

ИЗУЧЕНИЕ РАСПРЕДЕЛЕНИЯ α -СУБЪЕДИНИЦ Na/K-АТФазы В СТРУКТУРАХ МОЗГА КРЫС В МОДЕЛИ ПАРКИНСОНОПОДОБНОГО СИНДРОМА И ПОСЛЕ КОРРЕКЦИИ ГОРМОНОМ ТИМУСА

Королев А.Г.¹, Новоселецкая А.В.¹, Киселева Н.М.²

¹ ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»,
Москва, Россия

² ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет
имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Резюме. В работе исследуется изучение распределения α -субъединиц Na/K-АТФазы в структурах мозга крыс, активность которых меняется при паркинсоноподобном синдроме. Целью работы явился анализ изменения количества различных изоформ α -субъединиц Na/K-АТФазы в модели паркинсоноподобного синдрома и его коррекции гормоном тимуса тимулином. Работа выполнена на 42 шестинедельных самцах крыс Wistar. Животные были разделены на 3 группы: 2 опытные и 1 контрольная группа. Для моделирования паркинсоноподобного синдрома интраназально вводили раствор 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридина (МФТП). Через 10 дней после введения МФТП животным одной опытной группы в течение 5 дней внутрибрюшинно вводили гормон тимуса тимулин. Показано, что наибольший уровень тканеспецифичных изоформ α -субъединицы Na/K-АТФазы наблюдался в гипоталамусе, миндалинах и стриатуме, а наименьший — в префронтальной и фронтальной коре головного мозга. Установлено, что в условиях МФТП-индуцированной модели болезни Паркинсона наблюдается статистически достоверное повышение количества $\alpha 1$ -субъединиц Na/K-АТФазы в стриатуме, понижение количества $\alpha 2$ -субъединиц гиппокампе и повышение количества $\alpha 3$ -субъединиц в мозжечке по отношению к контролю. Введение гормона тимуса тимулина корректирует отклонения уровня $\alpha 1$ -, $\alpha 2$ - и $\alpha 3$ -субъединиц, которые наблюдаются на фоне действия нейротоксина.

Ключевые слова: тимус, тимулин, α -субъединица, Na/K-АТФаза, паркинсонизм

Адрес для переписки:

Новоселецкая Анна Владимировна
ФГБОУ ВО «Московский государственный
университет имени М.В. Ломоносова»
119234, Россия, Москва,
Ленинские горы, 1, стр. 12.
Тел.: 8 (495) 939-50-01.
E-mail: anna.novoseletskaia@gmail.com

Address for correspondence:

Novoseletskaia Anna V.
M. Lomonosov Moscow State University
119234, Russian Federation, Moscow, Lenin Hills, 1,
bldg 12.
Phone: 7 (495) 939-50-01.
E-mail: anna.novoseletskaia@gmail.com

Образец цитирования:

А.Г. Королев, А.В. Новоселецкая, Н.М. Киселева
«Изучение распределения α -субъединиц Na/K-
АТФазы в структурах мозга крыс в модели
паркинсоноподобного синдрома и после коррекции
гормоном тимуса» // Российский иммунологический
журнал, 2020. Т. 23, № 1. С. 35-40.
doi: 10.46235/1028-7221-004-SON
© Королев А.Г. и соавт., 2020

For citation:

A.G. Korolev, A.V. Novoseletskaia, N.M. Kiseleva
“Study of Na/K-ATPase α -subunit distribution in rat
cerebral structures within Parkinson-like syndrome model
and after thymus hormone correction”, Russian Journal
of Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskii Zhurnal,
2020, Vol. 23, no. 1, pp. 35-40.
doi: 10.46235/1028-7221-004-SON
DOI: 10.46235/1028-7221-004-SON

STUDY OF Na/K-ATPase α -SUBUNIT DISTRIBUTION IN RAT CEREBRAL STRUCTURES IN PARKINSON-LIKE SYNDROME MODEL AND AFTER THYMUS HORMONE CORRECTION

Korolev A.G.^a, Novoseleetskaya A.V.^a, Kiseleva N.M.^b

^a M. Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation

^b Russian National N. Pirogov Research Medical University, Moscow, Russian Federation

Abstract. Here we examined distribution of Na/K-ATPase α -subunit in rat cerebral structures, which activity changes in Parkinson-like syndrome. The study was aimed at analyzing quantitative change in diverse different isoforms of Na/K-ATPase α -subunit in model of Parkinson-like syndrome as well as after refining it by using thymus hormone thymulin. The study was performed on 42 six-week-old Wistar rats males by dividing animals into 3 groups: 2 experimental and 1 control group. To simulate Parkinson-like syndrome, a solution of 1-methyl 4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) was administered intranasally. 10 days after MPTP inoculation, thymus hormone thymulin was abdominally administered to animals in one experimental group for 5 days. It was demonstrated that level of tissue-specific isoforms of Na/K-ATPase α -subunit was peaked in hypothalamus, amygdaloid body and striatum, the minimal level was observed in medial prefrontal and prefrontal cortex. It was estimated that in MPTP-stimulated model of Parkinson's disease, the level of Na/K-ATPase α 1-subunit was significantly higher in striatum, amount of α 2-subunits was decreased in the hippocampus, whereas the level of α 3-subunit was elevated in the cerebellum compared to control group. Administration of thymus hormone thymulin corrected changes in level of α 1, α 2 and α 3-subunits observed after exposure to neurotoxin.

Keywords: thymus, thymulin, α -subunit, Na/K-ATPase, parkinsonism

Введение

Болезнь Паркинсона — это нейродегенеративное заболевание, которым страдает около 1% населения в возрасте после 55 лет. Было показано, что α 3-субъединица способна взаимодействовать с альфа-синуклеином, однако механизм данного взаимодействия не был установлен. Было показано, что в ходе развития болезни Паркинсона чувствительность к кардиотоксическим стероидам повышается [6]. Ранее одно из соединений класса кардиотонических стероидов — дигоксин, в результате действия которого ингибируется активность Na/K-АТФазы, — использовался в качестве лекарственного средства при лечении болезни Паркинсона [8]. В литературе встречаются противоречивые сведения о действии кардиотонических стероидов: было показано, что в низких концентрациях они вызывали адаптивный ответ и улучшали выживаемость допаминергических нейронов [7], однако Кигур Р.К., Кигур Р.А. создали гипоталамическую, опосредованную дигоксином модель болезни Паркинсона [5].

Таким образом, все вышесказанное позволяет предположить, что при развитии болез-

ни Паркинсона изменяется функционирование Na/K-АТФазы.

Ранее нами было показано, что на фоне введения препарата пептидов тимуса тактика происходит повышение уровня дофамина в стриатуме крыс [1]. Поскольку стриатум связан с экстрапирамидной системой, то такое повышение дофамина, вероятно, имеет отношение к реализации движений животного, что в наших экспериментах отразилось в увеличении исследовательской активности.

Целью настоящей работы явился анализ изменения количества различных изоформ α -субъединицы Na/K-АТФазы в модели паркинсоноподобного синдрома и его коррекции гормоном тимуса.

Материалы и методы

Работа выполнена на 42 шестинедельных самцах крыс Wistar. Животных содержали в стандартных условиях вивария при 12-часовом цикле свет-темнота и свободном доступе к пище и воде. Животные были разделены на 3 группы (по 14 крыс в каждой): опытным группам (1 и 2) вводили по 50 мкл раствора 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридина (МФТП) в каждую ноздрю в концентрации 20 мг/мл для моделирования паркинсонопод-

добного синдрома. Контрольной группе вводили 50 мкл физиологического раствора в каждую ноздрю.

Через 10 дней после введения МФТП животным из опытной группы 2 в течение 5 дней внутрибрюшинно вводили гормон тимуса тимулин в дозе 0,15 мг/кг.

Через 16 дней крыс декапитировали и извлекали некоторые структуры головного мозга: обонятельные луковицы, мозжечок, зрительную кору, вместе префронтальную и фронтальную кору, моторную, премоторную, височную кору, гиппокамп, гипоталамус, стриатум и миндалины. Выделенные структуры взвешивали, замораживали в жидком азоте и впоследствии хранили при -70°C .

Все действия с тканями проводили на холоде. Образцы тканей обрабатывали холодным RIPA-буфером (50 мМ Трис; 150 мМ NaCl; 0,1% SDS; 0,5% дезоксихолат натрия; 1% Тритон X-100; ингибиторы протеаз) из расчета 1 мл буфера на 100 мг ткани. Затем ткань гомогенизировали и инкубировали полученные гомогенаты на холоде в течение 20 минут. После этого образцы центрифугировали 10 минут при 14000 g. Супернатант отбирали и хранили при -70°C .

α -субъединицы в различных отделах мозга крыс детектировали методом Western blot. Для этого проводили электрофорез полученных лизатов в полиакриламидном геле в присутствии SDS по методу Лэммли. К клеточным лизатам добавляли 4-кратный буфер для образцов (0,25 М трис-HCl, 40% сахароза, 8% SDS, 0,004% бромфеноловый синий, 4% β -меркаптоэтанол, pH 6,8) и инкубировали 15 минут при 37°C .

Электрофорез проводили в течение 1 часа при комнатной температуре в камере для вертикального электрофореза BioRad при постоянной силе тока (40 мА на один гель).

Перенос на нитроцеллюлозную мембрану проводили в камере BioRad в течение 1,5 часов при постоянном напряжении 100 В. Мембраны отмывали 3 раза в TBST, инкубировали со вторичными антителами, конъюгированными с пероксидазой хрена, в течение 1 часа, промывали 3 раза в TBST и визуализировали методом усиленной хемилюминесценции. Хемилюминесценцию регистрировали в приборе ChemiDoc XRS+ фирмы BioRad, фиксировали накопление сигнала каждые 2 секунды в течение 2 минут.

Для построения графиков использовали значения уровня люминисценции (в условных единицах) полос α -субъединиц, нормированные на значения уровня люминисценции

полос GAPDH, использовавшейся в качестве контроля нанесения.

Все эксперименты проводили согласно «Принципам надлежащей лабораторной практики» (Good Laboratory Practice, GLP), ГОСТ 33647-2015) и положениям международной конвенции о «Правилах работы с экспериментальными животными» (European Communities Council Directives, November 24, 1986, 86/609/EEC).

Статистическую обработку результатов проводили с использованием непараметрического критерия Вилкоксона в компьютерной программе Statistica 8.0.

Результаты

При анализе распределения изоформ α -субъединицы Na/K-АТФазы в разных отделах мозга крысы в норме (контрольная группа) уровень люминисценции, соответствующий премоторной коре, был принят за единицу (так как премоторная кора не подвержена дегенеративным процессам, возникающим при развитии болезни Паркинсона), все остальные величины рассчитывались относительно нее. Дополнительно нормировали на величину сигнала, полученную при измерении $\alpha 1$ -субъединицы, так как эта субъединица присутствует как в нейронах, так и в глиальных клетках. Результаты анализа распределения изоформ α -субъединицы Na/K-АТФазы в разных отделах мозга представлены на рисунке 1.

Согласно полученным результатам, в гипоталамусе, миндалине и гиппокампе наблюдается повышенное содержание убаин-чувствительной $\alpha 2$ -субъединицы по сравнению с убаин-резистентной $\alpha 1$ -субъединицей (рис. 1А). Это может свидетельствовать о том, что ткани данных отделов обладают повышенной чувствительностью к эндогенному убаину. Префронтальная, фронтальная и височная кора содержит больше $\alpha 1$ и более низкое значение $\alpha 2$, поэтому менее чувствительна к эндогенному убаину. Так как $\alpha 2$ -субъединица обладает большим сродством к K^+ по сравнению с другими субъединицами, можно предположить, что в префронтальной, фронтальной и височной коре внутриклеточное содержание K^+ ниже, чем в гипоталамусе, стриатуме и миндалине.

Также в гипоталамусе, стриатуме и миндалине наблюдается повышенное содержание $\alpha 3$ -субъединицы по сравнению с $\alpha 1$ -субъединицей (рис. 1Б), что может свидетельствовать о том, что клетки данных отделов по сравнению с остальными обладают

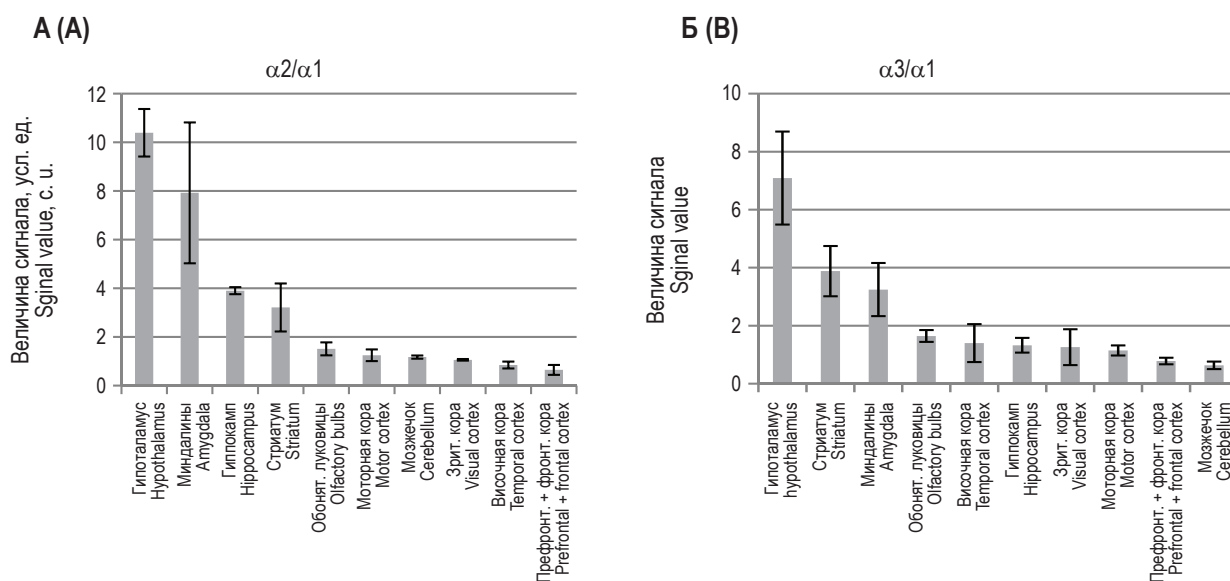


Рисунок 1. Распределение соотношения α -субъединиц в норме в разных отделах мозга крыс

Примечание. А – распределение соотношения $\alpha 2/\alpha 1$ в норме в разных отделах мозга крыс. Б – распределение соотношения $\alpha 3/\alpha 1$ в норме в разных отделах мозга крыс.

По оси Y – величина сигнала относительно таковой в премоторной коре, принятой за единицу.

Figure 1. Distribution of α -subunits ratio under normal conditions in different rat brain regions

Note. A, distribution $\alpha 2/\alpha 1$ ratio under normal conditions in different rat brain regions. B, distribution of $\alpha 3/\alpha 1$ ratio under normal conditions in different rat brain regions.

On the Y-axis signal value relative to that in the premotor cortex, taken as a unit.

другими кинетическими характеристиками и сродством к Na^+ , так как сродство $\alpha 3$ -субъединицы к Na^+ выше, чем у других изоформ. В префронтальной, фронтальной коре и мозжечке содержание $\alpha 1$ больше по сравнению с содержанием $\alpha 3$, что может свидетельствовать о повышенной резистентности данных отделов к эндогенному убаину.

Таким образом, в гипоталамусе, миндалинах и стриатуме содержится наибольшее количество чувствительных к регуляции эндогенным убаином тканеспецифичных α -субъединиц Na/K-АТФазы, а в префронтальной и фронтальной коре – наименьшее.

По результатам анализа распределения изоформ α -субъединицы Na/K-АТФазы в разных отделах мозга при патологии были получены диаграммы, представленные на рисунке 2. Исходя из полученных результатов, можно заключить, что у крыс опытной группы 1 (МФТП) по сравнению с крысами контрольной группы достоверно происходит снижение содержания $\alpha 1$ -субъединицы в префронтальной и фронтальной коре и повышение в стриатуме (рис. 2А). Также у 1-й опытной группы крыс наблюдается снижение содержания $\alpha 2$ -субъединицы в обо-

нятельных луковицах, моторной коре и гиппокампе (рис. 2Б). Уровень $\alpha 3$ -субъединиц увеличивается у крыс опытной группы 1 по сравнению с крысами контрольной группы в обонятельных луковицах, мозжечке, зрительной, префронтальной, фронтальной коре (рис. 2В). Введение тимулина животным после воздействия нейротоксина МФТП привело к коррекции отклонений уровня $\alpha 1$ -, $\alpha 2$ - и $\alpha 3$ -субъединиц, которые были получены на фоне действия нейротоксина (рис. 2).

По итогам наших исследований можно сделать выводы, что в ходе развития болезни Паркинсона в рамках выбранной модели префронтальная и фронтальная кора, а также мозжечок предположительно становятся более чувствительными к эндогенному убаину, а стриатум – менее чувствительным. Введение тимулина на фоне действия нейротоксина приводит к достоверному увеличению уровня $\alpha 1$ -субъединицы в мозжечке и префронтальной и фронтальной коре, а также снижению в стриатуме, что предположительно оказывает влияние на чувствительность к убаину на фоне гормона тимуса. Исходя из того, что $\alpha 2$ -субъединица более чувствительна к ионам калия [4], можно сделать вывод, что в обонятельных луковицах, мотор-

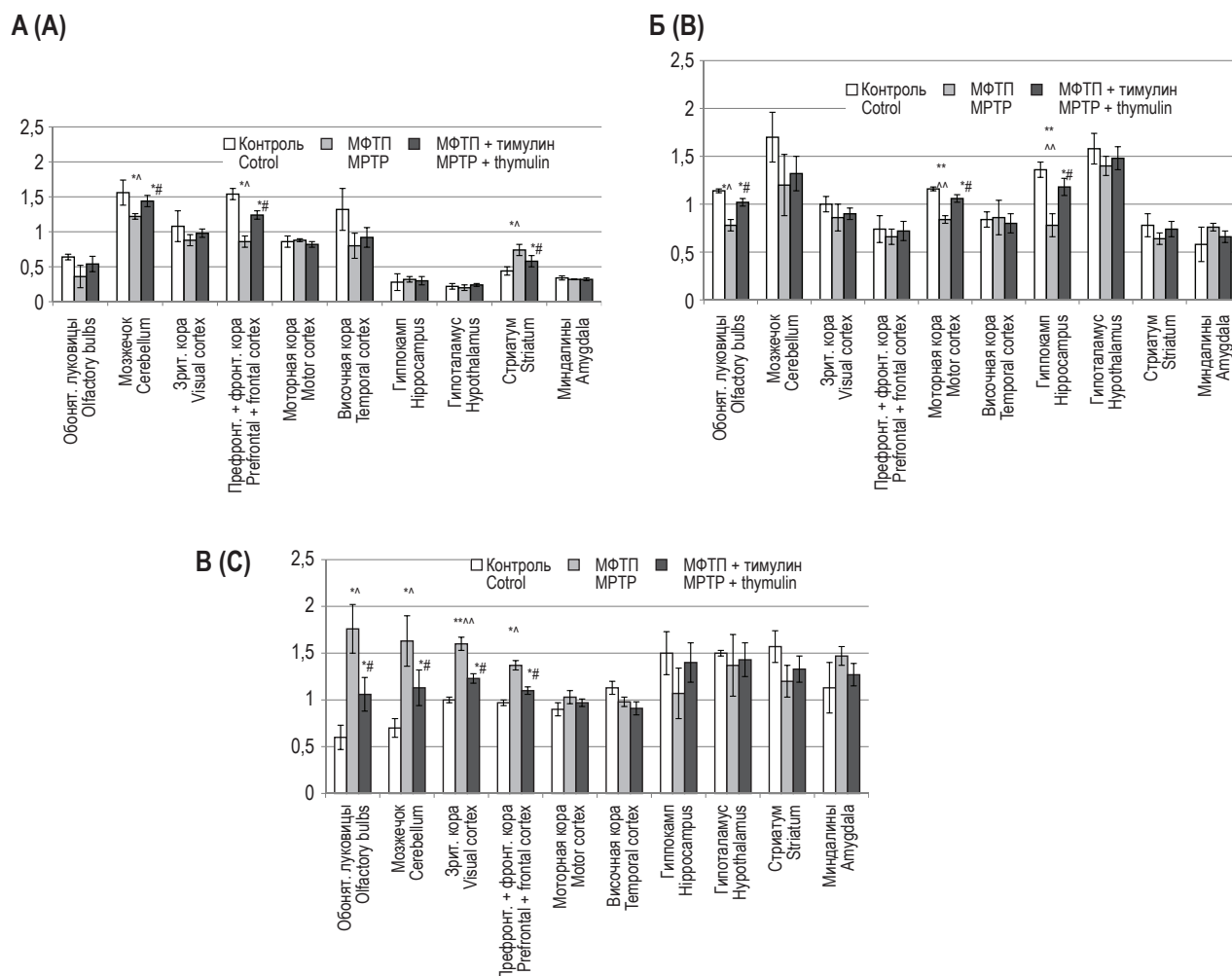


Рисунок 2. Распределение α -субъединиц Na/K-АТФазы в разных отделах мозга крыс в норме, при патологии и после коррекции

Примечание. А – распределение $\alpha 1$ -субъединиц Na/K-АТФазы в разных отделах мозга крыс. Б – распределение $\alpha 2$ -субъединиц Na/K-АТФазы в разных отделах мозга крыс. В – распределение $\alpha 3$ -субъединиц Na/K-АТФазы в разных отделах мозга крыс.
* – относительно контроля, соответствует достоверному различию с $p < 0,05$; ** – относительно контроля, соответствует достоверному различию с $p < 0,01$; ^ – относительно МФТП + тималин, соответствует достоверному различию с $p < 0,05$; ^^ – относительно МФТП + тималин, соответствует достоверному различию с $p < 0,01$; # – относительно группы МФТП, соответствует достоверному различию

Figure 2. Distribution of Na/K-ATPase α -subunits in different rat brain regions under normal conditions, in pathology and after correction

Note. A, distribution of Na/K-ATPase $\alpha 1$ -subunits in different rat brain regions. B, Distribution of Na/K-ATPase $\alpha 2$ -subunits in different rat brain regions. C, distribution of Na/K-ATPase $\alpha 3$ -subunits in different rat brain regions.

*, in relation to control, corresponds to a significant difference with $p < 0.05$; **, in relation to control, corresponds to a significant difference with $p < 0.01$; ^, in relation to MPTP + thymulin, corresponds to a significant difference with $p < 0.05$,

^^, in relation to MPTP + thymulin, corresponds to a significant difference with $p < 0.01$; #, in relation to MPTP group, corresponds to a significant difference with $p < 0.05$.

ной коре и гиппокампе, где ее концентрация уменьшается, уровень внутриклеточного калия предположительно увеличивается. $\alpha 3$ -субъединица значительно более чувствительна к ионам натрия [3] и ответственна за восстановление потенциала после возбуждения [2], поэтому ее увеличение в обонятельных лукови-

цах, мозжечке, зрительной, префронтальной и фронтальной коре приведет к более быстрому восстановлению концентрации ионов натрия в нейронах данных тканей после возбуждения. Так как получен достоверный корректирующий эффект на уровень $\alpha 2$ - и $\alpha 3$ -субъединиц на фоне гормона тимуса, можно предположить,

что тималин оказывает влияние на ионы натрия и калия в структурах мозга в модели паркинсоноподобного синдрома.

Выводы

1. Показано, что уровень тканеспецифичных изоформ α -субъединицы Na/K-АТФазы наибольший в гипоталамусе, миндалинах и стриатуме, а в префронтальной и фронтальной коре — наименьший.

2. Установлено, что в условиях МФТП-индуцированной модели болезни Паркинсона наблюдается статистически достоверное повышение количества $\alpha 1$ -субъединиц Na/K-АТФазы в стриатуме, понижение количества $\alpha 2$ -субъединиц в гиппокампе и повышение количества $\alpha 3$ -субъединиц в мозжечке по отношению к контролю. Введение гормона тимуса тималина корректирует отклонения уровня $\alpha 1$ -, $\alpha 2$ - и $\alpha 3$ -субъединиц, которые наблюдаются на фоне действия нейротоксина.

Список литературы / References

1. Киселева Н.М., Новоселецкая А.В., Иноземцев А.Н., Кудрин В.С., Клодт П.М., Наркевич В.Б., Зимина И.В., Арион В.Я. Нейрохимическое изучение механизма действия полипептидного препарата тимуса (тактивина) при эмоциональном стрессе // Вестник РУДН. Серия Медицина, 2011. №. 4. С. 143-148. [Kiseleva N.M., Novoseletskaia A.V., Inozemtsev A.N., Kudrin V.S., Klodt P.M., Narkevich V.B., Zimina I.V., Arion V.Ya. Neurochemical study of the mechanism of action of the thymus polypeptide drug (taktivin) in emotional stress. *Vestnik RUDN. Seriya meditsina = Bulletin of the Peoples' Friendship University of Russia. Medicine Series*, 2011, no. 4, pp. 143-148. (In Russ.)]
2. Azarias G., Kruusmägi M., Connor S., Akkuratov E.E., Lyons D., Brismar H., Broberger C., Aperia A.A. specific and essential role for Na,K-ATPase $\alpha 3$ in neurons co-expressing $\alpha 1$ and $\alpha 3$. *J. Biol. Chem.*, 2013, Vol. 288, no. 4, pp. 2734-2743.
3. Blanco G., Mercer R.W. Isozymes of the Na-K-ATPase: heterogeneity in structure, diversity in function. *Am. J. Physiol.*, 1998, Vol. 275, pp. 633-650.
4. Lingrel J.B., Williams M.T., Vorhees C.V., Moseley A.E. Na,K-ATPase and the role of α isoforms in behavior. *J. Bioenerg. Biomembr.*, 2007, Vol. 39, pp. 385-389.
5. Kurup R.K., Kurup P.A. Hypothalamic digoxin-mediated model for Parkinson's disease. *Int. J. Neurosci.*, 2003, Vol. 113, no. 4, pp. 515-536.
6. Pisani A., Martella G., Tschertner A., Costa C., Mercuri N.B., Bernardi G., Shen J., Calabresi P. Enhanced sensitivity of DJ-1-deficient dopaminergic neurons to energy metabolism impairment: role of Na⁺/K⁺ATPase. *J. Neurobiol. Dis.*, 2006, Vol. 23, no. 1, pp. 54-60.
7. Sun Y., Dong Z., Khodabakhsh H., Chatterjee S., Guo S. Zebrafish chemical screening reveals the impairment of dopaminergic neuronal survival by cardiac glycosides. *PLoS ONE*, 2012, Vol. 7, no. 4, e35645. doi: 10.1371/journal.pone.0035645.
8. Taylor A., Beerahee A., Citerone D., Davy M., Fitzpatrick K., Lopez-Gil A., Stocchi F. The effect of steady-state ropinirole on plasma concentrations of digoxin in patients with Parkinson's disease. *Br. J. Clin. Pharmacol.*, 1999, Vol. 47, no. 2, pp. 219-222.

Авторы:

Королев А.Г. — аспирант кафедры высшей нервной деятельности, биологический факультет ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», Москва, Россия

Новоселецкая А.В. — к.б.н., старший научный сотрудник кафедры высшей нервной деятельности, биологический факультет ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», Москва, Россия

Киселева Н.М. — к.б.н., профессор кафедры фармакологии ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Authors:

Korolev A.G., Graduate Student, Department of Higher Nervous Activity, Faculty of Biology, M. Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation

Novoseletskaia A.V., PhD (Biology), Senior Research Associate, Department of Higher Nervous Activity, Faculty of Biology, M. Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation

Kiseleva N.M., PhD (Biology), Professor, Department of Pharmacology, Russian National N. Pirogov Research Medical University, Moscow, Russian Federation

Поступила 02.07.2019

Отправлена на доработку 20.09.2019

Принята к печати 10.01.2020

Received 02.07.2019

Revision received 20.09.2019

Accepted 10.01.2020