

УДК 577.175.82,577.29

БЕЛКИ ВЕЗИКУЛЯРНОГО ЦИКЛА КАК ПОКАЗАТЕЛЬ НЕЙРОПЛАСТИЧНОСТИ ДОФАМИНЕРГИЧЕСКИХ НЕЙРОНОВ В ЧЁРНОЙ СУБСТАНЦИИ МОЗГА

Э. Р. Мингазов¹, Е. Н. Павлова^{1,*}, С. А. Сурков¹,
академик РАН М. В. Угрюмов^{1,2}

Поступило 17.09.2019 г.

Нигростриатные дофаминергические нейроны (ДН), участвующие в регуляции двигательной функции, обладают высокой пластичностью. При гибели до 50% этих нейронов при болезни Паркинсона выжившие нейроны обеспечивают нормальную регуляцию двигательной функции. В данной работе была поставлена задача определить, вовлечены ли белки везикулярного цикла — синтаксин Ia (Syn Ia), синапсина I (Syn I), Rab5a и комплексина I и II (Cplx I и II) — в механизмы нейропластичности в чёрной субстанции, содержащей преимущественно тела и отростки ДН. На нейротоксических моделях болезни Паркинсона у мышей показано, что при дегенерации до 50% ДН содержание Syn I, Syn Ia, Cplx I и II, участвующих в экзоцитозе везикул, в чёрной субстанции в целом не изменяется, а в отдельных выживших ДН компенсаторно увеличивается. Таким образом, данные, полученные в этой работе, позволяют предположить, что нарушение моторного поведения, возникающее при гибели половины нигростриатных ДН, не является следствием нарушения продукции белков везикулярного цикла в выживших ДН.

Ключевые слова: белки везикулярного цикла, нейродегенерация, нейропластичность, болезнь Паркинсона.

DOI: <https://doi.org/10.31857/S0869-56524895525-529>

Дофаминергические нейроны (ДН) нигростриатной системы мозга играют ключевую роль в регуляции двигательной функции. Тела нейронов располагаются в чёрной субстанции (ЧС), а аксоны проецируются в стриатум [1]. При гибели части ДН, например при болезни Паркинсона (БП), функциональная активность выживших нейронов усиливается, что позволяет длительное время компенсировать функциональную недостаточность нигростриатной дофаминергической системы. Этим объясняется тот факт, что нарушение двигательной функции при БП начинается только после гибели 50–60% ДН [1–3].

При изучении функционирования выживших ДН на фоне дегенерации части нейронов могут быть получены новые фундаментальные знания о клеточных и молекулярных механизмах нейропластичности. В соответствии с методологией трансляционной медицины эти знания будут способствовать разработке превентивной нейропротекторной терапии, направленной на замедление гибели ДН нейронов [3].

Поскольку возможности для исследований мозга у людей крайне ограничены, механизмы нейродегенерации и нейропластичности изучают в основном на моделях [4]. Для оценки компенсаторных механизмов и функциональной недостаточности нигростриатной дофаминергической системы наиболее перспективными являются нейротоксические модели БП. Они воспроизводят как доклиническую (досимптомную) стадию БП, характеризующуюся допороговым уровнем дегенерации нигростриатной дофаминергической системы (потеря <50% нейронов) и отсутствием нарушений моторного поведения, так и клиническую (симптомную) стадию, характеризующуюся сверхпороговой дегенерацией этой системы (потеря >50% нейронов) и появлением моторных нарушений. Такие модели созданы в нашей лаборатории на мышах путём системного введения 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридина (МФТП) — предшественника специфического токсина ДН, который в организме превращается в 1-метил-4-фенилпиперидиний (МФП⁺)-токсин [5].

На разработанных нами моделях БП изучены клеточные и молекулярные механизмы компенсаторного усиления функций ДН и декомпенсации в виде изменения синтеза, выделения, обратного захвата и ферментативной дегенерации дофамина

¹ Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова
Российской Академии наук, Москва

² Национальный исследовательский университет
«Высшая школа экономики», Москва

*E-mail: ekrepak@yandex.ru

[6, 7]. Однако до сих пор остаётся невыясненным, как при этом изменяется содержание белков везикулярного цикла (БВЦ), вовлечённых: в 1) транспорт везикул, содержащих дофамин, из резервного пула к месту экзоцитоза (активная зона), 2) экзоцитоз, 3) эндоцитоз и пополнение резервного пула вновь образованными везикулами, в которые из цитоплазмы закачивается дофамин. Поэтому целью данной работы явилась оценка изменения содержания БВЦ в нигростриатных ДН у мышей на нейротоксических (МФТП) моделях доклинической и клинической стадий БП. В качестве объектов исследования были выбраны наиболее распространённые БВЦ: синтаксин Ia (Syn Ia) — один из компонентов SNARE комплекса — центрального звена экзоцитоза; синаптоагмин I (Syt I) и комплексины I и II (Cmrx I и II) — белки, участвующие в регуляции SNARE комплекса, Rab5a — белок, участвующий в регуляции эндосомального цикла [8–10].

В работе использовали самцов мышей линии C57BL/6N в возрасте 2–2,5 месяца и массой 22–24 г. Животных содержали в стандартных условиях вивария при свободном доступе к пище и воде. Манипуляции с мышами проводили в соответствии с протоколом, утверждённым комитетом по охране животных Института биологии развития РАН и находящимся в соответствии с национальными и международными требованиями. Мышам вводили подкожно МФТП, двукратно по 8 мг/кг и четырёхкратно по 10 мг/кг с интервалом 2 ч между инъекциями для моделирования соответственно доклинической и клинической стадий БП (“Sigma”, США). Контрольной группе по таким же схемам вводили 0,9%-й раствор NaCl. В каждой группе использовано по восемь животных.

Через две недели после введения МФТП мышей декапитировали, извлекали мозг и выделяли ЧС. Ткань взвешивали, замораживали в жидком азоте и хранили при $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ до определения содержания Syn Ia, Syt I, Rab5a, Cmrx I и II с помощью вестерн-блота. Пробоподготовку осуществляли в соответствии с опубликованной ранее методикой [7]. После переноса белков на нитроцеллюлозную мембрану мембраны последовательно инкубировали: а) в TNT буфере, содержащем 1% обезжиренного молока и одни из антител: мыши к Syt I (1 : 1000, “Synaptic Systems GmbH”, Германия), мыши к Syn Ia (1 : 4000, “Sigma”, США), кролика к Cmrx I, II (1 : 1000, “Synaptic Systems GmbH”, Германия), кролика к Rab5a (1 : 300, “Santa Cruz Biotechnology”, США) в течение ночи при $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$; б) с козьими антителами, конъюгированными с пероксидазой хрена, к иммуногло-

булинам мыши или кролика (1 : 50 000, “Jackson ImmunoResearch Lab”, США) в течение 2 ч при комнатной температуре. После инкубации со вторыми антителами мембраны несколько раз промывали в TNT буфере и проявляли стандартным методом усиленной хемилюминесценции с помощью набора Amersham (“ECL Plus Western Blotting Detection Reagents”, США). Мембраны сканировали, и полученные изображения обрабатывали в стандартной программе ImageJ, оценивая интегральное поглощение белковых полос. Результаты определения уровня экспрессии исследованных белков были нормированы на общее содержание белка.

Для статистической обработки данных использовали однофакторный дисперсионный анализ (1-way ANOVA) с последующим использованием теста Тьюки для множественного сравнения средних с помощью программы GraphPad Prism Version 5.0 (“GraphPad Software”, США). Данные представлены как среднее значение \pm средняя ошибка среднего значения. Различия считали достоверными при $p < 0,05$.

В данной работе оценивали изменение содержания БВЦ — синтаксина Ia (Syn Ia), синаптоагмина I (Syt I), комплексинов I и II (Cmrx I и II), Rab5a, в ЧС у мышей на моделях доклинической и ранней клинической стадий БП. Несмотря на то что эти белки являются атрибутом любых нейронов, в которых выделение нейротрансмиттеров происходит экзоцитозом [10] в ЧС, они должны содержаться преимущественно в телах, дендритах и проксимальных отделах аксонов ДН. Из нашей предыдущей работы следует, что, несмотря на гибель 29% ДН у мышей на модели доклинической стадии БП, спонтанное и стимулированное выделение дофамина в ЧС — ключевой показатель дофаминовой нейротрансмиссии — не изменяется по сравнению с контролем [7]. При этом по данным этой работы в ЧС отсутствуют изменения в содержании большинства изученных БВЦ — Syn Ia, Cmrx I и II, ответственных за экзоцитоз секреторных везикул, включая дофаминсодержащие везикулы (рис. 1). При экстраполяции данных по ЧС в целом на отдельные выжившие ДН, число которых было подсчитано в предыдущей работе [5], оказалось, что содержание на нейрон Syn Ia, Cmrx I и II увеличивается. При этом спонтанное выделение дофамина ДА при пересчёте на нейрон не изменяется, а стимулированное возрастает [7]. Из сопоставления данных этого и предыдущего [7] исследований косвенно следует, что функциональное значение Syn Ia, Cmrx I и II особенно велико при экзоцитозе секре-

торных гранул, синхронизированном деполяризацией мембраны (стимулированное выделение).

При оценке везикулярного цикла необходимо учитывать, что экзоцитоз — это только его первая часть, тогда как вторая часть представлена эндоцитозом и формированием новых секреторных везикул, молекулярными маркерами которых могут служить белки Rab5a [9] и VMAT2 [7]. Следует отметить, что изменение содержания Rab5a не является специфической характеристикой секреторной активности нейронов, поскольку этот белок также участвует в эндоцитозе в глии [8]. Тем не менее содержание Rab5a (рис. 1) и VMAT2 [7] в ЧС на модели доклинической стадии БП не изменяется (рис. 1). Эти данные позволяют предположить, что к механизмам нейропластичности выживших ДН на модели доклинической стадии БП относится усиленное образование эндоцитозом секреторных везикул (маркер — Rab5a), в которые с помощью VMAT2 захватывается синтезированный в цитоплазме дофамин.

Особый интерес представляет сравнение содержания БВЦ в ЧС у мышей на модели доклинической

и клинической стадий БП, т.е. по мере деградации nigrostriatной дофаминергической системы вплоть до порога, при котором нарушается моторное поведение [5]. По полученным нами данным в этом и предыдущем [7] исследованиях содержание большинства изученных БВЦ — Smpx I и II, Rab5a и VMAT2 в ЧС у мышей на модели клинической стадии БП остаётся на таком же уровне, как и на модели доклинической стадии и в контроле (рис. 1), несмотря на увеличение числа дегенерировавших ДН с 29 до 45% [5]. При этом в ЧС также не меняется уровень спонтанного и стимулированного выделения дофамина [7]. При экстраполяции данных по ЧС на нейрон очевидна тенденция к увеличению синтеза БВЦ в выживших ДН у мышей на модели клинической стадии не только по сравнению с контролем, но и по сравнению с доклинической стадией. При экстраполяции на нейрон стимулированное выделение ДА не меняется, а спонтанное увеличивается [7]. В совокупности эти данные позволяют предположить, что моторные нарушения у мышей на модели ранней клинической стадии БП и, вероятно, у больных при пороговой деградации

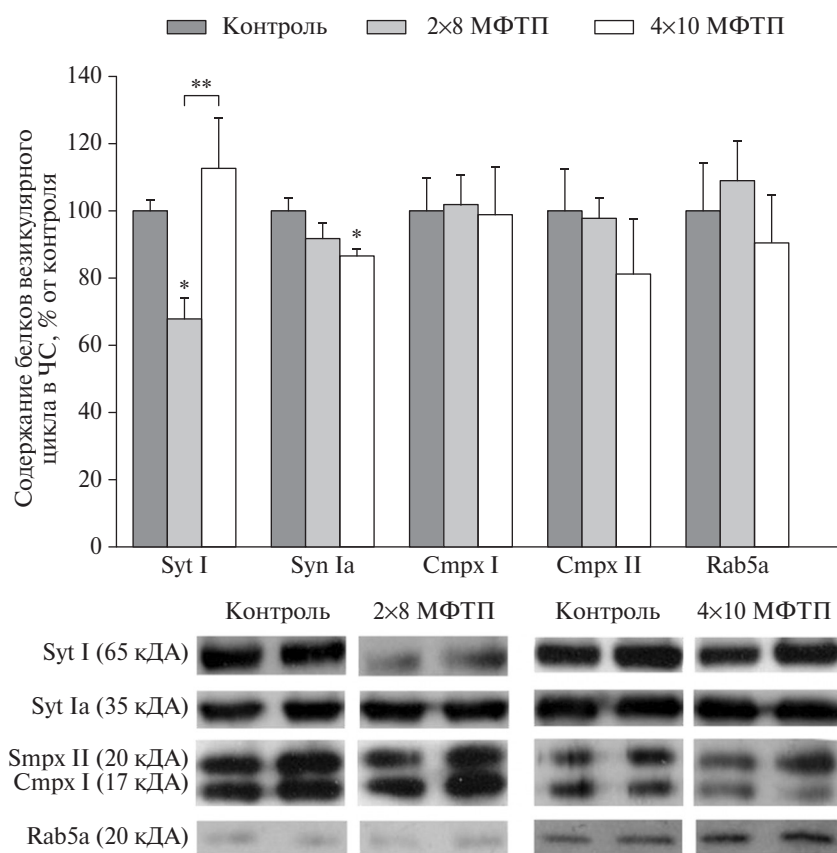


Рис. 1. Содержание белков везикулярного цикла: синаптотагмина (Syt I), синтаксина Ia (Syn Ia), комплексина I и II, Rab5a в чёрной субстанции (ЧС) у мышей на моделях доклинической (2–8 мг/кг) и ранней клинической (4–10 мг/кг) стадий болезни Паркинсона. * $p < 0,05$ по сравнению с контролем, ** $p < 0,05$ по сравнению с выбранным параметром.

нигростриатной дофаминергической системы не являются следствием снижения содержания и, возможно, синтеза БВЦ в ЧС.

Наряду с однонаправленным изменением содержания большинства БВЦ — Syn Ia, Сmрх I и II, Rab5a, VMAT2, в выживших ДН в ЧС у мышей на моделях доклинической и клинической стадий БП, изменение содержания Syt I носит более сложный характер. Так, содержание этого белка снижается на модели доклинической стадии БП по сравнению с контролем и повышается на модели клинической стадии по сравнению с доклинической стадией (рис. 1). Эти данные свидетельствуют о том, что в отличие Syn Ia, Сmрх I и II, Rab5a, VMAT2 содержание Syt I в отдельных выживших нейронах компенсаторно возрастает только при дегенерации значительной части ДН (>29% и <45%).

Для понимания молекулярных механизмов нейропластичности ДН и их регуляции в ЧС важно сопоставление данных о содержании БВЦ в выживших нейронах, полученных в данной работе, и данных о содержании мРНК этих белков, полученных в нашей предыдущей работе [11], у мышей на тех же моделях БП. Эти данные являются показателями уровня соответственно трансляции и транскрипции БВЦ. Однонаправленное изменение транскрипции и трансляции в отдельных нейронах на моделях БП наблюдалось только в случае Syn Ia и Rab5a на модели доклинической стадии и Сmрх I и II на модели клинической стадии (рис. 1) [11]. Эти данные свидетельствуют об одинаковой регуляции экспрессии генов и синтезов указанных белков в выживших нейронах, причём только при определённом уровне дегенерации нигростриатной дофаминергической системы. В случае остальных белков на обеих моделях БП отмечена рассогласованность в транскрипции и трансляции, что свидетельствует об их различной регуляции. Такая рассогласованность характерна и для регуляции транскрипции и трансляции других функционально значимых белков в ДН, например тирозингидроксилазы, — скорость-лимитирующего фермента синтеза дофамина [6].

Таким образом, данные об изменении содержания БВЦ в ЧС у мышей на нейротоксических моделях БП позволяют предположить, что усиление экспрессии ряда БВЦ в выживших ДН (Syn Ia, Сmрх I и II, Syt I) способствует компенсации функциональной недостаточности нигростриатной дофаминергической системы.

Источник финансирования. Работа поддержана грантом РФФИ (17–04–00479) по проекту “Молекулярные механизмы нейропластичности мозга при функциональной недостаточности (дегенерации) дофаминергических нейронов”.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Все процедуры, выполненные в исследованиях с участием животных, соответствовали этическим стандартам учреждения, в котором проводились исследования, и утверждённым правовым актам РФ и международных организаций.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Agid Y. // *Lancet*. 1991. V. 337. № 8753. P. 1321–1324.
2. Bezard E., Gross C.E. // *Prog. Neurobiol.* 1998. V. 55. № 2. P. 93–116.
3. Угрюмов М.В. // *Ж. Неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова*. 2015. Т. 115. № 11. С. 4–14.
4. Gerlach M., Riederer P. // *J. Neural. Transm.* 1996. V. 103. P. 987–1041.
5. Ugrumov M.V., Khaindrava V.G., Kozina E.A. // *Neuroscience*. 2011. V. 181. P. 175–188.
6. Kozina E.A., Khakimova G.R., Khaindrava V.G. // *J. Neurol. Sci.* 2014. V. 340. P. 198–207.
7. Mingazov E.R., Khakimova G.R., Kozina E.A. // *Mol. Neurobiol.* 2018. V. 55. P. 2991–3006.
8. Potokar M., Lacovich V., Chowdhury H.H. // *Glia*. 2012. V. 60. P. 594–604.
9. de Hoop M.J., Huber L.A., Stenmark H. // *Neuron*. 1994. V. 13. № 1. P. 11–22.
10. Südhof T.C. // *Neuron*. 2013. V. 80. № 3. P. 675–690.
11. Мингазов Э.Р., Угрюмов М.В. // *ДАН*. 2016. Т. 468. № 4. С. 459–461.

**PROTEINS OF THE VESICULAR CYCLE AS A MARKER
OF NEUROPLASTICITY OF DOPAMINERGIC NEURONS
IN THE SUBSTANTIA NIGRA OF THE BRAIN**

**E. R. Mingazov¹, E. N. Pavlova¹, S. A. Surkov¹,
Academician of the RAS M. V. Ugrumov^{1,2}**

¹*Institute of Developmental Biology of the Russian Academy of Sciences,
Moscow, Russian Federation*

²*The National Research University Higher School of Economics,
Moscow, Russian Federation*

Received September 17, 2019

Nigrostriatal dopaminergic neurons (DNs) involved in the regulation of motor function, are characterized by high plasticity. Indeed, at the death of up to 50% of DNs in Parkinson's disease, the survived neurons provide normal regulation. This study was aimed to determine whether proteins of the vesicular cycle, syntaxin Ia (Syn Ia), synaptotagmin I (Syt I), Rab5a and complexins I and II (Cmpx I and II), are involved in the mechanisms of neuroplasticity in the substantia nigra, which mainly contains cell bodies and processes of the DN. In neurotoxic models of Parkinson's disease in mice, it was shown that at the degeneration of up to 50% of DN, the content of Syt I, Syn Ia, Cmpx I and II involved in vesicle exocytosis does not change in the substantia nigra as whole, while this is compensatory increased in individual survived DN. Thus, the data obtained in this study suggest that the impairment of motor behavior that occurs at the death of half of nigrostriatal DN is not caused by the impairment of the production of vesicular cycle proteins in surviving DN.

Keywords: proteins of vesicular cycle, neurodegeneration, neuroplasticity, Parkinson's disease.