



UDK: 616.8:577.3:577.1

Parizoda YULDASHEVA,
O'zbekiston Milliy universiteti magistranti
E-mail: parizodayuldasheva01@gmail.com
Farangiz XURRAMOVA,
O'zbekiston Milliy universiteti magistranti
Kamila NEBESNAYA,
Ilg'or texnologiyalar markazi, kichik ilmiy xodimi, PhD
Artyom BAEV,
Ilg'or texnologiyalar markazi katta ilmiy xodimi, PhD
O'zbekiston Milliy universiteti dotsenti
Nafisa KOMILOVA,
O'zbekiston Milliy universiteti dotsenti, PhD

O'zMU huzuridagi Biofizika va biokimyo instituti katta ilmiy xodimi, PhD, M.Mustafakulov taqrizi asosida

LACTATE PROTECTS SH-SY5Y CELLS FROM ROTENONE-INDUCED NEUROTOXICITY BY REGULATING MITOCHONDRIAL BIOENERGETICS

Annotation

In this study, an *in vitro* Parkinson's model was induced by rotenone in the SH-SY5Y neuroblastoma cell line, and the effect of L-lactate on mitochondrial function was investigated. Rotenone inhibits mitochondrial complex I, leading to a decrease in membrane potential (Ψ_M) and, consequently, a shift of ATP synthase into hydrolysis mode. Treatment with lactate increased the Ψ_M levels in the cells, significantly reduced the role of F_1F_0 ATPase in Ψ_M formation, and enhanced the activity of the electron transport chain (ETC).

Keywords: L-lactate, Parkinson's disease, mitochondrial membrane potential, rotenone, electron transport chain, ATP synthase.

ЛАКТАТ ЗАЩИЩАЕТ КЛЕТКИ SH-SY5Y ОТ НЕЙРОТОКСИЧНОСТИ, ИНДУЦИРОВАННОЙ РОТЕНОНОМ, РЕГУЛИРУЯ МИТОХОНДРИАЛЬНУЮ БИОЭНЕРГЕТИКУ

Аннотация

В данном исследовании на клеточной линии нейробластомы SH-SY5Y была создана *in vitro* модель болезни Паркинсона, индуцированная ротеноном, и изучено влияние L-лактата на функцию митохондрий. Ротенон ингибирует I комплекс дыхательной цепи митохондрий, что приводит к снижению мембранного потенциала (Ψ_M) и, как следствие, переключению АТФ-синтазы в режим гидролиза. Обработка лактатом повышала уровень Ψ_M в клетках, значительно уменьшала роль F_1F_0 -АТФазы в формировании Ψ_M и усиливала активность электрон-транспортной цепи (ЭТЦ).

Ключевые слова: L-лактат, болезнь Паркинсона, митохондриальный мембранный потенциал, ротенон, электрон-транспортная цепь, АТФ-синтаза.

LAKTAT SH-SY5Y HUYAYRALARINI MITOXONDRIYALAR BIOENERGETIKASINI TARTIBGA SOLISH ORQALI ROTENON KELITIRIB CHIQRADIGAN NEYROTOKSIKLIKDAN HIMOYA QILADI

Annotation

Mazkur tadqiqotda SH-SY5Y neyroblastoma hujayra liniyasida rotenon bilan induksiyalangan *in vitro* Parkinson modeli yaratilib, L-laktatning mitoxondriyalarning funksiyaga ta'siri o'rganildi. Rotenon mitoxondriyalarning I kompleksini ingibirlab, membrana potentsiali (Ψ_M)ning pasayishiga va natijada ATF sintazaning gidroliz rejimiga o'tishiga olib keladi. Laktat bilan ishlov berish hujayralarning Ψ_M ko'rsatkichini oshishiga, Ψ_M shakllanishida F_1F_0 ATFaza rolini sezilarli darajada kamayishiga, elektron transport zanjiri (ETZ) ning faolligi oshishiga olib keldi.

Kalit so'zlar: L-Laktat, SH-SY5Y, Parkinson kasalligi, mitoxondriya membrana potentsiali, rotenon, elektron transport zanjiri, ATF sintaza.

Kirish. Parkinson kasalligida o'rta miyadagi dofaminergik neyronlar degeneratsiyasi kuzatiladi. Hozirda mitoxondriyalar faoliyatni tiklaydigan va hujayraviy metabolizmni qo'llab-quvvatlaydigan tabiiy yoki endogen moddalarni tadqiq qilish dolzarb hisoblanadi. Laktat shu kabi moddalardan biri bo'lib, uning neyronlar va glia hujayralarda energetik va signal funksiyalarini bajarishi so'nggi yillarda keng tadqiq qilinmoqda. Uzoq yillar davomida laktatga asosan glikoliz natijasida hosil bo'ladigan oxirgi mahsulot sifatida qaralgan bo'lsa-da, so'nggi yillarda u markaziy asab tizimida muhim biologik vazifani bajaruvchi faol molekula sifatida qayta baholandi. Ko'plab tadqiqotlar laktatning neyroprotektiv xususiyatlarga ega ekanligini ko'rsatgan. [1] Sichqonlarda o'tkazilgan ishemik insult modelida laktat yuborilishi orqali miya to'qimalarida shikastlanish darajasining kamayishi va funksional tiklanish kuzatilgan [2]. So'ngi yillarda olib borilgan tajribalarda laktat va piruvat Parkinson kasalligining *in vitro* modellari bo'yicha ham neyroprotektiv ta'sir ko'rsatishi aniqlangan. Xususan, SH-SY5Y hujayralari va birlamchi neyron-astrotsit kulturasida modellarida MPP⁺ toksikligiga qarshi himoya ta'siri kuzatilgan, bu mitofagiya va autofagiya jarayonlarining faollashuvi bilan izohlangan [3]. Ushbu tadqiqotda Parkinson kasalligining eksperimental modelida laktatning mitoxondriyalarga ta'siri o'rganilib, uning neyroprotektiv salohiyati eksperimental jihatdan asoslab berildi.

Material va metodlar. SH-SY5Y hujayra liniyasini saqlash va ko'paytirish. Neyroblastoma hujayralari [5] da ko'rsatilgandek, hujayra kulturasiga o'tkazildi. Hujayralarni saqlash va o'stirish uchun ozuqa muhiti sifatida Eagle's Minimal Essential Medium va F12 muhitining (Gibco F12, ThermoFisher Scientific #11765054) 1:1 nisbatdagi aralashmasidan foydalanildi va harorat 37 °C va atmosfera muhitida 95% havo va 5% CO₂ bo'lgan inkubatorida saqlandi. Ozuqa muhiti tarkibida 1% antibiotik qo'shildi va uning ta'sir etish davomiyligi qo'shilganidan so'ng 1 oy muddatda hisoblanadi. Ozuqa muhiti har 4-7 kunda yangilab turiladi.

Tajriba davomida hujayralar 4 guruhga: 1-nazorat, 2-rotenon, 3-nazorat+rotenon, 4-rotenon+laktat guruhlariga ajratildi. 2,3,4 guruhlariga Parkinson kasalligi *in vitro* modelini yaratish uchun muhitga 1 μ M rotenon qo'shiladi va 24 soat inkubatorida saqlandi. 4-guruhdagi hujayralarga rotenon bilan bir vaqtda 20 mM Na-L laktat ham qo'shildi [2].

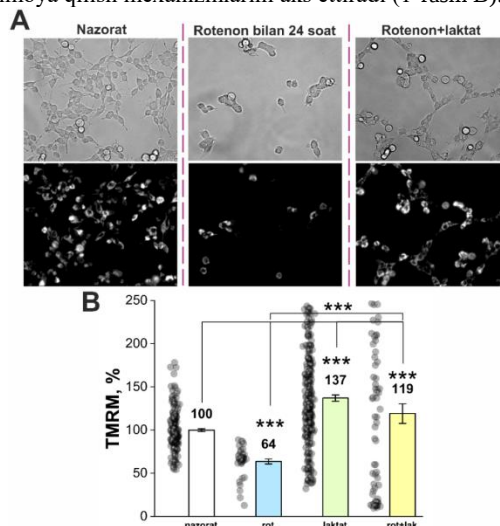
Mitoxondriya membrana potentsiali ($\Delta\Psi_m$) ni o'lchash. $\Delta\Psi_m$ baholash uchun $\Delta\Psi_m$ ga sezgir bo'lgan TMRM fluorestsent zondi va CELENA® S (logos Biosystems) fluorestsensiya mikroskopidan foydalanildi. Tajriba avvalida hujayralar HBSS (Hank's Balanced Salt Solution) muhiti bilan 3 marta yuvildi va 25 nM TMRM fluorestsent zondi bilan 20 daqiqa qorong'u, doimiy va sekinlik bilan aralashtirish sharoitida bo'yaldi. Mikroskop har 20 sekunda tasvirga oladi va har bir tajriba 12-15 daqiqa davom etadi. Tajriba 20 $\times$ obyektiv va 548_{qo'zg'atish}/574_{emissiya} da TMRM uchun RFP filtrida ko'riladi.

Statistik tahlil uchun Origin Pro 2024 dasturidan foydalanildi. Statistik tahlil bir omilli dispersion tahlil usullari (ANOVA, Tukey testi) yordamida amalga oshirildi. Farqlar $p < 0.05$ bo'lganda statistik jihatdan ahamiyatli deb hisoblandi.

Olingan natijalar. Mitoxondriya membrana potentsialini doimiy saqlab turish hujayra energetik gomeostazining muhim tarkibiy qismlaridan biri hisoblanadi. Neyrodegenerativ kasalliklar, jumladan, Parkinson kasalligida mitoxondriya membrana potentsialining pasayishi kuzatiladi, bu esa elektron transport zanjirining samaradorligining kamayishiga olib kelishi mumkin. ETZ yuzaga keltiradigan proton gradiyenti ATF sintezi uchun harakatlantiruvchi kuch vazifasini bajaradi. Biroq, hujayraning patologik holatlarida elektron transport zanjirining faoliyati izdan chiqqanda, mitoxondriyaning ATF sintaza fermenti teskari rejimda ishlay boshlaydi, ya'ni ATF gidrolizi evaziga olingan energiyani sarflab membranadagi proton gradiyentini ta'minlaydi. Hujayralarning patologik sharoitlarda ATF sintazaning gidroliz rejimida ishlash foizi sezilarli darajada oshishi kuzatiladi. Bu holat uzoq vaqt davom etganda esa energiya tanqisligi yuzaga keladi. Hujayralardagi bu o'zgarishlar kasallik markerlari sifatida ishlatilishi mumkin.

Rotenon yordamida mitoxondriya disfunktsiyasi orqali keltirib chiqarilgan Parkinson kasalligining *in vitro* modelida L-laktatning ta'sirini baholash uchun rotenon bilan bir vaqtda hujayralar L-laktat bilan 24 soat davomida inkubatsiya qilindi (1-rasm A). Rotenon guruhida Ψ_m 64% ga kamaygan (1-rasm B). Bu natija rotenonning mitoxondriyalarni shikastlovchi ta'sirini tasdiqlaydi: ya'ni rotenon mitoxondriyalarning I kompleksini (NADH-degidrogenaza) ingibirlab, elektronlar transportiga to'sqinlik qiladi. Natijada proton gradienti susayadi va ATF sintezi kamayadi. Ψ_m ning pasayishi hujayralarda energetik yetishmovchilik, oksidativ stress va apoptotik yo'llarning faollashuviga olib kelishi mumkin. Bu Parkinson kasalligining patologik mexanizmlariga mos keladi. Laktat guruhida Ψ_m nazoratga nisbatan 37% ga ko'tarilgan. Bu laktat mitoxondriyalarni nafaqat patologik holatlarda, balki fiziologik sharoitda ham ijobiy ta'sir qilishi mumkinligini ko'rsatadi: ya'ni laktat astrositlarda energetik metabolizmi modulyatsiya qiluvchi signal molekulasini (ANLS-astrocyte-neuron lactate shuttle) sifatida ishlashi mumkin. Ψ_m ning oshishi hujayralarning energiya ishlab chiqarish qobiliyatini oshirishi va ularning stressga chidamliligini yaxshilashi mumkin (1-rasm B).

Rotenon + laktat guruhida laktat rotenon ta'sirini to'liq bartaraf etdi. Bu laktat mitoxondrial funktsiyani qo'llab-quvvatlovchi alternativ energiya manbai bo'lishi mumkin ekanligini ko'rsatadi. U piruvatga aylantirilib, mitoxondriyalar uchun substrat (Krebs sikli orqali) sifatida ta'sir ko'rsatishi mumkin. Laktatning Ψ_m ni tiklash qobiliyati energetik metabolizmi turg'unlashtirish orqali hujayralarni himoya qilish mexanizmlarini aks ettiradi (1-rasm B).



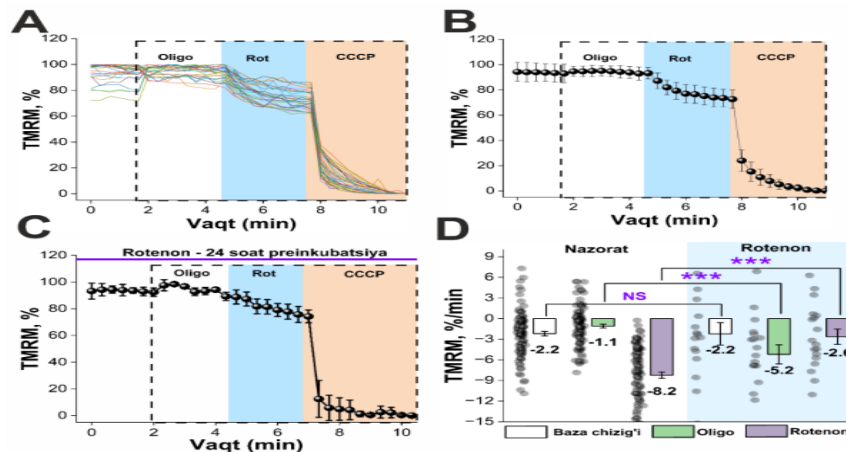
1-rasm. Parkinson kasalligining rotenon modelida Ψ_m ga laktat ta'siri. A. Nazorat, rotenon va rotenon+laktat guruhidagi hujayralarning yorug'lik ostida (yuqori qator) va TMRM fluorestsensiyasi (pastki qator) aks etgan tasvirlar. B. Barcha guruhlardagi hujayralarning TMRM fluorestsensiyasi (Ψ_m aks ettiradi). Nazorat – N=8; n=263, Rotenon – N=7; n=58, Laktat – N=8; n=336, Rotenon+laktat – N=6; n=86 (N – tajribalar soni; n – statistikaga kiritilgan hujayralar soni). *** - $p \leq 0,001$.

Mitoxondrial membrana potentsialining shakllanishida ATF sintazaning rolini baholash uchun tajriba davomida ATF sintaza selektiv ingibitori bo'lgan oligomitsin A dan foydalanildi. Nazorat hujayralarda tajriba davomida oligomitsin A qo'shilishi TMRM fluorestsensiyasining ya'ni Ψ_m ning oshishiga olib keldi (2-rasm, A va B). So'ngra rotenonni qo'shish ETZ I kompleksining ingibirlanishiga va Ψ_m ning keskin pasayishiga olib keldi, bu esa TMRM nurlanish intensivligining pasayishi sifatida qayd etildi (2-rasm A,B,C,D). Har bir tajriba oxirida Ψ_m ni shartli nolgacha kamaytirish uchun CCCP qo'shildi (bunda potentsial hosil bo'lish

va sochilish tezligi muvozanat chegarasigacha pasayadi, ammo bu mutlaq nol emas). Rotenon guruhidagi hujayralarga tajriba davomida oligomitsin va keyinchalik rotenon qo'shilishi Ψ_M ning pasayishiga olib keldi (2-rasm C, D).

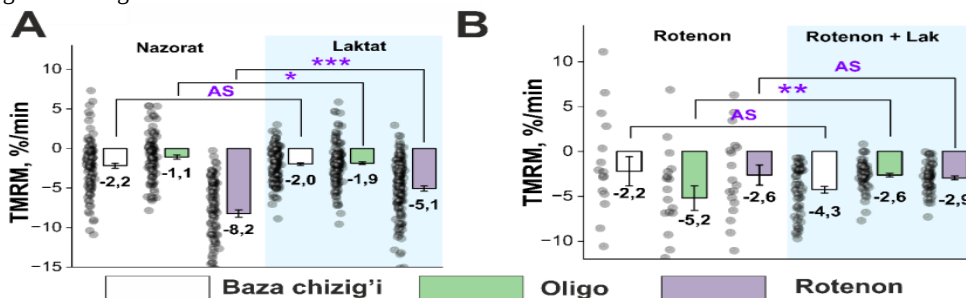
Ψ_M hosil bo'lishida ETZ va ATF-sintazaning ta'sirini baholash uchun biz vaqt birligi ichida TMRM nurlanish intensivligining o'zgarish tezligini hisobladik (2-rasm D, 3-rasm A,B). Ushbu maqsadlar uchun tajribalarning barcha asl yozuvlari 100% ga normallashtirildi, ya'ni har bir hujayra uchun TMRM nurlanish intensivligining maksimal qiymati (tajribaning istalgan vaqtida) 100% deb, minimal qiymati (CCCP qo'shilgandan keyin) esa 0 % deb qabul qilindi. Ushbu amallar Origin Pro 2021 dasturida "normalize curves" funksiyasi yordamida amalga oshirildi. Keyinchalik, biz grafik egri chiziqlarining turli qismlarida tajribaning 1 daqiqasida TMRM ning % o'zgarish tezligini baholadik - asosiy chiziq (tajriba boshidan oligomitsin A qo'shilgunga qadar), Oligo (oligomitsin qo'shilgandan keyingi va rotenon qo'shilgungacha bo'lgan qism), Rotenon (rotenon qo'shilgandan keyingi va CCCP qo'shilgungacha bo'lgan qism) (2-rasm D, 3-rasm A,B). CCCP tezligini o'lchash amalga oshirilmadi, chunki tajriba doirasida ushbu moddaning ta'sir tezligi faqat ushbu moddani ma'lum bir hujayraga yetkazib berish tezligi bilan cheklangan, ammo uning ta'sir tezligi bilan emas. Natijalar tahlili shuni ko'rsatdiki, nazorat hujayralarida oligomitsin qo'shilishi hujayralarda Ψ_M ning oshishiga, rotenon qo'shilishi esa Ψ_M ni 15%/min tezlikda pasayishiga olib keldi (2-rasm A, B). Rotenon guruhida oligomitsin Ψ_M ning 6%/min tezlikda pasayishiga, rotenonning qo'shilishi ham Ψ_M ni nazoratga nisbatan sezilarli pasayishiga olib keldi (2-rasm, C).

Ψ_M ning maksimal qiymati -200 - (-220) mV atrofida bo'lishi mumkin, ammo mitoxondriyalarning normal faoliyatida potentsialning haqiqiy qiymatlari -150 dan -180 mV gacha o'zgarib turadi. Buning sababi shundaki, ETZ faoliyati tufayli ortib boradigan Ψ_M energiyasi doimiy ravishda ATF sinteziga (potentsialning asosiy qismi), shuningdek, turli xil transport jarayonlarini qo'llab-quvvatlashga sarflanadi, masalan: matriksdan ATFning sitoplazmadagi ADFga almashinuvi, H^+/Ca^{2+} almashinuvi va boshqalar. Shunga ko'ra, oligomitsin sog'lom hujayralarga qo'shilganda, Ψ_M ning asosiy iste'molchisi bo'lgan tizim (F_1F_0 ATF sintaza) ingibirlanadi, ammo ETZ normal rejimda ishlashda davom etadi, bu esa giperpolarizatsiyaga - potentsialning oshishiga olib keladi.



2-rasm. Hujayralarning mitoxondrial membrana potentsiali kinetikasi. Nazorat (A, B), rotenon (C) hujayralarning Ψ_M o'zgarish kinetikasi. Nazorat va rotenon guruhida TMRM fluoresensiyasi o'zgarish tezligi (D). TMRM signali 100 % ga normallashtirilgan, natijalar tajribadagi barcha hujayralarning o'rtacha qiymati $\pm$ standart xatolik ($\pm$ SEM) sifatida keltirilgan. N=5, n=60. (N – tajribalar soni; n – statistikaga kiritilgan hujayralar soni). *** - $p \leq 0,001$. NS – ahamiyatsiz.

Bu jarayon cheksiz davom etishi mumkin emas, chunki mitoxondriyaning ichki membranasini, hisob-kitoblarga ko'ra, taxminan -220 mV elektr sig'imga ega. Agar potentsial o'sishda davom etsa, bu membrananing lokal yorilishiga va protonlarning matriksga chiqishiga olib keladi. Shunga ko'ra, biz sog'lom hujayralarda kutatgan ta'sir nazariy jihatdan asoslangan bo'lib, nazorat hujayralarimiz mitoxondriyalarning faoliyati nuqtayi nazaridan haqiqatan ham sog'lom ekanligini tasdiqlaydi. Keyinchalik rotenon qo'shilganda, biz potentsialning keskin pasayishini kuzatdik, bu ham normal holat, chunki bunda ushbu potentsialni shakllantiradigan tizim ingibirlanadi.



3-rasm. Ψ_M shakllanishida F_1F_0 ATF-sintaza va ETZ ishtirokini baholash. TMRM fluoresensiyasi o'zgarishining tezligi nazorat (A) va rotenon guruhlarida (B) o'lchandi. Grafik barlarining ostidagi raqamlar grafikning har bir qismida barcha hujayralar uchun o'rtacha tezlik qiymatini bildiradi. Nazorat N=4; n=134, Rotenon – N=3; n=25, Rotenon+laktat – N=5; n=65, Laktat – N=5; n=213 (N – tajribalar soni, n – hujayralar soni). * - $p \leq 0,05$, ** - $p \leq 0,01$, *** - $p \leq 0,001$, AS – ahamiyatsiz

Rotenon guruhidagi hujayralarga oligomitsin ta'sir ettirilganda TMRM signali kamaygani kuzatildi, ya'ni ushbu hujayralarda potentsialning bir qismi ATF sintazaning gidroliz rejimida ishlayotgani hisobiga shakllanishi haqidagi fikrlarga mos keladi [6]. Keyinchalik ularga rotenon qo'shilishi ushbu kompleks faolligining yanada pasayishiga olib keldi va bu ta'sir nazorat hujayralariga nisbatan sezilarli darajada past bo'lgani qayd etildi (3-rasm, A va B).

Xulosa. Mitoxondriyalar uchun o'z membrana potensialini saqlab qolish, ATF sintezidan ko'ra ustuvor vazifadir. Shu sababdan F_1F_0 ATP sintaza mitoxondriyaning ichki membrana potentsiali (Ψ_m) pasayganda H^+ gradiyentini barqaror ushlab turish uchun ATFni sintezlash emas, aksincha gidroliz qila boshlaydi. Natijada yuzaga keladigan energiya tanqisligi sharoitida laktat eng avvalo alternativ energiya manbai bo'lib xizmat qiladi. So'ngi yillarda laktatning boshqa bir qator jarayonlarni faollashtira oladigan molekula sifatidagi roli keng tadqiq qilinayotganini inobatga olsak, mazkur tadqiqot natijalari Parkinson kasalligida mitoxondriya disfunktsiyasi bilan bog'liq molekulyar mexanizmlar va ularga laktatning ta'sirini chuqurroq tadqiq qilish uchun asos bo'lib xizmat qiladi.

Minnatdorchilik. Ushbu tadqiqot Ilg'or Texnologiyalar Markazi byudjet mablag'lari, shuningdek № AL-7823051647 (K.N.R.) amaliy loyihasi ko'magida amalga oshirilgan.

Mualliflarning hissasi. X.F.T., Yu.P.B. – tadqiqotlarni o'tkazish, ma'lumotlarni tahlil qilish, nashr uchun rasmlar tayyorlash, dastlabki qo'lyozma variantini yozish; N.K.S. – tadqiqotlarni o'tkazish; K.N.R. – tadqiqotlarni o'tkazish, qo'lyozmani tahrirlash, resurslar; B.A.Y. – tadqiqotlarni konseptualizatsiya qilish va dizayni, tadqiqotlarni o'tkazish, ma'lumotlarni tahlil qilish, qo'lyozma yozish va tahrirlash.

ADABIYOTLAR

1. Jourdain, P., et al., L-Lactate protects neurons against excitotoxicity: implication of an ATP-mediated signaling cascade. (2045-2322 (Electronic)).
2. Berthet, C., et al., *New evidence of neuroprotection by lactate after transient focal cerebral ischaemia: extended benefit after intracerebroventricular injection and efficacy of intravenous administration.* (1421-9786 (Electronic)).
3. Fedotova, E.A.-O., et al., *Lactate and Pyruvate Activate Autophagy and Mitophagy that Protect Cells in Toxic Model of Parkinson's Disease.* (1559-1182 (Electronic)).
4. Babenko, V.A., et al., *Lactate protects neurons and astrocytes against ischemic injury by modulating Ca^{2+} homeostasis and inflammatory response.* FEBS J, 2024. **291**(8): p. 1684-1698.
5. Xie, H.R., L.S. Hu, and G.Y. Li, *SH-SY5Y human neuroblastoma cell line: in vitro cell model of dopaminergic neurons in Parkinson's disease.* Chin Med J (Engl), 2010. **123**(8): p. 1086-92.
6. Lhuissier, C., et al., *Mitochondrial F0F1-ATP synthase governs the induction of mitochondrial fission.* (2589-0042 (Electronic)).