

УДК 612.822.56

Модель деградации дофаминергических аксонов nigrostriатной системы мышей для тестирования нейропротекторов

А. А. Колачева*, М. В. Угрюмов

Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, Москва, 119334 Россия

*E-mail: annakolacheva@gmail.com

Поступила в редакцию 20.04.2021

Принята к печати 14.07.2021

DOI: 10.32607/actanaturae.11433

РЕФЕРАТ Гибель дофаминергических нейронов nigrostriатной системы при болезни Паркинсона начинается с терминалей аксонов, ретроградно распространяясь к телам нейронов. Изучение динамики деградации терминалей аксонов позволит не только найти новые мишени для нейропротекторной терапии, но также может быть инструментом для тестирования потенциальных лекарственных средств. Нами показано, что скорость деградации терминалей дофаминергических аксонов в стриатуме не постоянна, а наиболее чувствительным к действию 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридина (МФТП) параметром является концентрация дофамина в стриатуме. Эта модель валидирована с помощью нейропротекторов с известными механизмами действия: ингибитора мембранного переносчика дофамина – номифензина, и пептида СЕМАКС, который может стимулировать секрецию эндогенных нейротрофических факторов или действовать как антиоксидант. Показано, что введение номифензина почти полностью защищает дофаминергические волокна и сохраняет концентрацию дофамина в стриатуме на контрольном уровне. При этом небольшое, но достоверное увеличение концентрации дофамина обнаружено при использовании СЕМАКС в качестве индуктора секреции эндогенных нейротрофических факторов, но не в качестве антиоксиданта.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА болезнь Паркинсона, терминали аксонов, модели, тест-система, нейропротекторы.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ БП – болезнь Паркинсона; ВМАТ2 – везикулярный транспортер моноаминов типа 2; ДА – дофамин; ДАергический нейрон – дофаминергический нейрон; ДАТ – мембранный транспортер дофамина; ВЭЖХ с ЭД – высокоэффективная жидкостная хроматография с электрохимической детекцией; ИГХ – иммуногистохимия; МФП+ – 1-метил-4-фенилпиридин; МФТП – 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридин; ТГ – тирозингидроксилаза.

ВВЕДЕНИЕ

Изучение молекулярных механизмов нейродегенерации и нейропластичности является ключом к пониманию механизмов нормального старения, которое сопровождается постоянной относительно медленной гибелью нейронов (4.5% за 10 лет), и патогенеза врожденных и хронических заболеваний нервной системы, в основе которых лежит ускоренная гибель нейронов [1]. Одно из наиболее распространенных нейродегенеративных заболеваний – болезнь Паркинсона (БП), характеризуется нарушением двигательной функции в результате гибели дофаминергических (ДАергических) нейронов nigrostriатной системы. В настоящее время при БП применяется только симптоматическое лечение агонистами дофамина (ДА), которое не останавливает гибель нейронов, что приводит к быстрой инвалидизации пациентов. Попытки дополнительно использовать нейропротекторную терапию пока не привели

к успеху. Действительно, лекарственные средства с нейропротекторными свойствами, показавшие высокую эффективность на животных при моделировании паркинсонизма, не прошли клинических испытаний [2, 3]. Это связывают с критическим снижением числа ДАергических нейронов к моменту начала лечения [4]. С другой стороны, первоначальное тестирование нейропротекторов на моделях БП проводится без учета динамики дегенерации нейронов, когда тестируемый препарат вводится либо до индуцированной гибели ДАергических нейронов, либо после, стимулируя компенсаторные резервы мозга.

Ранее с помощью 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридина (МФТП) мы разработали модель ранней клинической стадии БП у мышей, на которой исследовали период завершения гибели ДАергических нейронов и период развития компенсаторных процессов. Однако начальный период развития нейродегенерации не был затронут. Поэтому

целью данного исследования стала разработка модели деградации терминалей ДАергических нейронов в стриатуме с последующим тестированием потенциальных нейропротекторов. Комплексное исследование морфофункциональных параметров терминалей аксонов в начальный период времени после введения МФТП позволило определить параметры, наиболее чувствительные к действию нейротоксина.

На следующем этапе на разработанной нами тест-системе предполагалось протестировать два известных нейропротектора с разными механизмами действия: номифензин, ингибитор мембранного транспортера ДА, с помощью которого в ДАергические нейроны проникают специфичные для них токсины (например, МФП+, 6-ГДА), вызывая окислительный стресс и последующую гибель; и СЕМАКС, фрагмент адренокортикотропного гормона, пептид Met-Glu-His-Phe-Pro-Gly-Pro, который может действовать в качестве индуктора синтеза эндогенных нейротрофических факторов или антиоксиданта в зависимости от схемы его введения [5, 6].

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали самцов мышей линии С57BL/6 (2–2.5 месяца). Мышей содержали в стандартных условиях вивария (свободный доступ к пище и воде, смена день/ночь каждые 12 ч). Манипуляции с животными проводили согласно протоколу, утвержденному комиссией по биоэтике Института биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН и соответствующему национальным и международным требованиям.

Оценку морфофункционального состояния терминалей ДАергических аксонов в начальный период их деградации в стриатуме проводили через 2 ч после двух инъекций МФТП (Sigma Aldrich, США) в разовой дозе 12 мг/кг с интервалом 2 ч. Контрольным животным вводили 0.9% NaCl по аналогичной схеме (рис. 1А). Методом иммуногистохимии (ИГХ) на срезах стриатума выявляли тирозингидроксилазу (ТГ) ($n = 3-4$) с последующим подсчетом терминалей аксонов в четырех областях дорсального стриатума как описано ранее [7]. Также в стриатуме определяли концентрацию ДА методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с электрохимической детекцией (ВЭЖХ с ЭД) ($n = 5-7$) (рис. 1А).

Номифензин, (RS)-2-метил-4-фенил-1,2,3,4-тетрагидроизохинолин-8-амин, вводили подкожно в разовой дозе 10 мг/кг (Sigma, США) за 30 мин до каждой из четырех подкожных инъекций МФТП в дозе 12 мг/кг с интервалом 2 ч ($n = 8-9$) (рис. 1Б). Пептид Met-Glu-His-Phe-Pro-Gly-Pro (СЕМАКС) вводили интраназально в дозе 50 мкг/кг по двум схемам (препарат предоставлен НИЦ «Курчатовский

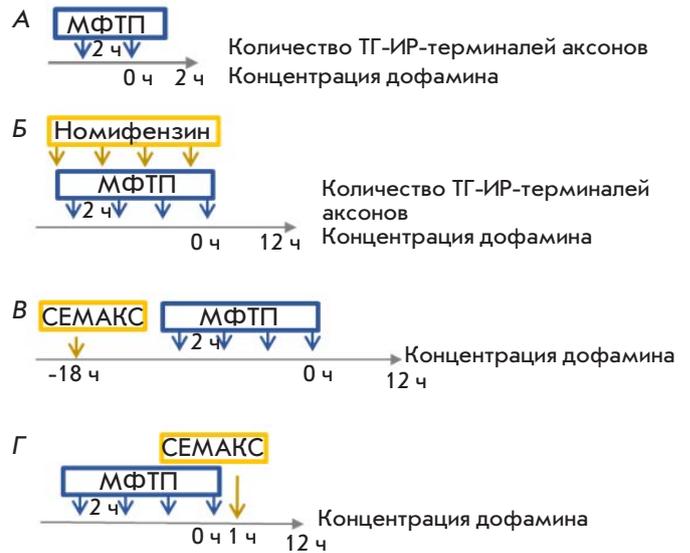


Рис. 1. Схема экспериментов. А – через 2 ч после двух инъекций МФТП (s.c. 12 мг/кг, интервал между инъекциями 2 ч) определено количество ТГ-иммунореактивных терминалей аксонов, выявленных иммуногистохимически на срезах стриатума, и концентрация ДА в стриатуме с помощью ВЭЖХ с ЭД. Б – номифензин (s.c. 10 мг/кг) вводили за 30 мин до каждой из четырех инъекций МФТП (s.c. 12 мг/кг, интервал между инъекциями 2 ч). Через 12 ч после последней инъекции МФТП определяли концентрацию ДА в стриатуме методом ВЭЖХ с ЭД и количество ТГ-иммунореактивных терминалей аксонов, выявленных иммуногистохимически на срезах стриатума. СЕМАКС (i.p. 50 мкг/кг) вводили однократно либо за 12 ч до первой инъекции МФТП (В), либо через 1 ч после последней инъекции МФТП (Г). Через 12 ч после последней инъекции МФТП определяли концентрацию ДА в стриатуме методом ВЭЖХ с ЭД

институт» – ИМГ). Синтез эндогенных нейротрофических факторов индуцировали, вводя СЕМАКС за 12 ч до первой из четырех инъекций МФТП в дозе 12 мг/кг с интервалом 2 ч (рис. 1В), а для использования в качестве антиоксиданта СЕМАКС вводили через 1 ч после последней из четырех инъекций МФТП в дозе 12 мг/кг с интервалом 2 ч (рис. 1Г) ($n = 5-10$). Сбор материала (стриатум) для всех нейропротекторов осуществляли через 12 ч после последней инъекции МФТП и определяли концентрацию ДА в ткани с помощью ВЭЖХ с ЭД. Также в эксперименте с номифензином проводили количественную оценку терминалей ТГ-иммунореактивных аксонов в стриатуме. Подробные описания методик иммуногистохимического выявления ТГ, подсчета терминалей аксонов и определения концентрации ДА в стриатуме представлены ранее [7].

Статистическую значимость полученных данных определяли с использованием параметриче-

ского *t*-критерия Стьюдента и непараметрического *U*-критерия Манна–Уитни. Различия считали статистически значимыми при $p < 0.05$, $p < 0.1$ рассматривали как тенденцию к изменению. Данные представлены как среднее \pm стандартная ошибка среднего в процентах от контроля, принятого за 100%.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Дегенерация ДАергических нейронов nigростриатной системы при БП начинается с терминалей аксонов (варикозов) в стриатуме, ретроградно распространяясь к телам нейронов [4]. При этом стоит отметить немногочисленность работ, посвященных изучению периода деградации nigростриатной системы на уровне стриатума на ранних сроках после введения МФТП. Почти во всех этих работах с помощью полуколичественного иммуногистохимического анализа ТГ на срезах стриатума определяли только оптическую плотность на единицу ткани [8, 9], что интерпретировали как степень деградации аксонов. Однако это не вполне корректно, так как содержание ТГ в аксонах при БП и на моделях заболевания изменяется [10].

Ранее мы показали, что деградация терминалей ДАергических аксонов в стриатуме прекращается через 6 ч после четырех инъекций МФТП, после чего начинают развиваться компенсаторные процессы (например, увеличение активности ТГ) [7]. Количество терминалей аксонов через 3 и 6 ч соответственно составляло 67 и 55% от контроля [7]. В этот период скорость деградации терминалей аксонов в течение первого часа составляла 4%. Однако это свидетельствует о том, что количество терминалей на момент первой инъекции МФТП должно было составлять около 120%. Поэтому для уточнения скорости деградации nigростриатной системы в начальный период нейродегенерации nigростриатной системы мы взяли точку 2 ч после двух инъекций МФТП и показали, что количество варикозов составляло 72% от контроля (рис. 2А–В). Сопоставляя эти данные, можно заключить, что скорость гибели терминалей аксонов не линейна: в первые 4 ч после первой инъекции МФТП она составляла около 7%/ч, а в последующие 5 ч – 1%/ч.

Нелинейная скорость деградации терминалей аксонов может быть связана с метаболизмом МФТП+ (токсин, образуется из МФТП в клетках глии), который захватывается в ДАергические нейроны с помощью ДАТ, индуцируя окислительный стресс. Попадая внутрь нейрона МФТП+ также может конкурентно с ДА захватываться в везикулы с помощью везикулярного транспортера моноаминов типа 2 (ВМАТ2), что является механизмом, защищающим нейроны от гибели.

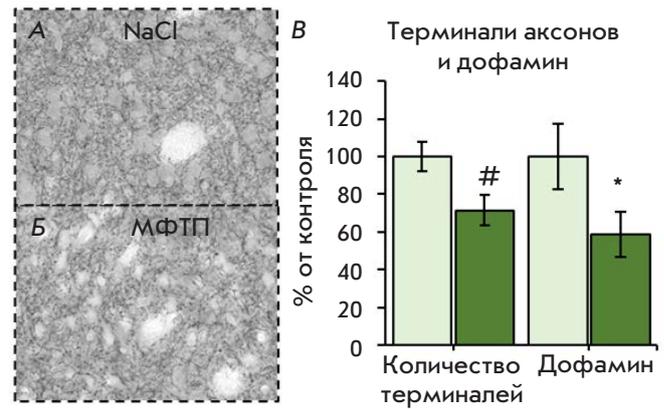


Рис. 2. ТГ-иммунореактивные терминали аксонов (А, Б) через 2 ч после двукратного введения МФТП в разовой дозе 12 мг/кг с интервалом 2 ч (Б), а также их количество и концентрация ДА (В) в стриатуме. * $p < 0.05$, # $p < 0.1$

Высокая скорость деградации терминалей аксонов вплоть до 2 ч после второй инъекции МФТП, вероятно, связана с запуском окислительного стресса МФТП+ и невозможностью его «обезвредить» за счет накопления в везикулах, которые заполнены ДА. Постепенно происходит выделение и деградация нейротрансмиттера и к 2 ч после двух инъекций МФТП концентрация ДА в стриатуме составляла 59% (рис. 2В). На следующем этапе скорость деградации терминалей аксонов резко замедляется в результате установления баланса между захватом МФТП+ в везикулы и продолжающимся выделением ДА с его деградацией.

Таким образом, при использовании модели деградации терминалей ДАергических аксонов для тестирования потенциальных нейропротекторов в первую очередь следует ориентироваться на концентрацию ДА в стриатуме как показатель, наиболее чувствительный к действию МФТП. Однако, учитывая нелинейную скорость деградации терминалей ДАергических аксонов, фактический период действия нейропротектора ограничивается 6 ч после индукции нейродегенерации nigростриатной системы.

На следующем этапе оценили возможность использования динамики дегенерации терминалей аксонов в качестве тест-системы лекарственных веществ с нейропротекторными свойствами. С этой целью использовали два нейропротектора, которые обладают «прямым» (селективным) и «непрямым» действием. Под прямым действием подразумевается ингибирование захвата нейротоксина через ДАТ. Ведь помимо МФТП существуют и другие нейротоксины, которые могут селективно проникать в ДАергические нейроны и вызывать окислительный стресс, например, салсолинол, который образуется из ДА и может захватываться с помощью ДАТ [11].

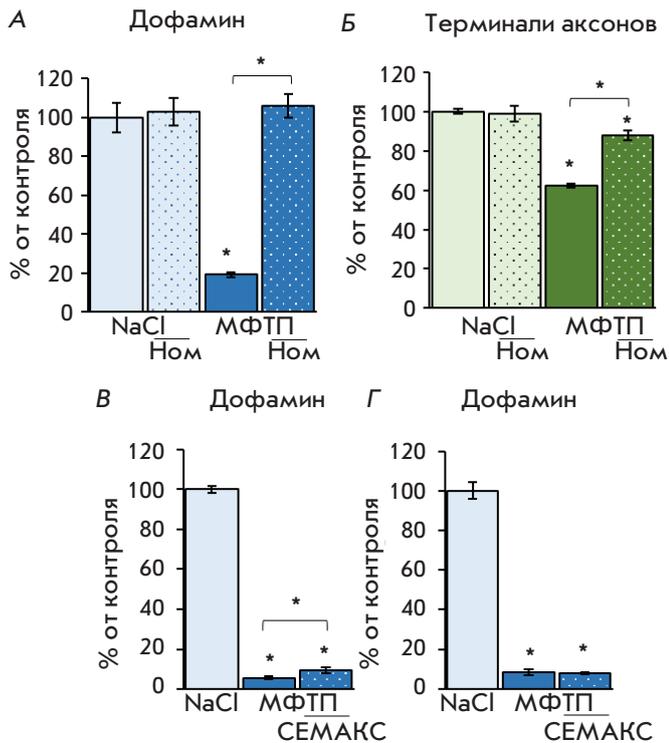


Рис. 3. Концентрация ДА (А) и количество ТГ-иммунореактивных терминалей аксонов (Б) в стриатуме через 12 ч после четырехкратного введения МФТП (12 мг/кг), а также при введении 10 мг/кг номифензина (Ном) за 30 мин до каждой инъекции МФТП. Концентрация ДА в стриатуме через 12 ч после четырехкратного введения МФТП (12 мг/кг), а также при введении 50 мкг/кг СЕМАКС за 12 ч до первой инъекции МФТП (В) или через 1 ч после последней инъекции МФТП (Г). * $p < 0.05$

Показано, что введение номифензина обеспечивало поддержание концентрации ДА на уровне контроля в стриатуме на фоне введения МФТП и в значительной степени защищало терминали аксонов (рис. 3А, Б). Более того, учитывая, что проникновение

МФТП+ происходит через ДАТ, его ингибирование с помощью номифензина также является «эталонным» действия потенциальных нейропротекторов.

СЕМАКС может стимулировать выработку эндогенных нейротрофических факторов, а также выступать в роли антиоксиданта [5, 6]. Чтобы разделить эти два эффекта, использовали две схемы эксперимента. В первом случае СЕМАКС вводили за 12 ч до МФТП для увеличения экспрессии эндогенных нейротрофических факторов или через 1 ч после последней инъекции МФТП. Увеличение ДА наблюдали только в группе, получившей СЕМАКС за 12 ч (рис. 3В, Г). Также в этой группе обнаружено значимое снижение оборота ДА (ДОФУК/ДА) по сравнению с группой, получавшей только МФТП (данные не приведены). Учитывая, что СЕМАКС не влияет на уровень ДА в стриатуме [12], полученные данные свидетельствуют о нейропротекторном действии СЕМАКС на ДАергические нейроны, однако, для увеличения этого эффекта необходимо изменить схему эксперимента, например, использовать многократные инъекции препарата.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, можно заключить, что наиболее чувствительным показателем эффективности действия нейропротекторов является концентрация ДА в стриатуме, отражающая биохимические изменения. При обнаружении положительного влияния на уровень нейротрансмиттера следует ориентироваться на органические изменения в стриатуме путем подсчета терминалей ДАергических аксонов. Показана также возможность использования динамики дегенерации терминалей ДАергических нейронов в качестве тест-системы для оценки эффективности нейропротекторов. ●

*Работа поддержана грантом
РНФ № 20-75-00110.*

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Fearnley J.M., Lees A.J. // Brain. 1991. V. 114. P. 2283–2301.
- DATATOP: a multicenter controlled clinical trial in early Parkinson's disease. Parkinson Study Group // Arch. Neurol. 1989. V. 46. № 10. P. 1052–1060.
- Schirinzi T., Martella G., Imbriani P., Di Lazzaro G., Franco D., Colona V.L., Alwardat M., Sinibaldi Salimei P., Mercuri N.B., Pierantozzi M., et al. // Front. Neurol. 2019. V. 10. P. 148.
- Kordower J.H., Olanow C.W., Dodiya H.B., Chu Y., Beach T.G., Adler C.H., Halliday G.M., Bartus R.T. // Brain. 2013. V. 136. P. 2419–2431.
- Дологов О.В., Середина Т.С., Левицкая Н.Г., Каменский А.А., Андреева Л.А., Алфеева Л.Ю., Нагаев И.Ю., Золотарев Ю.А., Гривенников И.А., Энгеле Ю., и др. // Докл. Академии наук. 2003. Т. 391. № 1. С. 131–134.
- Levitskaya N.G., Sebentsova E.A., Andreeva L.A., Alfeeva L.Y., Kamenskii A.A., Myasoedov N.F. // Neurosci. Behav. Physiol. 2004. V. 34. № 4. P. 399–405.
- Колачева А.А., Козина Е.А., Волина Е.В., Угрюмов М.В. // Нейрохимия. 2014. Т. 31. № 3. С. 225–235.
- Kurosaki R., Muramatsu Y., Kato H., Araki T. // Pharmacol. Biochem. Behav. 2004. V. 78. № 1. P. 143–153.
- Jakowec M.W., Nixon K., Hogg E., McNeill T., Petzinger G.M. // J. Neurosci. Res. 2004. V. 76. № 4. P. 539–550.
- Kozina E.A., Khakimova G.R., Khaindrava V.G., Kucheryanu V.G., Vorobyeva N.E., Krasnov A.N., Georgieva S.G., Kerkerian-Le Goff L., Ugumov M.V. // J. Neurol. Sci. 2014. V. 340. № 1–2. P. 198–207.
- Matsubara K., Senda T., Uezono T., Fukushima S., Ohta S., Igarashi K., Naoi M., Yamashita Y., Ohtaki K., Hayase N., et al. // Eur. J. Pharmacol. 1998. V. 348. № 1. P. 77–84.
- Еремин К.О., Кудрин В.С., Гривенников И.А., Мясоедов Н.Ф., Раевский К.С. // Докл. Академии наук. 2004. Т. 394. № 1. С. 130–132.