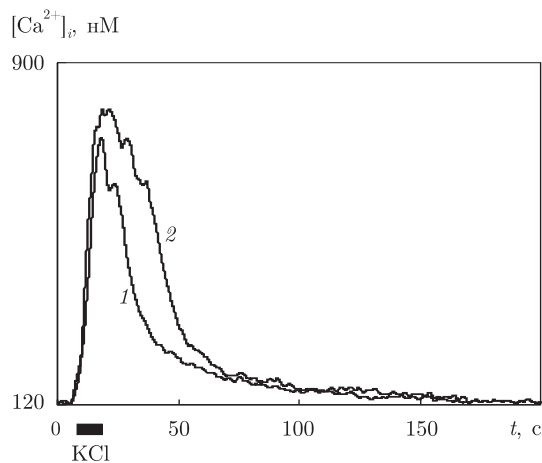


Рис. 2

Для оцінки впливу β -амілоїду на функціонування уніпортера мітохондрій, були побудовані графіки, що являли собою результат усереднення та нормування п'ятнадцяти кальцієвих транз'єнтів, отриманих при прикладанні гіперкалієвого розчину з СССР до нейронів гіпокампа, культивованих у контрольних умовах (рис. 3, крива 1) та після інкубації з β -амілоїдом (рис. 3, крива 2). З рис. 3 видно, що після впливу β -амілоїду кальцієві транз'єнти значно розширились, а це може свідчити про наявність надлишкової кількості кальцію в мітохондріях після преінкубації клітин культури гіпокампа з β -амілоїдом. Надлишкова кількість кальцію відповідає кривій 3 на рис. 3, яка є різницею усереднених нормованих транз'єнтів 2 і 1.

У наших попередніх експериментах було встановлено, що після преінкубації з β -амілоїдом відбувалось підвищення рівня внутрішньоклітинної концентрації кальцію [12]. Імовірно, з метою стабілізації рівня концентрації кальцію мітохондрії інтенсивніше поглинають надлишкову його кількість, принаймні у стані спокою клітини. Очевидно, з цієї причини ми спостерігаємо розширений транз'єнт після застосування СССР порівняно з транз'єнтом, отриманим у контролі.

У нейронах культури гіпокампа півширини деполяризаційних кальцієвих транз'єнтів при впливі мітохондріального протонатора СССР у концентрації 10 мкМ зросли з $11 \pm$

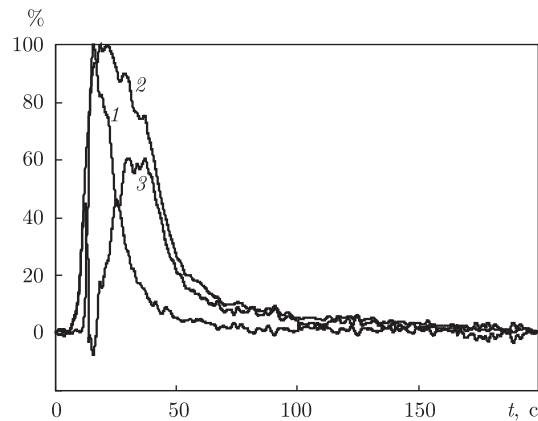


Рис. 3

± 3 с у контрольних умовах до 32 ± 6 с після преінкубації з β -амілоїдом ($P < 0,02$, $n = 15$).

Отже, результати нашої роботи вказують на те, що після інкубації з β -амілоїдом кальцій триваліший час залишається в цитоплазмі, що може бути обумовлене порушенням функціонування інших кальційрегулюючих структур. Такі зміни можуть бути обумовлені зниженням мітохондріального мембранного потенціалу та порушенням кальційзахоплюючої функції мітохондрій. Наші дані зіставні з результатами дослідів, проведених на фібробластах пацієнтів з хворобою Альцгеймера, в яких було показано погіршення захоплення кальцію мітохондріями та підвищення цитоплазматичної концентрації кальцію [14]. В експериментах на культивованих нейронах гіпокампа та кортикальних нейронах при застосуванні β -амілоїду було показано залежне від концентрації $A\beta$ порушення транспорту ^3H -дезоксиглюкози, що зумовлювано зниження продукування АТФ у нейронах [15]. Отже, погіршення мітохондріального метаболізму може бути наслідком порушення транспорту глюкози, опосередкованим впливом β -амілоїду, в кортикальних нейронах та нейронах гіпокампа.

Таким чином, ці факти вказують на безпосередню роль мітохондрій у нейродегенерації при хворобі Альцгеймера, а також дозволяють припустити, що рання терапевтична “корекція” роботи мітохондрій може бути ефективною при запобіганні розвитку та прогресування цієї хвороби у людей похилого віку.

1. Ясно Н. Н., Преображенская И. С. Болезнь Альцгеймера: патогенез, клиника, лечение // Рус. мед. журн. – 2002. – **10**, № 25. – С. 1143–1146.
2. Rossini P. M., Del Percio C., Pasqualetti P. et al. Conversion from mild cognitive impairment to Alzheimer’s disease is predicted by sources and coherence of brain electroencephalography rhythms // Neurosci. – 2006. – **147**. – P. 793–803.
3. LaFerla F. M. Calcium dyshomeostasis and intracellular signalling in Alzheimer’s disease // Nature. – 2002. – **3**. – P. 861–872.
4. Mattson M. Cellular actions of β -amyloid precursor protein and its soluble and fibrillogenic derivatives // Physiol. Rev. – 1997. – **77**. – P. 1081–1132.
5. Kang J., Lemaire H. G., Unterbeck A. et al. The precursor of Alzheimer’s disease amyloid A4 protein resembles a cell surface receptor // Nature. – 1987. – **325**. – P. 733–736.
6. Костюк П. Г., Зима В. Л., Магура І. С. та ін. Біофізика. – Київ: Обереги, 2001. – 544 с.
7. Rizzuto R. M., Brini M., Murgia M. Microdomains with high Ca^{2+} close to IP_3 -sensitive channels that are sensed by neighboring mitochondria // Science. – 1993. – **262**. – P. 744–747.

8. Rutter G. A., Theler J. M., Muriga M. et al. Increased Ca^{2+} influx raises mitochondrial free calcium to micromolar levels in a pancreatic beta-cell line // J. Biol. Chem. – 2003. – **268**. – P. 22385–22390.
9. Leissring M. A., Paul B. A., Parker I. et al. Alzheimer's presenilin-1 mutation potentiates inositol 1,4,5-trisphosphate-mediated calcium signaling in *Xenopus* oocytes // J. Neurochem. – 1999. – **72**, No 3. – P. 1061–1068.
10. Kawahara M., Kuroda Y. Molecular mechanism of neurodegeneration induced by Alzheimer's beta-amyloid protein: channel formation and disruption of calcium homeostasis // Brain Res. Bull. – 2000. – **53**, No 4. – P. 389–397.
11. Gibson G. E., Sheu K. F., Blass J. P. Abnormalities of mitochondrial enzymes in Alzheimer's disease // J. Neural. Transm. – 1998. – **105**. – P. 855–870.
12. Король Т. Ю., Король С. В., Костюк О. П., Костюк П. Г. Зміни кальцієвого гомеостазу в культивованих нейронах гіпокампа, викликані впливом β -амілоїду // Нейрофізіологія. – 2008. – **40**, № 1. – С. 9–12.
13. Grynkiewicz G., Poenie M., Tsien R. Y. A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties // J. Biol. Chem. – 1985. – **260**. – P. 3440–3450.
14. Hirai K., Aliev G., Nunomura A. et al. Mitochondrial abnormalities in Alzheimer's disease // J. Neurosci. – 2001. – **21**. – P. 3017–3023.
15. Mark R., Pang Z., Geddes J. W. et al. Amyloid β -peptide impairs glucose transport in hippocampal and cortical neurons: involvement of membrane lipid peroxidation // J. Neurosci. – 1997. – **17**, No 3. – P. 1046–1054.

*Інститут фізіології ім. О. О. Богомольця
НАН України, Київ*

Надійшло до редакції 09.04.2009

T. Yu. Korol, E. P. Kostyuk

Mitochondrial calcium uptake function damaging in experimental Alzheimer's disease

Damaging action of β -amyloid peptide (main component of senile plaques in Alzheimer's disease) on the calcium uptake function of mitochondria of rat hippocampal cell culture has been revealed by means of the calcium microfluorometry method using fluorescent dye fura-2/AM.