

## Оценка митохондриальной дисфункции в первичных кардиомиоцитах

**Резервная емкость митохондрий является чувствительным показателем клеточного стресса**

### ОБЛАСТИ ИССЛЕДОВАНИЯ

Заболевания сердечно-сосудистой системы, нейродегенеративные заболевания, метаболические заболевания

### ТИПЫ АНАЛИЗОВ

Функция митохондрий: митохондриальный профиль или «стресс-тест»

### КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА

Митохондрии, окислительное фосфорилирование, олигомицин, FCCP, антимицин А, HNE

В данном указании по применению описывается метод создания профиля митохондриальной функции в клетках в ответ на стресс. Созданный таким образом профиль представляет четыре параметра митохондриальной функции, которые можно измерить в одном лабораторном исследовании: исходная скорость дыхания, АТФ-связанное дыхание, утечка протонов и резервная емкость. Описанные здесь результаты показывают, что развитие повреждения кардиомиоцитов, в данном случае вызванное окисленными липидами, повышает АТФ-связанное потребление кислорода, уменьшает эффективность дыхания и биоэнергетическую резервную емкость.

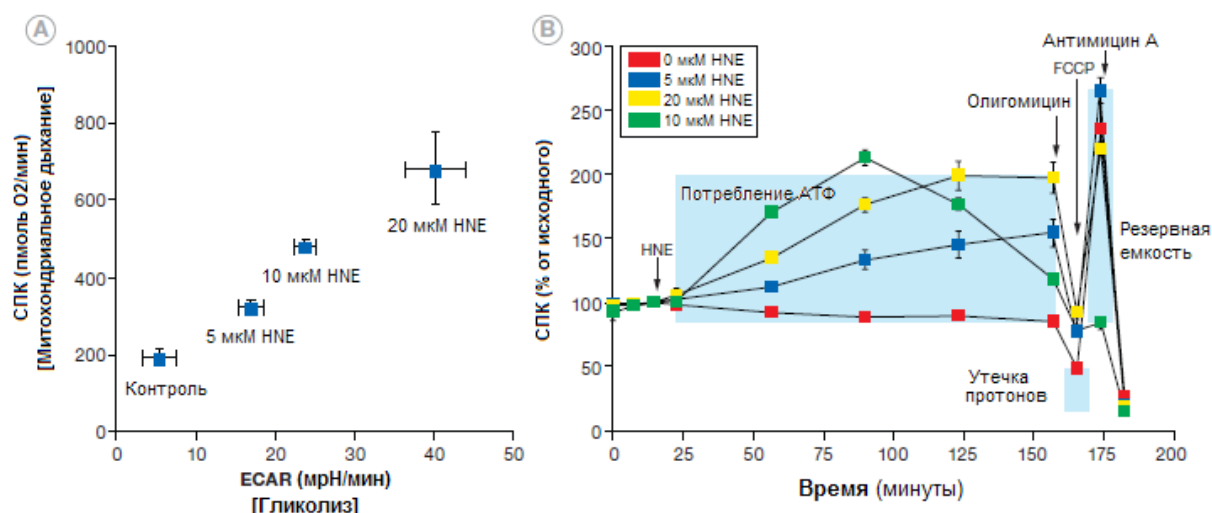
Bradford Hill с соавт. [1] проводили оценку данной «биоэнергетической емкости» в первичных кардиомиоцитах и определяли его использование в ответ на стресс, вызванный патологически активной формой липидов HNE (4-гидроксиноненаль), продуктом, образующимся при острой и хронической дисфункции сердца. Ими было обнаружено, что миоциты желудочков новорожденных крыс (МЖНК) обладают выраженной способностью к реагированию на увеличение потребления энергии в базальных условиях. Тем не менее, под воздействием возрастающих концентраций HNE отмечалось усиление клеточного дыхания, определяемое по скорости потребления кислорода (СПК), до истощения биоэнергетической емкости в клетках. Эти результаты привели к созданию концепции «резервной емкости», показателя запаса энергии митохондрий. Как только данный энергетический запас исчерпывался при обработке HNE дыхание ослабевало, и происходила гибель клеток. Таким образом, оценка биоэнергетической резервной емкости может быть эффективным способом оценки или прогнозирования способности клеток к управлению и преодолению стресса, например, подобное встречается при остром окислительном повреждении.

На рисунке 1А представлено биоэнергетическое воздействие HNE-опосредованного повреждения. МЖНК подвергались воздействию различных концентраций гидроксиноненала при мониторинге потребления кислорода в анализаторе XF. Интересно отметить, что HNE стимулировал гликолиз и митохондриальное дыхание в зависимости от концентрации в соответствии с увеличением потребления энергии в ответ на окислительный стресс. Об этом свидетельствует график скорости потребления кислорода (СПК), показателя митохондриального дыхания, в сравнении со скоростью закисления внеклеточной среды (ECAR), показателем гликолиза, демонстрируя «схему метаболизма», позволяющую сравнивать и противопоставлять относительные изменения в двух основных энергообразующих клеточных путях, при аэробном и гликолитическом обмене.

**Рисунок 1** | Биоэнергетический ответ кардиомиоцитов на 4-гидроксинonenаль (HNE)

А. HNE стимулирует гликолиз и митохондриальное дыхание в зависимости от концентрации в соответствии с увеличением потребления энергии в ответ на окислительный стресс.

В. HNE в концентрации до 10 мкМ не оказывает воздействия на максимальную скорость дыхания, определяемую при добавлении FCCP, в то время как концентрации > 10 мкМ подавляют максимальную скорость дыхания, что указывает на истощение дыхательной емкости митохондрий.



Для выявления определенных митохондриальных нарушений, возникающих в ответ на HNE, авторы выполняли один эксперимент, который позволяет создать митохондриальный профиль в любом типе клеток. Данный анализ проводился путем воздействия на обработанные HNE миоциты олигомицина, FCCP (карбонил цианид-п-трифторметоксифенилгидразона) и антимицина А последовательно, как показано на рисунке 1В. После трех базальных измерений в лунки, содержащие миоциты, автоматически вводили HNE в различных концентрациях. Наблюдалось увеличение СПК в зависимости от концентрации для борьбы с возросшим потреблением энергии, вызванным окислительным повреждением. Чтобы дифференцировать АТФ-связанное дыхание (фракцию, чувствительную к олигомицину) и утечку протонов, вводили олигомицин, комплексный ингибитор V. Как показано на рисунке 1Б, под действием HNE отмечалось зависимое от концентрации увеличение утечки протонов (измерение 9, фракция, нечувствительная к олигомицину). Данные результаты показывают, что HNE повышает СПК как за счет увеличения протонной утечки (тем самым снижая митохондриальную эффективность), так и за счет повышения потребления энергии.

После добавления олигомицина определяли максимальную скорость дыхания путем последующего введения в лунки FCCP, разобщающего агента, повышающего СПК до крайне высокого уровня, если его теоретическая максимальная скорость не достигается при правильном титровании. Из рисунка 1В понятно, что HNE в концентрациях 0-10 мкМ не влиял на данную максимальную скорость дыхания. Однако концентрации HNE более 10 мкМ приводили к подавлению потребления кислорода даже после добавления FCCP, что указывает на истощение дыхательной емкости митохондрий. Таким образом, HNE стимулировал потребление АТФ с использованием митохондриальной резервной емкости в зависимости от концентрации с учетом поражения дыхательной цепи, связанного с образованием HNE-индуцированных белковых модификаций. Скорость потребления кислорода, вызванного немитохондриальными источниками, определяли в отсутствии и при наличии HNE с использованием антимицина А, и она оставалась неизменной.

## Обсуждение

Способность клеток реагировать на стресс в условиях повышенного потребления энергии подвержена влиянию биоэнергетической емкости митохондрий. Данная биоэнергетическая емкость зависит от нескольких факторов, включая способность клеток доставлять субстрат в митохондрии и функциональную возможность ферментов, участвующих в транспорте электронов.

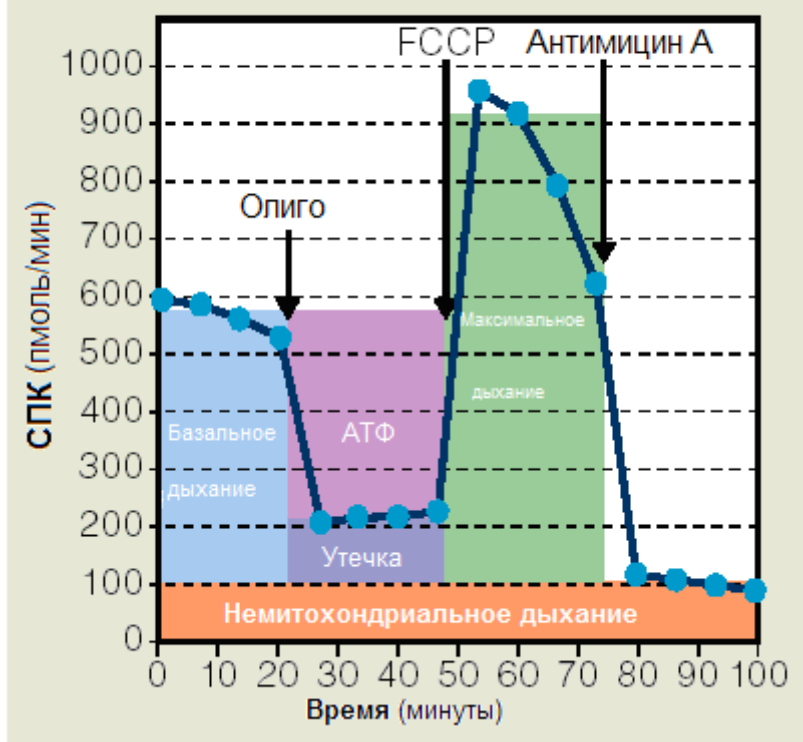
## ОЦЕНКА МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ДИСФУНКЦИИ В ПЕРВИЧНЫХ КАРДИОМИОЦИТАХ

Во все большем количестве исследований данный митохондриальный профиль [рисунок 3] используется для оценки клеточной биоэнергетики, выявления митохондриальной дисфункции и прогнозирования способности клеток реагировать на стресс и/или повреждения [4-7]. Например, Choi с соавт. [4] смогли установить соотношение между резервной дыхательной емкостью и частичным ограничением транспорта протонов посредством митохондриальных комплексов I и II в синаптосомах в качестве модели, чтобы воспроизвести возможные дефекты, связанные с болезнью Паркинсона и Хантингтона соответственно.

В другом исследовании у мышей был удален *Atg7*, основной ген, необходимый для образования аутофагосом [5]. Полагают, что нарушение или недостаточность аутофагии вызывает или способствует старению и развитию ряда возрастных патологий. Данные результаты показывают, что непрерывный окислительный стресс способствует снижению митохондриальной функции, что может лежать в основе патологии, связанной с аутофагией и наблюдаемой в данной модели.

**Повреждение кардиомиоцитов, в данном случае вызываемое окисленными липидами, увеличивает потребление кислорода, уменьшает эффективность дыхания и истощает биоэнергетическую резервную емкость.**

**Рисунок 3 | Биоэнергетический профиль клеток**



После измерения исходной скорости дыхания клеток последовательно добавляли соединения, модулирующие митохондриальную функцию. После добавления каждого соединения измеряли его влияние на скорость потребления кислорода (СПК). При этом определялись четыре основных параметра функции митохондрий: дыхание на исходном уровне, обмен АТФ, утечка протонов и максимальная дыхательная емкость.

### Материалы и методы

**Клетки и соединения:** первичные культуры миоцитов желудочков новорожденных крыс (МЖНК) получали у 2-3-дневных новорожденных крыс линии Sprague–Dawley и культивировали, как описано выше [2].

## ОЦЕНКА МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ДИСФУНКЦИИ В ПЕРВИЧНЫХ КАРДИОМИОЦИТАХ

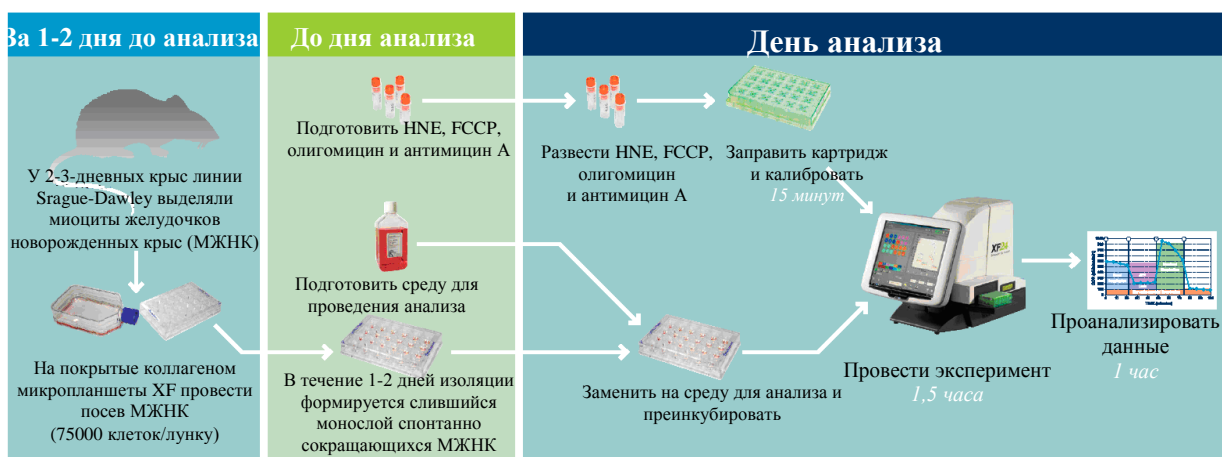
Далее производили посев МЖНК (75000 клеток в каждую лунку) в покрытые коллагеном клеточные V7 культуральные микропланшеты XF V7, содержащие питательную среду с 15% ФБС (фетальной бычьей сывороткой). На следующий день среду заменяли, и клетки выращивали в питательной среде без ФБС. В течение 1-2 дней изоляции формировался слившийся монослой спонтанно сокращающихся МЖНК. Для всех биоэнергетических измерений культуральную среду меняли за 1 час до анализа на небуферизированную среду DMEM (среда Игла в модификации Дульбекко, pH 7,4) с добавлением 4мМ L-глутамин (Гибко). Для определения необходимого оптимального количества клеток производили посев МЖНК до плотности 25000, 50000 или 75000 клеток в каждой лунке. Потребление кислорода в данных клетках носило линейный характер в отношении количества клеток в пределах данного диапазона, и плотность посева 75000 клеток на лунку выбиралась на протяжении оставшегося периода исследований.

4-гидроксиноненаль (HNE) был получен у компании Calbiochem. Олигомицин, FCCP и антимицин А – у компании «Сигма». [В настоящее время доступны в виде набора компании Seahorse Bioscience].

### Анализ XF

Биоэнергетические анализы интактных МЖНК проводили с помощью анализатора XF (Seahorse Bioscience). В анализаторе XF образуются транзиторные микрокамеры объемом всего несколько микролитров в специальных клеточных культуральных микропланшетах. Это позволяет осуществлять мониторинг СПК (скорости потребления кислорода) и ECAR (скорости закисления внеклеточной среды) в режиме реального времени [3]. Показатели митохондриальной функции измерялись следующим образом: через порты картриджей для анализа XF последовательно вводили олигомицин, FCCP и антимицин до достижения окончательных концентраций 1 мкг/мл, 1 мкМ и 10 мкМ соответственно. Это позволяло определить исходный уровень потребления кислорода, количество потребляемого кислорода, связанного с продукцией АТФ, уровень потребления кислорода, не связанного с АТФ (протонная утечка), максимальную дыхательную емкость и немитохондриальное потребление кислорода. До введения HNE регистрировали три базальных измерения СПК и далее проводили 5 последующих измерений до добавления олигомицина [рисунок 1Б]. После перемешивания и регистрации СПК, нечувствительной к олигомицину, вводили FCCP и проводили еще одно измерение СПК. СПК, измеренная после введения FCCP, представляет собой максимальную емкость, которой должна обладать клетка, чтобы восстановить кислород в условиях эксперимента. Наконец, вводили антимицин А для подавления потока электронов посредством комплекса III, и, таким образом, не происходило дальнейшего потребления кислорода в цитохром-с-оксидазе. Остаточное потребление кислорода, определяемое после данной обработки, преимущественно является немитохондриальным и может быть связано с цитозольными ферментами оксидазы.

Рисунок 2 | Схема проведения анализа XF



**Ссылки**

1. Hill BG et al. *Importance of the bioenergetic reserve capacity in response to cardiomyocyte stress induced by 4-hydroxynonenal*. Biochem. J. 2009;424:99–107.
2. Champattanachai, V et al. *Glucosamine protects neonatal cardiomyocytes from ischemia-reperfusion injury via increased protein O-GlcNAc and increased mitochondrial Bcl-2*. Am. J. Physiol. Cell Physiol. 2008;294:C1509–20.
3. Ferrick DA et al. *Advances in measuring cellular bioenergetics using extracellular flux*. Drug Discov Today. 2008;13(5-6):268-74.
4. Choi WS et al. *Bioenergetic analysis of isolated cerebrocortical nerve terminals on a microgram scale: spare respiratory capacity and stochastic mitochondrial failure*. J Neurochem. 2009;109:1179-91.
5. Wu JJ et al. *Mitochondrial dysfunction and oxidative stress mediate the physiological impairment induced by the disruption of autophagy*. Aging. 2009;1(4):425-37.
6. Liu J et al. *Bmi1 regulates mitochondrial function and the DNA damage response pathway*. Nature. 2009;459(7245):387-92.
7. Twig G et al. *Fission and selective fusion govern mitochondrial segregation and elimination by autophagy*. EMBO J. 2008;27(2):433-46.
8. Malmgren S et al. *Tight coupling between glucose and mitochondrial metabolism in clonal-cells is required for robust insulin secretion*. J Biol Sci. 2009; 284(47):32395-404.