

## Скрининговое исследование митохондриального биогенеза и токсичности

### Чувствительный и надежный клеточный скрининговый анализ

#### ОБЛАСТЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Ожирение, сахарный диабет, метаболические нарушения, токсичность *in vitro*, нейродегенеративные заболевания, старение, злокачественное новообразование

#### ТИП АНАЛИЗА

Функция митохондрий: митохондриальный биогенез и токсичность

#### КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА

митохондриальное дыхание, митохондриальный биогенез, токсичность, клетки проксимальных почечных канальцев, скрининг соединения

Повреждение митохондрий нарушает выработку АТФ и, следовательно, жизнеспособность клеток. Учитывая ведущую роль митохондрий в регуляции функции клетки, лекарственные препараты, которые нарушают функцию митохондрий, часто вызывают токсические эффекты. Напротив, митохондриальный биогенез повышает жизнеспособность клеток и используется в качестве стратегии для борьбы с возрастными заболеваниями. Поэтому возрастает интерес к выявлению препаратов, стимулирующих биогенез.

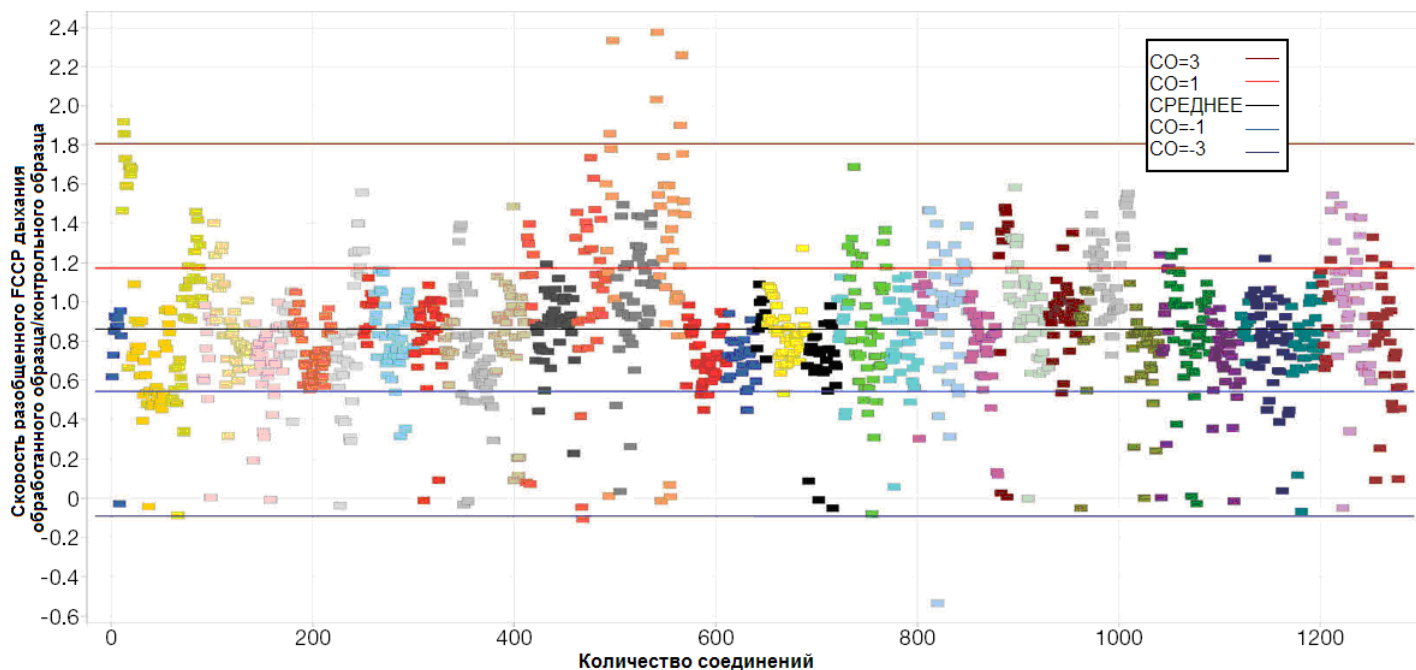
В настоящее время отсутствуют скрининговые анализы, выполняемые в режиме реального времени, которые оценивают многочисленные показатели митохондриальной функции. Методы определения митохондриальной функции путем измерения клеточного дыхания, главным образом, основывались на электродных камерах Кларка, обладающих недостаточной для скрининга пропускной способностью. Кроме того, многие культуральные клеточные линии демонстрируют изменения физиологии митохондрий, в достаточной степени не коррелирующие с митохондриальным биогенезом *in vivo* и токсичностью.

Анализатор внеклеточного потока XF96 удовлетворяет потребность в более высокой пропускной способности спирометрических измерений. Для оценки его эффективности при скрининге первичные культуры клеток проксимальных почечных канальцев (КППК) кроликов были оптимизированы для платформы XF и протестированы с использованием хорошо изученных нефротоксикантов и активаторов митохондриального биогенеза.

Beeson с соавт. [1] адаптировали первичные культуры КППК для демонстрации аэробного метаболизма *in vivo*, поддержания негликолитического обмена и сохранения высоких уровней дифференцированных функций. Анализатор XF96 применяли для оценки митохондриального дыхания КППК в режиме реального времени. В соответствии с описанием Beeson, для количественного определения митохондриальной токсичности и биогенеза использовали изменения дыхания, разобщенного карбонилцианид-4-(трифторометокси)-фенилгидразоном (FCCP), показателя целостности электронной транспортной цепочки (ЭТЦ) и чувствительного показателя функциональной способности митохондрий [1]. Нефротоксиканты цисплатин,  $HgCl_2$  и гентамицин вызывали статистически значимое снижение скорости разобщения, вызываемого FCCP, до снижения базального дыхания и гибели клеток. С другой стороны, препараты, способные индуцировать митохондриальный биогенез, например, 1-(2,5-диметокси-4-йодофенил)-2-аминопропан (DOI), SRT1720, ресвератрол, дайдзеин и метформин, вызывали статистически значимое увеличение скорости разобщенного FCCP дыхания [1]. Снижение или повышение скорости разобщенного FCCP дыхания может использоваться как показатель митохондриальной токсичности или биогенеза соответственно.

**Рисунок 1** | Репрезентативные данные для первичного скринингового анализа митохондриального биогенеза и токсичности

Показана скорость разобщенного FCCP дыхания, выражающаяся в соотношении значений обработанных и контрольных образцов в каждой лунке. Различные цветные кластеры позволяют отличать полосы и горизонтальные линии, обозначающие 1 и 3 стандартных отклонения выше и ниже средних значений. Препараты, приводящие к соотношениям со стандартными отклонениями  $\geq 1$ , являются потенциальными индукторами биогенеза, препараты со стандартными отклонениями  $\leq -1$  – потенциальными токсикантами.



Для валидации платформы КППК как первичного скринингового анализа проводили скрининг библиотеки LOPAC, включающей 1280 соединений. Клетки обрабатывали 5 мМ соединений из данной библиотеки с использованием одного соединения в каждой лунке в двух повторностях. После 24 ч обработки с помощью анализатора XF96 определяли базальную и разобщенную (максимальную) скорость потребления кислорода (СПК).

На рисунке 1 представлены репрезентативные данные, полученные при проведении однократного первичного скринингового анализа библиотеки LOPAC. Конечные измерения разобщенной FCCP скорости, выраженные соотношением обработанных и контрольных лунок, показали, что большинство соединений оказывало незначительное воздействие, демонстрирующее хорошую избирательность активных соединений. Соединения, стимулирующие митохондриальный биогенез, показали увеличение разобщенной FCCP скорости порядка на 20-50% выше контрольных значений ( $>1$  стандартного отклонения от среднего значения). Напротив, соединения, вызывающие токсические явления, демонстрируют снижение разобщенной FCCP скорости порядка на 20-50% ниже контроля. При данном скрининге соединения, вызывающие повышение или снижение выше или ниже одного стандартного отклонения, являются наиболее вероятными препаратами для использования в качестве индукторов биогенеза или токсикантов соответственно. Положительные контрольные значения обоих классов соединений постоянно находятся в том же диапазоне. Совместное использование модели КППК и анализатора XF96 компании Seahorse способствует одновременной оценке митохондриального биогенеза и токсичности, в том числе нефротоксического потенциала, при первичном скрининговом анализе.

## Обсуждение

Валидность данного скринингового исследования обусловлена устойчивостью митохондриальной функции КППК и чувствительностью скорости разобщенного FCCP дыхания при определении нарушения или повышении функции митохондрий. Данный формат анализа использует преимущество высокой пропускной способности,

предоставляемой платформой XF96, и высокой точности измерения скорости потребления кислорода (СПК). Сочетание первичной модели КППК с платформой XF96 создает первый фенотипический анализ митохондриальной функции, обладающий высокой пропускной способностью, который может применяться при первичном скрининге для выявления стимуляторов митохондриального биогенеза или соединений с потенциальной токсичностью. Он также может быть использован при вторичном или третичном скрининге для выявления и подтверждения индукторов митохондриального биогенеза или митохондриальных токсикантов. Учитывая, что нарушение митохондриальной функции входит в состав метаболических расстройств, таких как сахарный диабет, нейродегенеративные заболевания, сердечная недостаточность и старение в целом, данный анализ будет способствовать разработке новых лекарственных препаратов.

В другом исследовании проводили изучение анализатора XF96 в качестве аналитической платформы для скринингового определения индуцированных лекарственными препаратами митохондриальных нарушений с использованием обеих клеточных линий и первичных культур (рукопись в стадии подготовки). Помимо подтверждения препаратов с известными нежелательными эффектами в отношении митохондриальной функции и гликолиза, авторы протестировали ряд лекарственных средств, включая толкапон и энтакапон, используемые для лечения болезни Паркинсона; нилутамид и флутамид – антиандрогены, назначаемые для лечения рака предстательной железы; и противодиабетические препараты – троглитазон, сиглитазон и пиоглитазон. В этих экспериментах было показано, что в анализаторе XF96 наблюдаются колебания значений в пределах одного анализа и между анализами, составляющие меньше 15%, что указывает на широкое применение XF96 в различных клеточных скрининговых платформах.

Gohil с соавт. [2] использовали соотношение СПК и ECAR, показателя гликолиза, для создания «аэробного фактора». Они применяли данный анализ в качестве вторичного скрининга для определения лекарственных препаратов, изменяющих энергетический обмен с митохондриального дыхания на гликолиз (скорость закисления внеклеточной среды). Этот уникальный и информативный анализ способен осуществлять скрининг соединений, переводящих опухолевые клетки в аэробное метаболическое состояние, в большей степени поддающееся лечению, либо переводящие кардиомиоциты или нейроны в состояние с более выраженным гликолизом, при котором клетки могут обладать большими кардиопротективными или нейропротективными свойствами.

## Материалы и методы

**Клетки:** КППК выделяли посредством метода перфузии оксидом железа, как описано ранее [3]. Проводили посев полученных проксимальных канальцев в пластиковые чашки Петри для тканевой культуры диаметром 100 мм. Планшеты постоянно вращали на орбитальном шейкере (встрягивателе) со скоростью 80 оборотов в минуту. Через 3 дня КППК удаляли с помощью трипсина и высевали в лунки клеточных культуральных микропланшетов XF96 (18000 клеток в каждой лунке). Планшеты вращали на орбитальном шейкере в течение 4 дней со скоростью 80 оборотов в минуту, обрабатывали и проводили оценку через 24 ч. Питательная среда представляет собой смесь в соотношении 50:50 среды Игла в модификации Дульбекко и питательной среды Хэма F12 без фенола красного, с добавлением 15 мМ NaHCO<sub>3</sub>, 0,2 мМ глицина и 6 мМ лактата натрия. Эту среду доводили до pH 7,4 с одновременным наполнением газами 95% O<sub>2</sub>-5% CO<sub>2</sub> и до стерилизации фильтрованием разбавляли до 295 мосмоль/кг H<sub>2</sub>O. Далее в среду добавляли трансферрин человека (5 мкг/мл), селен (5 нг/мл), гидрокортизон (50 нМ) и бычий инсулин (10 нМ).

Библиотека LOPAC была получена у компании Sigma-Aldrich. 10 мМ исходных растворов разводили в ДМСО.

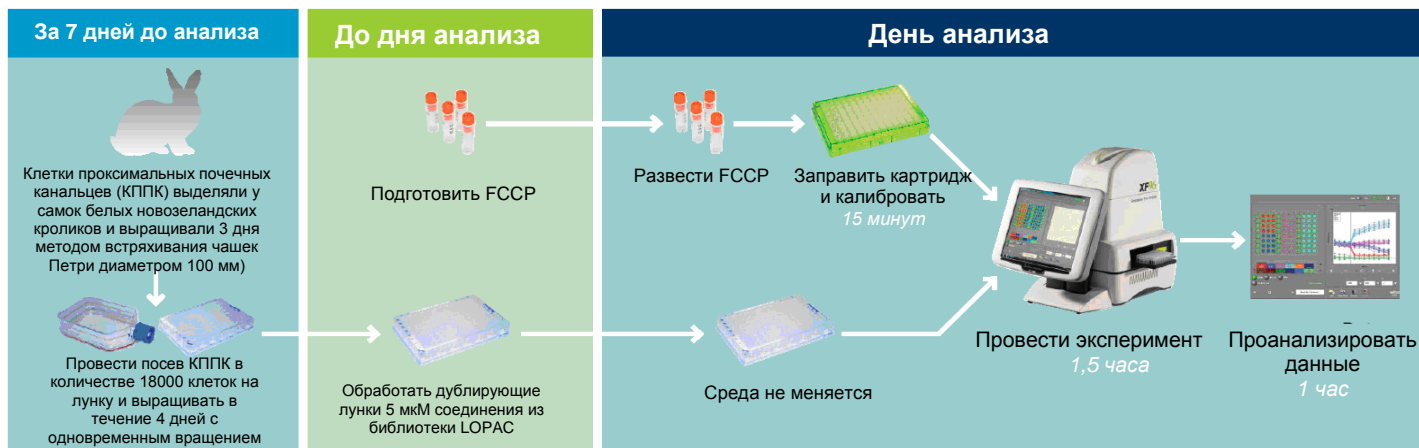
## Анализ XF

Анализы XF проводились с использованием анализатора внеклеточного потока XF96 (Seahorse Bioscience), полностью интегрированного 96-луночного прибора, измеряющего поглощение и выведение конечных продуктов метаболизма в режиме реального времени. Скорость потребления кислорода (СПК) измеряли с помощью набора для анализа XF. Каждый набор для анализа содержит одноразовый картридж датчика со встроенными 96 иммобилизованными (твердотельными), двухфлуоресцентными биосенсорами (кислорода и pH). Каждый картридж датчика также оснащен камерами для введения тестируемых препаратов в лунки во время анализа. СПК измеряется в пмоль/мин, ECAR в данном протоколе не использовалась.

Как показано на рисунке 2, дублирующие лунки обрабатывали 5 мкМ соединения в 200 мкл среды с добавлением 10 мМ NEPES. Каждый планшет также имел необработанный плацебо-контроль и дублирующие SRT1720-положительные контрольные лунки. Через 24 часа планшеты анализировали с помощью анализатора XF96 без замены культуральной среды. В течение эксперимента проводили пять базальных определений СПК с 4-минутным перемешиванием и 1-минутным циклом измерения. В каждую лунку вводили 0,5 мкМ FCCP в

конечной концентрации в 25 мкл среды с последующими тремя оценками СПК с использованием 2-минутного перемешивания и 1-минутного цикла измерения. Для получения соотношений, показанных на рисунке 1, среднее значение трех разобщенных скоростей в каждой обработанной лунке делилось на средний показатель трех разобщенных скоростей в лунках плацебо-контроля. Оценка контроля качества включает сравнение базальных и разобщенных скоростей плацебо-контроля с необработанными контрольными лунками, а также сравнение разобщенных скоростей в контрольной лунке как отношение средних базальных скоростей; диапазон последних соотношений составлял 1,5-3 для приемлемых анализов.

**Рисунок 2** | Схема проведения анализа XF



**Ссылки**

1. Beeson CC, Beeson GC, Schnellmann RG. *A high-throughput respirometric assay for mitochondrial biogenesis and toxicity*. Anal Biochem. 2010 Sep 1; 404(1):75-81. Epub 2010 May 15.
2. Gohil VM et al. *Nutrient-sensitized screening for drugs that shift energy metabolism from mitochondrial respiration to glycolysis*. Nature Biotech. 2010;28(3):249-57.
3. Nowak G, Schnellmann RG. *L-ascorbic acid regulates growth and metabolism of renal cells: improvements in cell culture*. Am J Physiol. 1996;271(6 Pt 1):C2072-80.