

Проблемная комиссия «Эпилепсия. Пароксизмальные состояния» РАН
и Министерства здравоохранения Российской Федерации

Российская Противозепилептическая Лига

ЭПИЛЕПСИЯ и пароксизмальные СОСТОЯНИЯ

2016 Том 8 №2



EPILEPSY AND PAROXYZMAL CONDITIONS

ISSN 2077-8333

2016 Vol. 8 №2

www.epilepsia.su

Включен в перечень ведущих
рецензируемых журналов и изданий ВАК

Данная интернет-версия статьи была скачана с сайта <http://www.epilepsia.su>. Не предназначено для использования в коммерческих целях.
Информацию о репринтах можно получить в редакции. Тел.: +7 (495) 648-34-95; факс: +7 (495) 648-34-95; почта: info@jrbis-1.ru. Copyright © 2016 Издательство ИРБИС. Все права охраняются.

ЗАЩИТА МИТОХОНДРИЙ ГОЛОВНОГО МОЗГА ПРИ МИКРОИНСУЛЬТЕ: ИССЛЕДОВАНИЕ ЭТИЛМЕТИЛГИДРОКСИПИРИДИНА СУКЦИНАТА НА ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ МОДЕЛИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ДВУХФОТОННОЙ ЛАЗЕРНОЙ ФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ МИКРОСКОПИИ

Афзалов Р.А., Коликова Ю.О., Пряжников Е.Г., Топтунов Д.В., Хируг Л.С.

Компания «Нейротар», Хельсинки, Финляндия

Резюме

Повреждение митохондрий играет центральную роль в гибели нейронов после ишемического инсульта. Цель работы — исследовать эффекты этилметилгидроксипиридина сукцината на индуцированное микроинсультом набухание митохондрий, отличительную черту митохондриального повреждения. Материалы и методы. Ишемический микроинсульт был индуцирован излучением импульсного инфракрасного лазера в мышцах Thy1-CFP-MitoS, экспрессирующих цианофлуоресцентный протеин в митохондриях головного мозга. Этилметилгидроксипиридина сукцинат в дозе 25 мг/кг или физ. раствор (контроль) вводили в.б. на 30 мин. после микроинсульта. Период наблюдений составлял 48 ч. Изображения мозга получали методом двухфотонной лазерной флуоресцентной микроскопии и анализировали с использованием программ, разработанных компанией "Нейротар" (Финляндия). Непараметрический тест Манна-Уитни-Вилкоксона использовали для анализа результатов. Результаты. Микроинсульт вызвал набухание митохондрий в окрестностях тромба. Наибольшие изменения морфологии митохондрий наблюдались через 2 ч после микроинсульта. По сравнению с контролем этилметилгидроксипиридина сукцинат достоверно уменьшил индуцированное микроинсультом набухание митохондрий через 1 ч ($p < 0,05$) и 2 ч ($p < 0,05$) после инсульта. Заключение. Результаты исследования свидетельствуют о том, что этилметилгидроксипиридина сукцинат достоверно защищает митохондрии головного мозга от поражения, вызываемого микроинсультом.

Ключевые слова

Митохондрия, ишемический инсульт, этилметилгидроксипиридина сукцинат, флуоресцентная микроскопия.

Статья поступила: 15.02.2016 г.; в доработанном виде: 23.03.2016 г.; принята к печати: 10.06.2016 г.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии необходимости раскрытия финансовой поддержки или конфликта интересов в отношении данной публикации.

Все авторы сделали эквивалентный вклад в подготовку публикации.

Для цитирования

Афзалов Р. А., Коликова Ю. О., Пряжников Е. Г., Топтунов Д. В., Хируг Л. С. Защита митохондрий головного мозга при микроинсульте: исследование этилметилгидроксипиридина сукцината на экспериментальной модели с использованием двухфотонной лазерной флуоресцентной микроскопии. Эпилепсия и пароксизмальные состояния. 2016; 2: 14-19.

PROTECTION OF BRAIN MITOCHONDRIA AGAINST MICROSTROKE-INDUCED INJURY: A STUDY OF ETHYLMETHYLHYDROXYPYRIDINE SUCCINATE IN EXPERIMENTAL MODEL USING TWO PHOTON LASER FLUORESCENT MICROSCOPY

Afzalov R. A., Kolikova Yu. O., Pryazhnikov E. G., Toptunov D. V., Khirug L. S.

“Neurotar” Ltd, Helsinki, Finland.

Summary

Objective. Mitochondrial injury plays a central role in neuronal death following ischemic stroke. In the present study, we investigated effects of ethylmethylhydroxypyridine succinate on a microstroke-induced mitochondria swelling, a hallmark of mitochondrial injury. **Materials and Methods.** Ischemic microstroke was induced in Thy1-CFP-MitoS mice expressing cyano fluorescent protein (CFP) in brain mitochondria by impulse infrared laser. Ethylmethylhydroxypyridine succinate 25 mg/kg or saline (control) were administered i.p. at 30 min after the stroke onset. A period of observation was 48 h. Brain images were obtained by two photon laser fluorescent microscopy and analyzed using a software developed in Neurotar Ltd (Finland). Nonparametric Mann-Whitney-Wilcoxon test was used for the statistical analysis of results. **Results.** Microstroke resulted in mitochondria swelling, i.e. injury, in the zone surrounding the thrombus. The most profound changes of mitochondrial morphology were observed at 2 h from the stroke onset. Ethylmethylhydroxypyridine succinate significantly reduces the stroke-induced swelling at 1 h ($p < 0.05$) and 2 h ($p < 0.05$), as compared to the control. **Conclusion.** These results suggest that ethylmethylhydroxypyridine succinate significantly protects brain mitochondria against microstroke-induced injury.

Key words

Mitochondria, ischemic stroke, ethylmethylhydroxypyridine succinate, fluorescent microscopy.

Received: 15.02.2016; in the revised form: 23.03.2016; accepted: 10.06.2016.

Conflict of interests

The authors declare about the absence of conflict of interest with respect to this publication.

All authors contributed equally to this article.

For citation

Afzalov R. A., Kolikova Yu. O., Pryazhnikov E. G., Toptunov D. V., Khirug L. S. Protection of brain mitochondria against microstroke-induced injury: a study of ethylmethylhydroxypyridine succinate in experimental model using two photon laser fluorescent microscopy. Epilepsia i paroksizmal'nye sostoyaniya / Epilepsy and paroxysmal conditions. 2016; 2: 14-19 (in Russian).

Corresponding author

Address: Viikinkaari 4, 00790, Helsinki, Finland.

E-mail address: ramil.afzalov@neurotar.com (Afzalov R. A.).

Введение

Патологическая активация митохондрий играет центральную роль в гибели нейронов при ишемическом инсульте [4]. Церебральная ишемия вызывает каскад событий, начинающийся с неконтролируемого высвобождения глутамата из нейронов и активации глутаматом ионотропных NMDA-рецепторов, за которой следует патологическое повышение внутриклеточной концентрации ионов Ca^{2+} , и далее — неконтролируемый подъем концентрации ионов Ca^{2+} в матриксе митохондрий. Перегрузка матрикса ионами Ca^{2+} вызывает открытие митохондриальных пор,

что приводит к коллапсу градиента pH и мембранного потенциала и прекращению синтеза энергетического субстрата аденозинтрифосфата (АТФ). Визуально открытие митохондриальных пор сопровождается набуханием митохондрий, поэтому наблюдая за изменением морфологии митохондрий при моделировании инсульта можно судить о динамике патологических изменений, связанных со снижением энергетического метаболизма и гибелью нейронов.

Мыши Thy1-CFP-MitoS экспрессируют флуоресцентный протеин в митохондриях головного мозга и могут быть использованы для визуализации дина-

мики изменения морфологии митохондрий при моделировании микроинсульта.

Этилметилгидроксипиридина сукцинат — это разработанный в России антигипоксикант, широко применяемый при лечении инсульта, механизм антигипоксического действия которого до конца не изучен. Целью настоящего исследования была оценка защитного эффекта этилметилгидроксипиридина сукцината при ишемическом микроинсульте с визуализацией динамики изменений морфологии митохондрий на мышах Thy1-CFP-MitoS.

Материалы и методы

Исследования были выполнены на трансгенных мышах Thy1-CFP-MitoS, возраст — 1 мес., экспрессирующих цианфлуоресцентный протеин в митохондриях головного мозга. Животные содержались в индивидуальных клетках при световом режиме 12:12 ч свет: темнота и имели свободный доступ к воде и лабораторной пище при контролируемых лабораторных условиях. Все исследования выполнялись в лаборатории Neurotar (Хельсинки, Финляндия) в соответствии с Директивой Совета Европейского Сообщества (European Communities Council Directive) по уходу за лабораторными животными и принципами надлежащей лабораторной практики OECD Principles of Good Laboratory Practice (as revised in 1997), OECD Environmental Health and Safety Publications (OECD) 1, 1998.

Изображения коры головного мозга были получены с использованием фемтосекундного лазера Mai-Tai Broad Band DeepSee, длина волны облучения — 800 нм. Флуоресценцию цианфлуоресцентного протеина (CFP) детектировали с использованием эмиссионного фильтра с областью пропускания 420–500 нм (канал 1). Флуоресценцию декстрана, меченого цианиновым красителем «техасский красный» (TxRed dextran), детектировали с использованием эмиссионного фильтра с областью пропускания 590–650 нм (канал 2). Изображения получали с вертикальным шагом 1 μm в глубину до 100–150 μm и с визуализацией четырех разных областей. Каждая область имела площадь $500 \times 500 \mu\text{m}^2$ в XY-координатах.

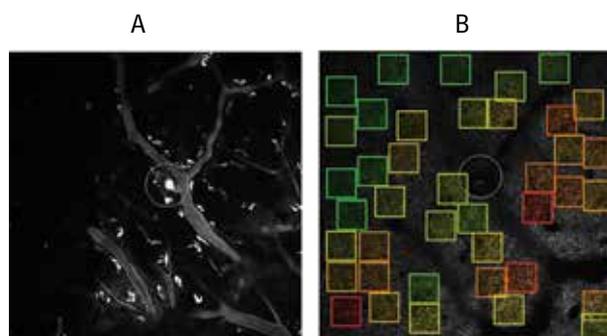


Рисунок 1. Флуоресцентная микроскопия зоны ишемического микроинсульта в коре головного мозга мышей Thy1-CFP-MitoS: А — изображение кровеносных сосудов; В — изображение митохондрий. Локализация тромба отмечена окружностью.

Микроинсульт

Тромб индуцировали импульсным облучением (1–10 мс) сегмента артериолы инфракрасным лазером таким образом, чтобы полностью блокировать кровоток в нижележащих капиллярах. Эффективность микроинсульта оценивалась визуально. Для этого флуоресцентный декстран (TxRed dextran) с молекулярной массой 70 кДа в количестве 120 μl вводили до индукции микроинсульта. Во время опытов мыши были анестезированы внутривентрикулярной инъекцией смеси кетамин/ксилазин. В ходе первой сессии съемка изображений каждой из четырех областей производилась сразу до момента получения тромба и в течение следующих 80–120 мин. После этого животные помещались в клетки. Во время второй сессии, 48 ч спустя, съемка изображений производилась по тем же XY-координатам, что и в первой сессии.

Исследуемое вещество — этилметилгидроксипиридина сукцинат — вводился форме 5% водного раствора субстанции без консервантов или иных добавок (соответствует лекарственной форме препарата Астрокс) в дозе 25 мг/кг внутривентрикулярно через 30 мин. после микроинсульта. Физиораствор вводился в качестве контроля.

Анализ полученных изображений проводился в рамках математической модели, разработанной в Neurotar Ltd. (Финляндия). Трехмерные параметры разграниченных объектов (митохондрий) были вычислены и выражены в виде безразмерного коэффициента K , который характеризует форму митохондрий, причем большее значение K соответствует большему «округлению» митохондрий. Для удобства сопоставления форм митохондрий в разные моменты времени результаты представлены в виде индекса «набухания» митохондрий, вычисленного по формуле

$$IN = (1 - K_0) / (K_t - 1),$$

где IN — индекс набухания (округления) митохондрий; K_0 — значение коэффициента до микроинсульта; K_t — значение коэффициента в момент времени t после микроинсульта. Увеличение IN в курсе ишемии означает набухание митохондрий — процесс, прямо связанный со снижением энергетического метаболизма.

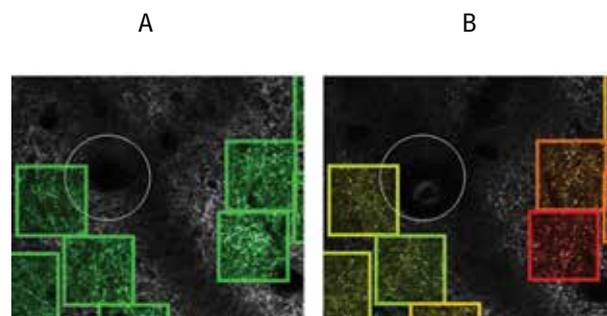


Рисунок 2. Увеличенные изображения митохондрий в коре головного мозга до и после ишемического микроинсульта: локализация тромба отмечена окружностью; А — зона до микроинсульта; В — та же самая зона через 2 ч после микроинсульта.

Полученные результаты сравнивались статистически с использованием непараметрического теста Манна-Уитни-Вилкоксона.

Результаты

Описание экспериментальной модели

Для визуализации изменений морфологии митохондрий при ишемическом микроинсульте были использованы трансгенные мыши Thy1-CFP-MitoS, экспрессирующие флуоресцентный протеин в митохондриях головного мозга. Для получения тромба просвет артериолы или ее сегмент облучали фемтосекундным импульсным инфракрасным лазером. Место локализации тромба выбиралось так, чтобы остановить кровоток в нижележащей ветви капилляров и вызвать ишемию в ограниченной зоне мозга (см. рис. 1А).

Изображения митохондрий в зоне микроинсульта были получены с использованием двухфотонной лазерной флуоресцентной микроскопии. На рисунке 1В видно, что ишемический микроинсульт вызвал детектируемые изменения морфологии митохондрий. Области, в которых наблюдалось округление (набухание) митохондрий, выделены цветом от желтого до красного, в зависимости от степени округления. Красный цвет соответствует зонам, в которых наблюдалась наибольшая степень набухания митохондрий. Области, в которых морфология митохондрий не изменилась после индукции тромба, выделены зеленым цветом.

Увеличенные изображения митохондрий до и после микроинсульта показаны на рисунках 2А и 2В со-

ответственно. При сравнении изображений видно, что морфология митохондрий после микроинсульта претерпела изменения, особенно заметные в зонах, выделенных красным цветом. Митохондрии потеряли исходную удлинненную форму, стали более округлыми и набухли.

Полученные результаты показывают, что данная модель позволяет регистрировать динамические изменения морфологии митохондрий *in vivo* в реальном времени при моделировании микроинсульта и может быть использована для оценки эффективности средств лечения инсульта.

Оценка эффективности Астрокса в защите митохондрий при ишемическом микроинсульте

Для оценки эффективности Астрокс вводили внутривенно в дозе 25 мг/кг через 30 мин. после индукции микроинсульта. Изменения морфологии митохондрий в зоне микроинсульта детектировались в течение 48 ч с использованием флуоресцентной микроскопии *in vivo*, как указано в разделе «Материалы и методы». Результаты представлены на рисунке 3.

В контроле (физраствор) ишемический микроинсульт вызвал обратимое набухание митохондрий (см. рис. 3А и 3В). Через 1 ч после индукции микроинсульта часть митохондрий в зонах, прилегающих к тромбу, потеряла исходную удлинненную форму и округлилась. Эти зоны выделены желтым и красным цветом на изображениях, полученных микроскопией (см. рис. 3А). Количественно появление фракции набухших митохондрий показано на графике распределения митохондрий по индексу «набухания» (см.

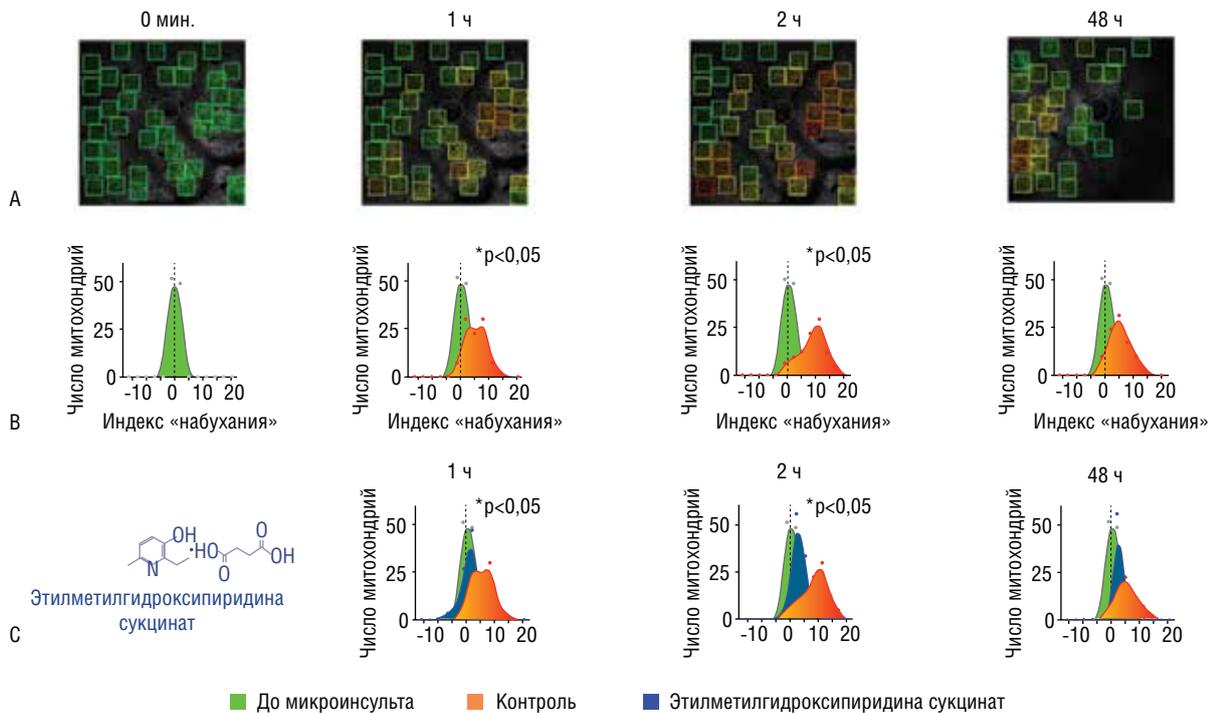


Рисунок 3. Оценка защитного эффекта Астрокса при ишемическом микроинсульте: А – контроль, изображения митохондрий до (0 мин.) и после микроинсульта в течение 48 ч; В – контроль, графики распределения митохондрий по индексу «набухания» до и после микроинсульта в течение 48 ч; С – исследуемый препарат, графики распределения митохондрий по индексу «набухания» до и после микроинсульта в течение 48 ч.

рис. 3В). Индекс «набухания» построен так, что сдвиг в положительную область значений соответствует округлению митохондрий, а в отрицательную область, наоборот, — удлинению митохондрий. На рисунке видно, что исходное однородное распределение митохондрий по морфологии, существовавшее до микроинсульта (0 мин., показано зеленым цветом) изменилось и новое распределение (показано желто-красным цветом) содержит фракцию набухших митохондрий. Об этом свидетельствует сдвиг желто-красной кривой распределения в область положительных значений индекса «набухания». Через 2 ч после микроинсульта фракция набухших митохондрий становится основной. Изменения были статистически достоверными по сравнению с исходным распределением ($p < 0,05$). Через 48 ч большая часть набухших митохондрий восстанавливает свою исходную форму, что указывает на обратимый характер поражения митохондрий в данной модели микроинсульта.

Исследуемый препарат Астрокс, введенный на 30-й мин. после микроинсульта, достоверно уменьшил набухание митохондрий в первые часы после микроинсульта по сравнению с контролем ($p < 0,05$), как показано на рисунке 3С. В течение 48 ч наблюдений распределение митохондрий по индексу «набухания» осталось близким к исходным значениям до инсульта и не произошло появления значительной фракции набухших митохондрий. Таким образом, Астрокс достоверно защищал митохондрии мозга при ишемическом микроинсульте.

Обсуждение результатов

Механизмы, приводящие к набуханию митохондрий, достаточно хорошо изучены. Ишемический инсульт приводит к неконтролируемому высвобождению глутамата из нейронов и избыточной стимуляции глутаматных рецепторов, прежде всего ионотропных NMDA-рецепторов, регулирующих транспорт ионов Ca^{2+} [1,2,6]. Когда внутриклеточная концентрация Ca^{2+} повышается до определенной пороговой величины, происходит патологическое повышение ионов Ca^{2+} в матриксе [6]. Перегрузка ма-

трикса ионами Ca^{2+} , особенно в сочетании с окислительным стрессом и пониженным уровнем адениннуклеотидов, открывает неспецифические поры во внутренней мембране митохондрий [4]. Открытие пор вызывает массовое набухание (swelling) митохондрий, так как белки с массой выше 1,5 кДа не могут проникать через поры и остаются в высокой концентрации внутри матрикса, что создает осмотический градиент при открытых порах, приводящий к движению воды внутрь матрикса и вызывающий его набухание с разворачиванием крист.

Набухание митохондрий напрямую связано с патологическими событиями в клетке, такими как снижение энергетического метаболизма и индукция апоптоза [5]. Митохондрии могут производить АТФ только при наличии градиента рН и потенциала внутренней мембраны митохондрий, поэтому непроницаемость внутренней мембраны митохондрий для свободного переноса протонов и ионов является решающим условием для продукции АТФ митохондриями. Открытие митохондриальных пор нарушает это условие и приводит к потере градиента рН и мембранного потенциала и, соответственно, к потере способности митохондрии производить АТФ. Кроме того, набухание митохондрий индуцирует апоптоз в тот момент, когда набухший матрикс разрушает внешнюю мембрану митохондрий и цитохром С, индуктор апоптоза выходит из межмембранного пространства в цитозоль. В этом контексте визуализация процесса набухания митохондрий позволяет судить о снижении энергетического метаболизма и активации процессов апоптоза в нейронах.

Исследуемый препарат Астрокс, введенный на 30-й мин. после микроинсульта, достоверно уменьшил вызываемое ишемией набухание митохондрий по сравнению с контролем, что свидетельствует о подавлении патологических процессов, связанных с образованием митохондриальных пор и изложенных выше.

Заключение

Настоящее исследование показало, что механизм антигипоксического действия Астрокса связан с защитой митохондрий в условиях церебральной ишемии, вызванной микроинсультом.

Литература:

1. Блинов Д. В. Общность ряда нейробиологических процессов при расстройствах деятельности ЦНС. Эпилепсия и пароксизмальные состояния. 2011; 2: 28-33.
2. Блинов Д. В. Пациенты с неврологическими расстройствами: обоснование необходимости фармакоэкономической оценки оптимизации затрат на ведение

- с использованием нейроспецифических белков в качестве маркеров повышения проницаемости гематоэнцефалического барьера. ФАРМАКОЭКОНОМИКА. Современная фармакоэкономика и фармакоэпидемиология. 2014; 7 (1): 40-45.
3. Gunter T. E., Buntinas L., Sparagna G., Eliseev R., Gunter K. Mitochondrial calcium transport: mechanisms and functions. Cell Calcium. 2000; 28 (5-6): 285-96.

4. Halestrap A. P., McStay G. P., Clarke S. J. The permeability transition pore complex: another view. Biochimie. 2002; 84 (2-3): 153-66.
5. Halestrap A. P. Calcium, mitochondria and reperfusion injury: a pore way to die. Biochem Soc Trans. 2006, 34 (2): 232-7.
6. Pivovarova N. B., Andrews S. B. Calcium-dependent mitochondrial function and dysfunction in neurons. FEBS J. 2010, 277 (18): 3622-36.

References:

1. Blinov D. V. *Epilepsiya i paroksizmal'nye sostoyaniya / Epilepsy and paroxysmal conditions*. 2011; 2: 28-33.

2. Blinov D. V. *FARMAKOEKONOMIKA. Sovremennaya farmakoeconomika i farmakoepidemiologiya / PHARMACOECONOMICS. Modern pharmacoeconomics and*

- pharmacoeconomics and*
3. Gunter T. E., Buntinas L., Sparagna G., Eliseev R., Gunter K. Mitochondrial calcium transport: mechanisms and

Оригинальные статьи

- functions. Cell Calcium. 2000; 28 (5-6): 285-96.
4. Halestrap A.P., McStay G.P., Clarke S.J. The permeability transition pore complex: another view. Biochimie. 2002; 84 (2-3): 153-66.
5. Halestrap A.P. Calcium, mitochondria and reperfusion injury: a pore way to die. Biochem Soc Trans. 2006, 34 (2): 232-7.
6. Pivovarova N.B., Andrews S.B. Calcium-dependent mitochondrial function and dysfunction in neurons. FEBS J. 2010, 277 (18): 3622-36.

Сведения об авторах:

Афзалов Рамиль Агмальдинович — к.б.н., компания «Нейротар». Адрес: ул. Виикинкаари, 4, Хельсинки, Финляндия, 00790. E-mail: ramil.afzalov@neurotar.com.

Коликова Юлия Олеговна — к.б.н. компания «Нейротар». Адрес: ул. Виикинкаари, 4, Хельсинки, Финляндия, 00790. E-mail: julia.kolikova@neurotar.com.

Пряжников Евгений Геннадиевич — к.м.н., «Нейротар». Адрес: ул. Виикинкаари, 4, Хельсинки, Финляндия, 00790. E-mail: evgeny.pryazhnikov@neurotar.com.

Топтунов Дмитро Владимирович — исследователь, компания «Нейротар». Адрес: ул. Виикинкаари, 4, Хельсинки, Финляндия, 00790. E-mail: dmytro.toptunov@neurotar.com.

Хирург Леонард Сергеевич — к.м.н., «Нейротар». Адрес: ул. Виикинкаари, 4, Хельсинки, Финляндия, 00790. E-mail: leonard.khirug@neurotar.com.

About the authors:

Afzalov Ramil Agmaldinovich — PhD, "Neurotar" Ltd. Address: Viikinkaari 4, 00790, Helsinki Finland. E-mail: ramil.afzalov@neurotar.com.

Kolikova Yuliya Olegovna — PhD, "Neurotar" Ltd. Address: Viikinkaari 4, 00790, Helsinki Finland. E-mail: julia.kolikova@neurotar.com.

Pryazhnikov Evgenii Gennadievich — PhD, "Neurotar" Ltd. Address: Viikinkaari 4, 00790, Helsinki Finland. E-mail: evgeny.pryazhnikov@neurotar.com.

Toptunov Dmitro Vladimirovich — researcher, "Neurotar" Ltd. Address: Viikinkaari 4, 00790, Helsinki Finland. E-mail: dmytro.toptunov@neurotar.com.

Khirurg Leonard Sergeevich — PhD, "Neurotar" Ltd. Address: Viikinkaari 4, 00790, Helsinki Finland. E-mail: leonard.khirug@neurotar.com.

АСТРОКС®

Этилметилгидроксипиридина сукцинат



ПРЕПАРАТ ВЫБОРА ДЛЯ БОРЬБЫ С ГИПОКСИЕЙ ЛЮБОЙ ЭТИОЛОГИИ

- Острые нарушения мозгового кровообращения
- Невротические расстройства с синдромом тревоги
- Интеллектуально-мнестические нарушения различного генеза
- Дисциркуляторная энцефалопатия
- Вегето-сосудистая дистония
- Острая интоксикация антипсихотическими и наркотическими средствами
- Алкогольный абстинентный синдром

ПРОГРАММА ПО БОРЬБЕ С ИНСУЛЬТОМ

AntiSTROKES

HOMEXPHARM

109044, Москва, Крутицкий вал, 14
Телефон / Факс: +7 (495) 748-56-26
Интернет-сайт: www.homexpharm.ru