

Количественный метаболомный профиль сыворотки крови и мозга крыс OXYS – модели болезни Альцгеймера

Снытникова О.А.^{1*}, Смоленцев А.А.¹, Телегина Д.В.², Центалович Ю.П.¹, Колосова Н.Г.²

¹ Институт «Международный томографический центр» СО РАН, Новосибирск, Россия

² Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, Россия

* snytnikova_olga@tomo.nsc.ru

Ключевые слова: Болезнь Альцгеймера; крысы OXYS; сыворотка; гиппокамп; ЯМР

Мотивация и цель: Метаболомный подход находит широкое применение в изучении патогенеза различных заболеваний, поскольку позволяет с высокой точностью оценивать характер изменения метаболизма при их развитии и выявлять потенциальные биомаркеры. Важным объектом в таких исследованиях являются животные – экспериментальные модели заболеваний человека, позволяющие получать знания, необходимые для разработки методов их диагностики, профилактики и лечения. Возраст – основной фактор риска Болезни Альцгеймера (БА), которая становится основной причиной сенильной деменции. Эффективных способов профилактики и лечения БА нет, что обусловлено неполнотой знаний патогенеза заболевания, которое десятилетиями развивается бессимптомно, а также дефицитом моделей самой распространенной (>95 %) спорадической формы БА. Настоящее исследование выполнено на преждевременно стареющих крысах OXYS – уникальной модели спорадической формы БА, у которых спонтанно развиваются все ключевые патогенетические и «клинические» признаки заболевания. Их последовательность: дисфункция митохондрий, гиперфосфорилирование тау-белка, нарушение длительной посттетанической потенциации, синаптическая недостаточность, деструктивные изменения нейронов, нарушения поведения и снижение когнитивных функций на ранних стадиях и их прогрессия на фоне повышения уровня APP, усиленного накопления A β и образования амилоидных бляшек в мозге, – соответствует современным представлениям о патогенезе спорадической формы БА у людей [1]. Цель работы – сравнение метаболома гиппокампа и сыворотки крови крыс OXYS на разных стадиях развития признаков БА для выявления наиболее перспективных с прогностической точки зрения биомаркеров – низкомолекулярных метаболитов, отражающих нарушения в метаболических циклах. Были исследованы крысы OXYS в «доклинический» период, предшествующий развитию признаков БА (в возрасте 20 дней), в период их манифестации (3–4 мес.) и активной прогрессии (16–18 мес.). Крысы линии Wistar того же возраста служили контролем.

Методы и алгоритмы: Методом метаболомного профилирования с использованием аналитической платформы на основе ЯМР спектроскопии проведен количественный анализ метаболитов мозга и крови крыс. Полученные данные проанализированы методами хемометрического и статистического анализа.

Результаты: Для метаболитов мозга (гиппокамп, 59 соединений) и сыворотки крови (55 соединений) были установлены диапазоны варьирования и средние

значения концентраций. Анализ полученных данных выявил основные закономерности изменения метаболома при старении, связанные прежде всего с энергетическим метаболизмом и нейротрансмиттерами. Установлено, что развитие, манифестация и прогрессия признаков БА у крыс OXYS происходит на фоне повышенного, по сравнению с крысами Wistar, уровня сцилло-инозитола и сниженного – гипотаурина в гиппокампе, которые были изменены у животных всех исследованных возрастных групп [2]. Полученные результаты позволили предположить, что повышенный уровень сцилло-инозитола в мозге может служить предиктором и потенциальным биомаркером развития признаков БА у крыс OXYS и, возможно, этого заболевания у людей. Однако в сыворотке крови уровень сцилло-инозитола достоверно снижался с возрастом и при этом не различался у крыс Wistar и OXYS, а уровень гипотаурина был ниже уровня детекции, что не позволяет использовать эти соединения в качестве доступных биомаркеров ранних стадий БА. Помимо сцилло-инозитола, было обнаружено еще 33 метаболита, общих для гиппокампа и сыворотки (рис. 1А), которые связаны с метаболизмом аминокислот, циклом трикарбоновых кислот, метаболизмом пирувата и азота. Следует отметить, что изменения уровня большинства метаболитов в гиппокампе и сыворотке крови в динамике развития признаков БА оказались реципрокными, что, скорее всего, обусловлено изменениями состояния гематоэнцефалического барьера на фоне развития нейродегенеративных процессов.

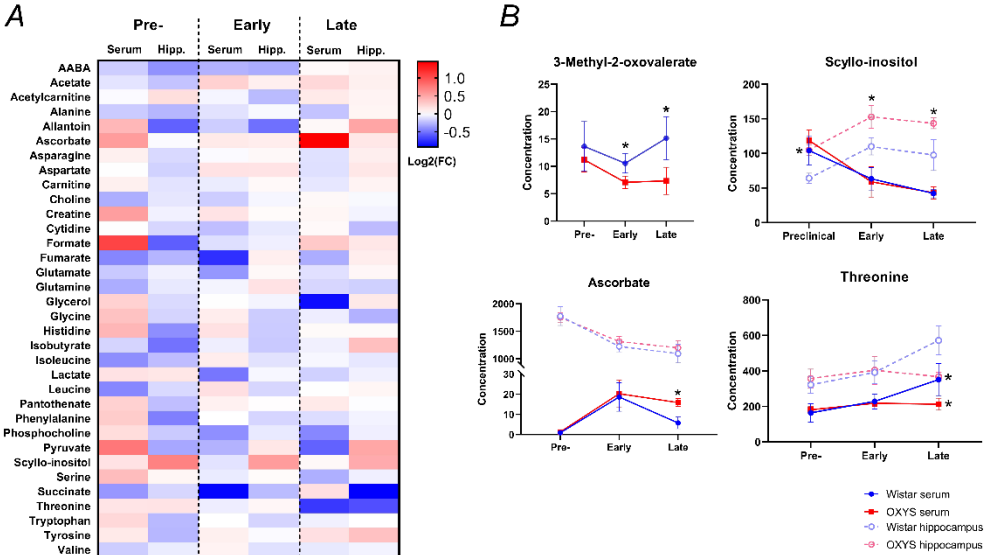


Рис. 1. А. Тепловая карта кратности изменения уровня общих для сыворотки и гиппокампа метаболитов между крысами Wistar и OXYS разного возраста ($\log_2(\text{FC})$ (Fold Change); В. Уровень 3-метил-2-оксовалериановой кислоты в сыворотке, сцилло-инозитола, аскорбата и треонина в сыворотке и гиппокампе крыс на доклинической (возраст 20 дней), стадии манифестации (3–4 мес.) и активной прогрессии заболевания (16–18 мес.) Данные представлены как среднее $\pm$ SD. * – достоверные различия между линиями

Согласно данным ЯМР-спектроскопии, на доклинической стадии заболевания (в возрасте 20 дней) в сыворотке крови крыс OXYS по сравнению с крысами Wistar достоверно изменялся уровень 9 метаболитов: аллантина, креатина, глицина, гистидина, лизина и серина – повышался, а глутамина, изолейцина и лейцина – снижался. При этом в гиппокампе крыс в возрасте 20 дней уровни аллантина и гистидина у крыс OXYS были достоверно ниже, чем у крыс Wistar, в то время как уровни других 6 общих метаболитов (лейцина, изолейцина, глутамина, креатина, глицина и серина) не изменялись. В период манифестации признаков БА (3–4 мес.) в сыворотке крыс OXYS были снижены уровни цитрата и 3-метил-2-оксвалериановой кислоты (одного из промежуточных метаболитов синтеза аминокислот с расщепленной цепью), ЯМР-сигналы которых не были обнаружены в образцах гиппокампа животных. Важно отметить, что в период выраженных нейродегенеративных изменений (18 мес.) уровень 3-метил-2-оксвалериановой кислоты в сыворотке крыс OXYS также был ниже, чем у крыс Wistar, что позволяет рассматривать этот метаболит как потенциальный биомаркер ранней и поздних стадий БА. Кроме того, в возрасте 18 месяцев в сыворотке крыс OXYS наблюдается повышение уровня аскорбата и снижение 2-кетоишвалерата, глицерола, кетолейцина, метионина и треонина. В гиппокампе 18-месячных крыс OXYS уровень треонина был, как и в сыворотке, достоверно ниже, чем у крыс Wistar, а уровни аскорбата и глицерола не различались (рис. 1В). *Выводы:* Развитию признаков БА у крыс OXYS предшествует и сопутствует повышение уровня сцилло-инозитола и снижение – гипотаурина в гиппокампе. Сравнение метаболического профиля гиппокампа и сыворотки крыс выявило наличие 34 общих метаболитов, при этом направленность изменений с возрастом большинства из них была реципрокной в крови и мозге животных. На ранней и поздней стадиях развития БА-подобной патологии в сыворотке крови крыс OXYS снижен уровень 3-метил-2-оксвалериановой кислоты, что позволяет рассматривать этот метаболит как потенциальный доступный биомаркер заболевания.

Финансирование: Исследование поддержано проектом государственного бюджета № FWNR-2022-0016.

Quantitative metabolomic profile of blood serum and brain of OXYS rats – a model of Alzheimer's disease

Snytnikova O.A.^{1*}, Smolentsev A.A.¹, Telegina D.V.², Tsentalovich Yu.P.¹, Kolosova N.G.²

¹ International Tomography Center, SB RAS, Novosibirsk, Russia

² Institute of Cytology and Genetics, SB RAS, Novosibirsk, Russia

* snytnikova_olga@tomo.nsc.ru

Key words: Alzheimer's disease; OXYS rats; hippocampus; serum; NMR

Motivation and Aim: The metabolomic approach is widely used in studying the pathogenesis of various diseases, since it allows one to accurately assess the nature of metabolic changes during their development and identify potential biomarkers. An important objects in such researches are animals – experimental models of human

diseases, which provide knowledge necessary for the development of methods for their diagnosis, prevention and treatment. Age is a major risk factor for Alzheimer's disease (AD), which becomes the leading cause of senile dementia. There are no effective methods for the prevention and treatment of AD, which is due to incomplete knowledge of the pathogenesis of the disease. Study of early stages of AD are difficult because AD develops asymptotically for decades, and due to a lack of models for the most common (>95 %) sporadic form. The present study was performed on prematurely aging OXYS rats, a unique model of sporadic AD, in which all the key pathogenetic and “clinical” signs of the disease spontaneously develop. Their sequence (mitochondrial dysfunction, hyperphosphorylation of tau protein, impaired long-term post-tetanic potentiation, synaptic failure, destructive neuronal changes, behavioral disorders and cognitive decline in the early stages and their progression against the background of increased APP levels, increased accumulation of A β and the formation of amyloid plaques in the brain) corresponds to modern ideas about the pathogenesis of the sporadic form of AD in humans [1]. The purpose of the work is to compare the metabolome of the hippocampus and the serum of OXYS rats at different stages of development of signs of AD to identify the most promising biomarkers from a prognostic point of view – low molecular weight metabolites that reflect disturbances in metabolic cycles. OXYS rats were studied in the “preclinical” period preceding the development of signs of AD (at the age of 20 days), during their manifestation (3-4 months) and active progression (16-18 months). Age-matched Wistar rats were used as controls.

Methods and Algorithms: A quantitative analysis of metabolites in the brain and blood of rats was carried out using the method of metabolomic profiling using an analytical platform based on NMR spectroscopy. The obtained data were analyzed using chemometric and statistical analysis methods.

Results: For brain (hippocampus 59 compounds, cortex 44 compounds) and blood serum (55 compounds) metabolites, ranges of variation and mean concentrations were established. Analysis of the data obtained made it possible to identify the main metabolic patterns during aging, involved in the pathways of energy metabolism and metabolic changes in neurotransmitters. Analysis of the data obtained for brain metabolites revealed the main patterns of changes in the metabolome during aging, primarily associated with energy metabolism and neurotransmitters. It has been established that the development, manifestation and progression of signs of AD in OXYS rats occurs against the background of increased, compared to Wistar rats, levels of scyllo-inositol and decreased levels of hypotaurine in the hippocampus, which changed in animals of all age groups studied [2]. The findings suggest that elevated levels of scyllo-inositol in the brain may serve as a predictor and potential biomarker for the development of signs of AD in OXYS rats and, possibly, AD development in humans. However, in the blood serum, the level of scyllo-inositol significantly decreased with age and did not differ between Wistar and OXYS rats, and the level of hypotaurine was below the detection level, which does not allow the use of these compounds as available biomarkers of the early stages of AD. In addition to scyllo-inositol, 33 other metabolites were found to be common to the hippocampus and serum (Fig. 1A), which are associated with amino acid metabolism, the tricarboxylic acid cycle, pyruvate and nitrogen metabolism. It should be noted that changes in the level of most metabolites in the hippocampus and serum in the dynamics of the development of AD signs turned out to be reciprocal, which is most likely due to changes in the state of the blood-brain barrier against the background of the development of neurodegenerative processes.

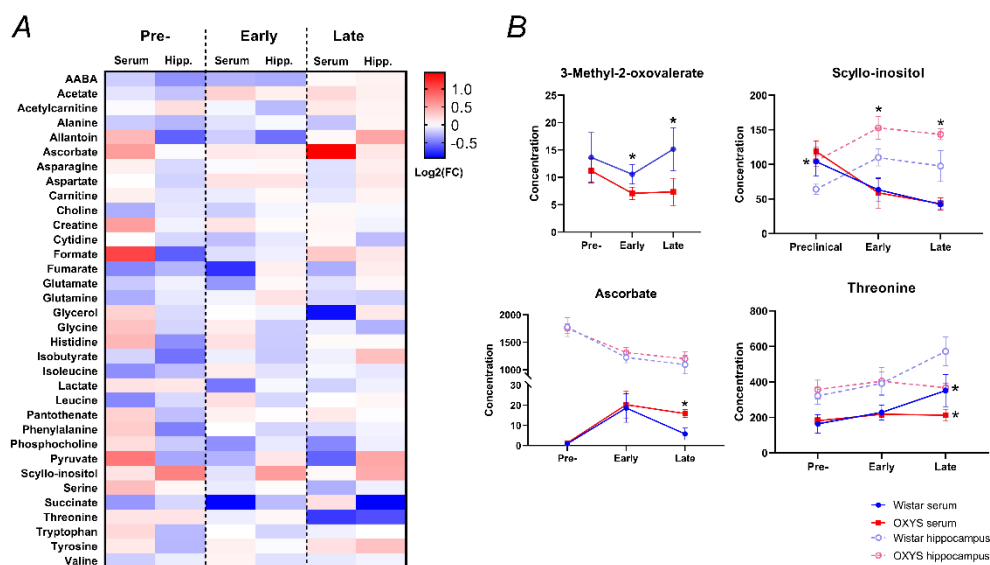


Fig. 1. A. Heat map of log₂(FC) fold change in serum and hippocampal common metabolites between Wistar and OXYS rats of different ages; B) Levels of 3-methyl-2-oxovaleric acid in serum, scyllo-inositol, ascorbate and threonine in the serum and hippocampus of rats at the preclinical (age 20 days), stage of manifestation (3-4 months) and active progression of the disease (18 months). Data are presented as mean±SD. * – significant differences between lines

According to NMR spectroscopy data, at the preclinical stage of the disease (at the age of 20 days) in the serum of OXYS rats compared to Wistar rats, the level of 9 metabolites significantly changed: allantoin, creatine, glycine, histidine, lysine and serine increased, while glutamine, isoleucine and leucine decreased. In the hippocampus of rats at the age of 20 days, the levels of allantoin and histidine in OXYS rats were significantly lower than in Wistar rats, while the levels of other 6 common metabolites (leucine, isoleucine, glutamine, creatine, glycine and serine) have not changed. During the period of manifestation of signs of AD (3-4 months), the levels of citrate and 3-methyl-2-oxovaleric acid (one of the intermediate metabolites of the synthesis of branch-chain amino acids) were reduced in the serum of OXYS rats; these metabolites were not detected in the hippocampus of animals. It is important to note that during the period of pronounced neurodegenerative changes (18 months), the level of 3-methyl-2-oxovaleric acid in the serum of OXYS rats was also lower than in Wistar rats, which allows us to consider this metabolite as a potential biomarker of the early and late stages of AD. In addition, at 18 months of age, an increase in serum levels of ascorbate and a decrease in 2-ketoisovalerate, glycerol, ketoleucine, methionine, and threonine were observed in the serum of OXYS rats. In the hippocampus of 18-month-old OXYS rats, the level of threonine was, as in the serum, significantly lower than in Wistar rats, and the levels of ascorbate and glycerol did not differ (Fig. 1B).

Conclusion: The development of signs of AD in OXYS rats is preceded and accompanied by an increase in the level of scyllo-inositol and a decrease in hypotaurine in the hippocampus. Comparison of the metabolic profile of the hippocampus and rat serum revealed the presence of 34 common metabolites, and the direction of changes

with age of most of them was reciprocal in the blood and brain of the animals. At the early and late stages of development of AD-like pathology, the level of 3-methyl-2-oxovaleric acid in the blood serum of OXYS rats is reduced, which allows us to consider this metabolite as a potential available biomarker of the disease.

Funding: The study is supported by State Budget Project No. FWNR-2022-0016.

Список литературы/References

1. Kolosova N.G., Kozhevnikova O.S., Muraleva N.A., Rudnitskaya E.A., Rumyantseva Y.V., Stefanova N.A., Telegina D.V., Tyumentsev M.A., Fursova A.Z. SkQ1 as a tool for controlling accelerated senescence program: Experiments with OXYS rats. *Biochemistry (Moscow)*. 2022;87(12):1552-1562. doi 10.1134/S0006297922120124
2. Snytnikova O., Telegina D., Savina E., Tsentalovich Y., Kolosova N. Quantitative metabolomic analysis of the rat hippocampus: effects of age and of the development of Alzheimer's disease-like pathology. *J Alzheimer's Disease*. 2024;99(S2):S327-S344. doi 10.3233/JAD-230706