



Влияние ингибитора гликолиза (2-ДГ) и разобщителя окисления и фосфорилирования (2,4-ДНФ) на метаболиты головного мозга

О.Б. Шевелев , М.П. Мошкин

Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

Отклонения в метаболизме головного мозга – результат долгосрочных патологических процессов, которые в конечном итоге проявляются как симптомы болезней Альцгеймера, Паркинсона или множественного склероза и многих других нейропатологий, как, например, диабетическая нейропатия. Дефицит доступной энергии для клеток головного мозга на фоне нейродегенеративных заболеваний может развиваться как под влиянием возрастного снижения экспрессии гликолитических ферментов, так и при индуцировании провоспалительными цитокинами разобщения окисления и фосфорилирования. Исходя из того, что активность многих ферментов находится под контролем аденозинтрифосфата (АТФ) или кофакторов, таких как никотинамидадениндинуклеотид (НАДН) и никотинамидадениндинуклеотидфосфат (НАДФН), дефицит энергии может быть причиной метаболических изменений в ткани мозга. В некоторых клинических исследованиях, в которых использовалась протонная ядерная магнитно-резонансная спектроскопия (^1H ЯМР спектроскопия), выявлены метаболические изменения в ткани головного мозга у пациентов с нейродегенеративными заболеваниями. Однако данные разных авторов довольно противоречивы, вероятно, из-за сложного генеза метаболических нарушений. В настоящем исследовании проверена гипотеза о разнонаправленных изменениях метаболизма под влиянием разобщителя окисления и фосфорилирования 2,4-динитрофенола (2,4-ДНФ) и 2-деокси-D-глюкозы (2-ДГ), блокирующей доступ глюкозы в клетки головного мозга. Методом ^1H ЯМР спектроскопии показано, что 2-ДГ приводит к преобладанию возбуждающих (глутамин + глутамат) нейромедиаторов над тормозными (гамма-аминомасляная кислота), а 2,4-ДНФ вызывает противоположные эффекты. Биохимические механизмы наблюдаемых изменений требуют специального исследования, однако можно отметить, что дефицит АТФ, вызванный ингибированием гликолиза, и дефицит АТФ, обусловленный действием разобщителей, сопровождаются разнонаправленными изменениями в интенсивности цикла трикарбоновых кислот. Эти изменения интенсивности цикла Кребса соотносятся с разнонаправленными изменениями баланса возбуждающих и тормозных нейромедиаторов. Полученные результаты показывают, что ^1H ЯМР спектроскопия может быть эффективным методом дифференцированной прижизненной оценки дефицита доступной энергии, вызванного общим подавлением энергообмена в нервных клетках или разобщением окисления и фосфорилирования.

Ключевые слова: метаболиты головного мозга; 2-деокси-D-глюкоза; 2,4-динитрофенол; ^1H ЯМР спектроскопия; нейродегенеративные заболевания.

Impact of glycolysis inhibitor (2-DG) and oxidation and phosphorylation uncoupler (2,4-DNP) on brain metabolites

O.B. Shevelev , M.P. Moshkin

Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia

Deviations in brain metabolism are the result of long-term pathological processes, which finally are manifested as symptoms of Parkinson's or Alzheimer's diseases or multiple sclerosis and other neuropathologies, as for example diabetic neuropathy. A deficiency of available energy for brain cells under neurodegenerative diseases is either developed due to age-dependent underexpression of genes that encode glycolytic enzymes or induced due to the uncoupling of oxidation and phosphorylation that could be mediated by inflammatory cytokines. Since the activity of many enzymes is under the control of adenosine triphosphate (ATP) or cofactors, such as nicotinamide adenine dinucleotide (NADH) and nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH), energy deficiency can cause metabolic changes in brain tissue. Some clinical studies using proton nuclear magnetic resonance spectroscopy (^1H NMR spectroscopy) revealed metabolic changes in brain tissue in patients with neurodegenerative diseases. However, data from different authors are quite contradictory, probably because of the complex genesis of metabolic disorders. In the present study, we tested the hypothesis of multidirectional changes in metabolism under the impact of the oxidation and phosphorylation uncoupler 2,4-dinitrophenol (2,4-DNP) and under the impact of 2-deoxy-D-glucose (2-DG), blocking the access of glucose to the brain cells. ^1H NMR spectroscopy showed that 2-DG leads to the predominance of excitatory (glutamine + glutamate) neurotransmitters over inhibitory ones (gamma-aminobutyric acid), and 2,4 DNP causes opposite effects. The biochemical mechanisms of the observed changes require a special study, but it can be noted that the ATP deficiency caused by inhibition of glycolysis and the ATP deficiency caused by the uncouplers are accompanied by differently directed changes in the intensity of the tricarboxylic acid cycle. These changes in the intensity of the Krebs cycle are correlated with differently directed changes in the balance of the exciting and inhibitory neurotransmitters. The obtained results show that ^1H NMR spectroscopy can be an effective method of differentiated lifetime

assessment of the available energy deficit caused by a general suppression of energy exchange in nerve cells or oxidation and phosphorylation uncoupling.

Key words: brain metabolites; 2-deoxy-D-glucose; 2,4-dinitrophenol; ¹H NMR spectroscopy; neurodegenerative diseases.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Шевелев О.Б., Мошкин М.П. Влияние ингибитора гликолиза (2-ДГ) и разобщителя окисления и фосфорилирования (2,4-ДНФ) на метаболиты головного мозга. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2018;22(2):235-239. DOI 10.18699/VJ18.353

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Shevelev O.B., Moshkin M.P. Impact of glycolysis inhibitor (2-DG) and oxidation and phosphorylation uncoupler (2,4-DNP) on brain metabolites. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2018;22(2):235-239. DOI 10.18699/VJ18.353 (in Russian)

Нейрогенеративные заболевания связаны с дисфункцией митохондрий нейронов и воспалительными процессами (Liu et al., 2017), что должно проявляться в метаболомных изменениях в патологических очагах головного мозга. Дефицит доступной энергии для клеток головного мозга на фоне нейродегенеративных заболеваний может развиваться как под влиянием возрастного снижения экспрессии гликолитических ферментов, так и при индуцировании провоспалительными цитокинами разобщения окисления и фосфорилирования. Поскольку активность многих ферментов регулируется уровнем аденозинтрифосфата (АТФ) или кофакторов, таких как никотинамидадениндинуклеотид (НАДН) и никотинамидадениндинуклеотидфосфат (НАДФН), дефицит энергии может приводить к метаболомным изменениям в ткани мозга. Вместе с тем прижизненные исследования нейрометаболизма методами спектроскопии ядерно-магнитного резонанса (ЯМР) дают противоречивые результаты (Waldman et al., 2002; Shiino et al., 2012). Отчасти это объясняется тем, что формирование дефицита энергии введением животным ингибитора гликолиза 2-деокси-D-глюкозы (2-ДГ) и экспериментальная активация воспалительных процессов при введении бактериального липополисахарида (ЛПС) вызывают разнонаправленные изменения спектра метаболитов в головном мозге (Moshkin et al., 2014). Одной из причин разнонаправленных метаболомных изменений при введении 2-ДГ и ЛПС может быть то, что ингибирование гликолиза подавляет весь каскад метаболомных процессов ресинтеза АТФ. Активация воспалительных процессов может приводить к дефициту доступной энергии (АТФ) из-за разобщения окисления и фосфорилирования (Moshkin et al., 2014).

В настоящем исследовании мы проверили гипотезу о разнонаправленных изменениях метаболизма под влиянием разобщителя окисления и фосфорилирования (2,4-ДНФ) и 2-ДГ, блокирующей доступ глюкозы в энергетический обмен клеток головного мозга.

Материалы и методы

Экспериментальные животные и условия содержания. Работа выполнена на базе ЦКП «SPF-виварий» ИЦиГ СО РАН (RFMEFI61914X0005, RFMEFI62114X0010). Исследовано 44 крысы линии Sprague-Dawley в возрасте 8–9 нед на начало исследования. Животных содержали по одному в индивидуально вентилируемых клетках высотой 20.5 см и площадью 929 см² (OptiRAT, Animal Care, США), при свободном доступе к воде и гранулированному корму

для лабораторных грызунов SPF-категории содержания (грызунов, свободных от видоспецифичных патогенов) «Чара» (ЗАО «Ассортимент-Агро», Россия); искусственном фотопериоде 14С:10Т; температуре 22–24 °С и влажности 40–50 %. В качестве подстилочного материала использовали сухие обеспыленные опилки (ООО «Альбион», Новосибирск). Корм и подстилку перед использованием автоклавировали при температуре 121 °С. Для поения животных использовали деионизированную воду, полученную на установке Millipore, после обогащения минеральной добавкой «Северянка» (ООО «Эко-проект», Санкт-Петербург). Содержание и изучение животных выполнено в соответствии с нормами GLP (Good Laboratory Practice) и правилами Комиссии по биоэтике Института цитологии и генетики СО РАН.

Схема эксперимента

Все препараты вводили внутривентриально за два часа до томографии.

1. Контроль (физиологический раствор) ($n = 10$).
2. Низкая доза 2-ДГ (500 мг/кг) ($n = 6$).
3. Высокая доза 2-ДГ (2000 мг/кг) ($n = 10$).
4. Низкая доза 2,4-ДНФ (12.5 мг/кг) ($n = 8$).
5. Высокая доза 2,4-ДНФ (50 мг/кг) ($n = 10$).

Низкие дозы препаратов были выбраны исходя из минимальных доз, приводящих к таким физиологическим эффектам, как снижение двигательной активности, изменение температуры тела, а высокие дозы обусловлены LD₅₀ (Perry et al., 2013; Moshkin et al., 2014).

Исследования нейрометаболизма проводили на горизонтальном томографе с напряженностью магнитного поля 11.7 Тесла (Bruker, Biospec 117/16 USR, Германия). При помощи ¹H радиочастотных катушек исследовали уровни метаболитов коры головного мозга крыс. За 5 мин до сканирования на томографе крыс обездвигивали газовым наркозом (Isofluran, Baxter Healthcare Corp., США) при помощи наркозного аппарата (The Univentor 400 Anesthesia Unit, Univentor, Мальта). Температуру животных поддерживали благодаря использованию водного контура в томографическом столике-кроватьке, имевшем температуру поверхности 30 °С. Под нижнюю часть туловища помещали пневматический датчик дыхания (SA Instruments, Stony Brook, N.Y., США), что позволяло контролировать глубину наркоза.

¹H-ЯМР спектроскопия. Все протонные спектры головного мозга крысы получены с использованием передающей объемной (500.3 МГц, диаметр 72/89 мм) и при-

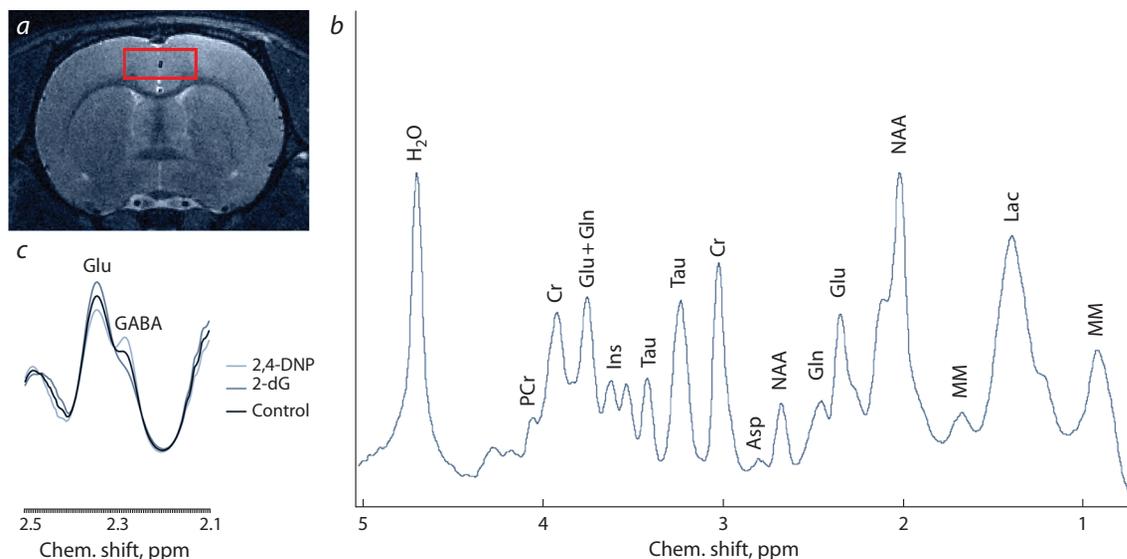


Fig. 1. NMR spectra of brain cortex.

(a) Voxel location in ^1H -MRS of brain cortex. (b) A typical NMR spectrum. (c) Changes in the NMR spectra in rats having received 2-dG, 2,4-DNP, or normal saline (control).

Ins, myo-inositol; PCr, phosphocreatine; Cr, creatine, Glu, glutamate, Gln, glutamine; Tau, taurine, Asp, aspartate; NAA, N-acetylaspartate; GABA, gamma-aminobutyric acid; Lac, lactate, MM, macromolecules.

емной поверхностной (500.3 МГц, размером $123 \times 64 \times 31$ мм) ^1H радиочастотных катушек. Для правильного позиционирования спектроскопических вокселей, размер которых составлял $1.6 \times 4.0 \times 3.0$ мм, методом RARE (rapid with relaxation enhancement) с параметрами импульсной последовательности TE = 11 мс, TR = 2.5 с были сняты T2-взвешенные изображения головного мозга крысы высокого разрешения (толщина среза 0.5 мм, поле обзора 2.5×2.5 см и размер матрицы 256×256 точек). Расположение вокселя на аксиальном срезе показано на рис. 1, a. Все протонные спектры получены с помощью пространственно-локализованной одновоксельной спектроскопии методом STEAM (stimulated echo acquisition mode spectroscopy) с параметрами импульсной последовательности TE = 3 мс, TR = 5 с и количеством накоплений 100. Перед каждым спектроскопическим измерением проводили настройку однородности магнитного поля в пределах выбранного вокселя с помощью методики FastMap. Подавление сигнала воды в спектрах осуществлялось с помощью импульса переменной мощности и оптимизированной задержки релаксационной последовательности (VAPOR).

Обработка ^1H спектров. Для обработки экспериментальных спектров ^1H МРС и определения количественного состава метаболитов использовалась оригинальная разработанная специализированная компьютерная программа, основанная, как и программный пакет LCModel (Provencher, 1993), на предположении о том, что спектр смеси известных соединений представляет собой линейную комбинацию спектров анализируемых компонентов. Подробное описание работы программы опубликовано в статье (Moshkin et al., 2014).

Статистика. Данные представлены как Mean \pm SE. Сравнения средних значений с контролем выполнены на основе *t*-критерия Стьюдента. Для оценки влияния на соотношение возбуждающих и тормозных нейротрансмит-

теров проведен двухфакторный дисперсионный анализ (ANOVA) с факторами «доза» (высокая или низкая) и «препарат» (2-ДГ и 2,4-ДНФ).

Результаты

Протонная ЯМР спектроскопия коры головного мозга показала, что введение 2-ДГ в высокой дозе вызывает статистически значимое снижение уровней N-ацетиласпартата (NAA), ГАМК и фосфорилэтаноламина (PEA) по сравнению с контрольной группой. Введение 2,4-ДНФ приводит к повышению NAA и суммы креатин + фосфокреатин (Cr+PCr), причем эти изменения носят статистически значимый характер при низкой дозе 2,4-ДНФ (таблица).

Для проверки разнонаправленности метаболомных эффектов 2-ДГ и 2,4-ДНФ на животных, получавших препарат, проведен двухфакторный дисперсионный анализ с факторами «тип препарата» и «доза препарата». Статистически значимое взаимодействие факторов установлено для уровня холина (Cho) и соотношения возбуждающих и тормозных нейромедиаторов (см. таблицу). Причем для холина это взаимодействие было обусловлено существенным, почти двукратным его снижением при введении высокой дозы 2-ДГ и лишь статистически незначимой тенденцией к снижению при введении высокой дозы 2,4-ДНФ. Для баланса тормозных и возбуждающих нейротрансмиттеров высокие дозы препаратов вызвали статистически значимые разнонаправленные изменения (рис. 2). Введение 2-ДГ повышало соотношение возбуждающих и тормозных нейромедиаторов, а введение 2,4-ДНФ снижало его.

Обсуждение

Исследование изменений нейрометаболитов, вызванных введением 2-ДГ, выполненное на крысах линии Sprague-Dawley, как и в предыдущих (Moshkin et al., 2014) иссле-

Relative contents of individual metabolites (% of total metabolites) in rat brain cortex (*in vivo* ¹H-MRS)

Group	NAA	GABA	Ala	Asp	Cho	Cr	Glu±Gln
Control	15.91±0.30	6.42±0.40	5.26±1.10	0.47±0.22	1.11±0.13	9.69±0.31	13.49±0.60
Low 2-dG dose	16.61±0.77	5.73±1.01	6.59±1.47	1.18±0.69	1.31±0.23	10.92±0.82	13.06±1.83
High 2-dG dose	13.02±0.60*	4.16±0.74*	5.75±1.05	1.31±0.47	0.66±0.22	10.29±1.38	16.20±1.21*
Low 2,4-DNP dose	18.05±1.14*	6.25±0.54	6.39±2.01	0.39±0.19	1.26±0.16	11.76±0.97*	12.11±0.99
High 2,4-DNP dose	17.01±0.53	6.85±1.16	5.55±0.88	0.69±0.30	1.36±0.21	11.13±0.94	13.72±1.10
F _{1,30} (agent*dose)	2.625	2.605	0.006	0.151	4.606	0.045	1.819
p	0.116	0.117	0.940	0.701	0.040	0.833	0.188

End of table

Group	Ins	Tau	Gly	Lac	PEA	Exc/Inh
Control	3.10±1.09	4.36±0.36	20.09±2.61	6.54±1.39	13.57±1.22	2.30±0.21
Low 2-dG dose	2.32±0.96	5.54±0.41	24.81±2.42	4.36±0.99	7.58±1.35*	1.96±0.39
High 2-dG dose	2.93±1.91	5.23±0.55	22.48±2.85	3.98±1.56	13.99±2.83	4.66±1.08*
Low 2,4-DNP dose	1.88±0.94	4.67±0.52	22.58±3.59	5.86±1.22	8.79±1.31*	2.13±0.41
High 2,4-DNP dose	4.27±1.60	4.59±0.61	20.17±3.25	4.52±1.05	10.14±1.29	1.61±0.21*
F _{1,30} (agent*dose)	0.174	0.002	0.06	0.114	1.675	5.247
p	0.680	0.961	0.807	0.738	0.206	0.030

NAA, N-acetylaspartate; GABA, gamma-aminobutyric acid; Ala, alanine; Asp, aspartate; Cho, choline; Cr, creatine; Glu + Gln, glutamine + glutamate; Ins, myoinositol; Tau, taurine; Gly, glycine; Lac, lactate; PEA, phosphorylethanolamine; EXC/INH, the ratio between exciting and inhibitory transmitters. The data are shown as mean ± standard error of the mean.

* Statistically significant difference from the control group.

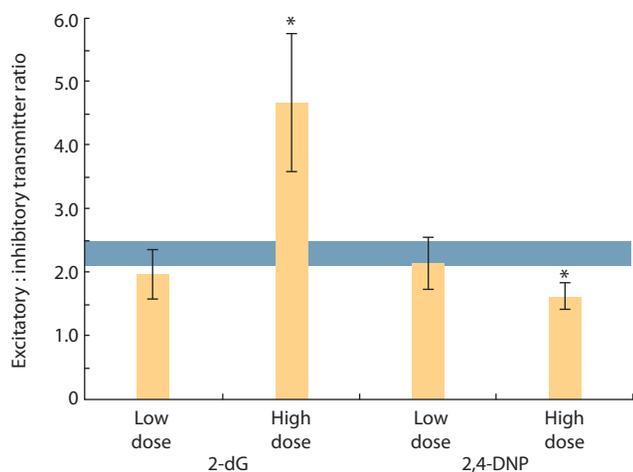


Fig. 2. Ratio between excitatory and inhibitory neurotransmitters. The dark band shows the range of values for the control group. Asterisks indicate statistically significant differences from the control group.

дованиях на мышах, показало, что блокирование энергетического обмена, обусловленное введением ингибитора гликолиза, смещает баланс возбуждающих и тормозных нейромедиаторов. Преобладание возбуждающих нейромедиаторов при энергетическом дефиците клеток головного мозга хорошо согласуется с повышением возбудимости

на начальных стадиях гипоксии (Mordel et al., 2016; Dang et al., 2017).

Кроме того, результаты исследования нейрометаболитов головного мозга сочетаются также с преобладанием возбуждающих нейромедиаторов над тормозными при таких состояниях энергетического дефицита, как селекция крыс на повышенную агрессивность, приводящая к снижению уровня глюкозы в мозге (Гулевич и др., 2015).

Прямо противоположная картина в изменениях нейротрансмиттеров наблюдается при введении 2,4-ДНФ, разобщителя окисления и фосфорилирования. Высокая доза 2,4-ДНФ вызывает смещение баланса возбуждающих и тормозных нейромедиаторов в пользу последних. Следует отметить, что введение 2,4-ДНФ модулирует метаболические изменения в переднем мозге крыс, схожие с таковыми при различных нарушениях сна, и, соответственно, выраженной сонливости (Kalinchuk et al., 2003).

Таким образом, сдвиги в соотношении возбуждающих и тормозных нейромедиаторов, обусловленные высокими дозами 2-ДГ и 2,4-ДНФ, хорошо согласуются с физиологическими состояниями, которые регистрируются либо при общем дефиците энергии, либо под воздействием факторов, приводящих к разобщению окисления и фосфорилирования. Биохимические механизмы наблюдаемых изменений требуют специального исследования, однако можно отметить, что дефицит АТФ, обусловленный ингибированием гликолиза, и дефицит АТФ, вызванный действием разобщителей, сопровождаются разнонаправ-

ленными изменениями в интенсивности цикла трикарбоновых кислот, и, соответственно, в балансе $NAD^+/NADH$. Эти изменения интенсивности цикла Кребса соотносятся с разнонаправленными изменениями баланса возбуждающих и тормозных нейромедиаторов.

Полученные результаты показывают, что ЯМР спектроскопия может быть эффективным методом дифференцированной прижизненной оценки дефицита доступной энергии, вызванного общим подавлением энергообмена в нервных клетках или разобщением окисления и фосфорилирования. Однако применение ЯМР спектроскопии при исследовании патологий мозга требует дополнительных сведений о причинах изменений мозгового энергообмена.

Acknowledgments

This study was supported by State Budgeted Project 0324-2018-0016. Use of the equipment of the Shared Access Center was supported by the Russian Ministry of Education and Science, project identifier RFMEFI62117X0015.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

- Dang Y.X., Shi K.N., Wang X.M. Early changes in glutamate metabolism and perfusion in basal ganglia following hypoxia-ischemia in neonatal piglets: A multi-sequence 3.0t MR study. *Front. Physiol.* 2017;8:237. DOI 10.3389/fphys.2017.00237.
- Gulevich R.G., Akulov A.E., Shikhevich S.G., Kozhemyakina R.V., Plyusnina I.Z. Proton magnetic resonance spectroscopy of neuro-metabolites in the hippocampi of aggressive and tame male rats. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding.* 2015;19(4):432-438. DOI 10.18699/VJ15.057. (in Russian)
- Kalinchuk A.V., Urrila A.S., Alanko L., Heiskanen S., Wigren H.K., Suomela M., Stenberg D., Porkka-Heiskanen T. Local energy depletion in the basal forebrain increases sleep. *Eur. J. Neurosci.* 2003; 17(4):863-869.
- Liu H., Dai C., Fan Y., Guo B., Ren K., Sun T., Wang W. From autophagy to mitophagy: the roles of P62 in neurodegenerative diseases. *J. Bioenerg. Biomembr.* 2017; 49(5):413-422. DOI 10.1007/s10863-017-9727-7.
- Mordel J., Sheikh A., Tsohataridis S., Kanold P.O., Zehendner C.M., Luhmann H.J. Mild systemic inflammation and moderate hypoxia transiently alter neuronal excitability in mouse somatosensory cortex. *Neurobiol. Dis.* 2016;88:29-43. DOI 10.1016/j.nbd.2015.12.019.
- Moshkin M.P., Akulov A.E., Petrovski D.V., Saik O.V., Petrovskiy E.D., Savelov A.A., Koptuyug I.V. Proton magnetic resonance spectroscopy of brain metabolic shifts induced by acute administration of 2-deoxy-D-glucose and lipopolysaccharides. *NMR Biomed.* 2014;27:399-405. DOI 10.1002/nbm.3074.
- Perry R.J., Kim T., Zhang X.M., Lee H.Y., Pesta D., Popov V.B., Zhang D., Rahimi Y., Jurczak M.J., Cline G.W., Spiegel D.A., Shulman G.I. Reversal of hypertriglyceridemia, fatty liver disease, and insulin resistance by a liver-targeted mitochondrial uncoupler. *Cell Metab.* 2013;18(5):740-748. DOI 10.1016/j.cmet.2013.10.004.
- Provencher S.W. Estimation of metabolite concentrations from localized in vivo proton NMR spectra. *Magn. Reson. Med.* 1993;30(6): 672-679.
- Shiino A., Watanabe T., Shirakashi Y., Kotani E., Yoshimura M., Morikawa S., Inubushi T., Akiguchi I. The profile of hippocampal metabolites differs between Alzheimer's disease and subcortical ischemic vascular dementia, as measured by proton magnetic resonance spectroscopy. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 2012;32:805-815. DOI 10.1038/jcbfm.2012.9.
- Waldman A.D.B., Rai G.S., McConnell J.R., Chaudry M., Grant D. Clinical brain proton magnetic resonance spectroscopy for management of Alzheimer's and sub-cortical ischemic vascular dementia in older people. *Arch. Gerontol. Geriatr.* 2002;35:137-142.