

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

©Коллектив авторов

### ВОЗМОЖНОЕ УЧАСТИЕ НЕЙРОНАЛЬНЫХ НИКОТИНОВЫХ АЦЕТИЛХОЛИНОВЫХ РЕЦЕПТОРОВ В КОМПЕНСАТОРНЫХ МЕХАНИЗМАХ МОЗГА НА РАННИХ СТАДИЯХ БОЛЕЗНИ ПАРКИНСОНА

*Е.В. Крюкова<sup>1\*</sup>, И.В. Шелухина<sup>1</sup>, А.А. Колачева<sup>2</sup>, А.Х. Алиева<sup>3</sup>, М.И. Шадрин<sup>3</sup>, П.А. Сломинский<sup>3</sup>, И.Е. Кашиверов<sup>1</sup>, Ю.Н. Уткин<sup>1</sup>, М.В. Узрюмов<sup>2</sup>, В.И. Цетлин<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>Институт биоорганической химии имени М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова, 117997 Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10; эл. почта: evkr@mail.ru

<sup>2</sup>Институт биологии развития имени Н.К. Кольцова, Москва

<sup>3</sup>Институт молекулярной генетики, Москва

Исследована роль никотиновых ацетилхолиновых рецепторов (нАХР) на ранних стадиях болезни Паркинсона (БП) на экспериментальных моделях у мышей, соответствующих досимптомной и ранней симптомной стадиям БП. Количественное определение нАХР в препаратах стриатума и чёрной субстанции (ЧС) проводили с помощью лигандов, селективных для различных подтипов нАХР: радиоактивных производных эпибатидина,  $\alpha$ -конотоксина МП и  $\alpha$ -бунгаротоксина. Количество выявленных лиганд-связывающих сайтов зависело от их типа, локализации в головном мозге и стадии заболевания. В стриатуме связывание эпибатидина на досимптомной и ранней симптомной стадиях снижено на 66% и 70% соответственно, а в ЧС – повышено до 160% на досимптомной стадии по сравнению с контролем. Связывание  $\alpha$ -конотоксина МП на терминалях аксонов дофаминергических нейронов на досимптомной стадии было снижено на 20%, и снижение их количества продолжилось на ранней симптомной стадии. Связывание  $\alpha$ -бунгаротоксина в стриатуме повышено на досимптомной и снижено на ранней симптомной стадиях, а в ЧС уменьшалось уже на досимптомной стадии и оставалось постоянным. Значительное снижение экспрессии генов нейрональных нАХР *Chrna4* и *Chrna6*, кодирующих  $\alpha 4$  и  $\alpha 6$  субъединицы нАХР, отмечено в ЧС на ранней симптомной стадии, а для гена *Chrna7*, кодирующего  $\alpha 7$  субъединицу, обнаружено 13-кратное увеличение на досимптомной стадии. Полученные данные об изменениях уровня мРНК или функциональных холинорецепторов свидетельствуют о возможном участии нАХР в компенсаторных механизмах на ранних стадиях БП.

**Ключевые слова:** никотиновые ацетилхолиновые рецепторы, дофаминергический нейрон, 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридин, стриатум, черная субстанция

DOI 10.18097/PBMC20176303241

## ВВЕДЕНИЕ

Болезнь Паркинсона (БП) характеризуется дегенерацией дофаминергических (ДА-ергических) нейронов и снижением уровня дофамина (ДА) в базальных ганглиях (стриатуме и чёрной субстанции (ЧС)), что приводит к прогрессирующему расстройству двигательных функций пациентов [1]. Это сопровождается изменениями в экспрессии и функциональной активности различных подтипов нейрональных никотиновых ацетилхолиновых рецепторов (нАХР) [2, 3], локализованных пресинаптически на нервных окончаниях. Эти рецепторы имеют регуляторную функцию, участвуя в пластичности мозга посредством модуляции кальций-зависимого высвобождения нейромедиаторов, включая ДА [4]. Кроме того, ацетилхолин, взаимодействуя с нАХР на терминалях ДА-ергических аксонов, непосредственно приводит к выбросу нейромедиатора [5]. Такое же действие показано для никотина [6]. В головном мозге млекопитающих больше всего представлены гомомерные  $\alpha 7$ , а также гетеромерные  $\alpha 4\beta 2^*$  и  $\alpha 6\beta 2^*$  рецепторы (звёздочка \* указывает на возможное присутствие в рецепторе других субъединиц) [7].

Основной особенностью БП является её длительное развитие на доклинической стадии без типичных двигательных симптомов. Первые симптомы начинают появляться при гибели 50-60% тел ДА-ергических нейронов в ЧС [8]. Отсутствие клинических проявлений объясняется развитием компенсаторных механизмов в головном мозге [9]. В связи с этим первая цель нашего исследования состояла в определении количественных изменений нАХР в нигростриатной системе мышей на досимптомной стадии паркинсонизма по сравнению с контрольными животными для того, чтобы оценить, какие субъединицы могут участвовать в компенсаторных процессах. Вторая цель работы состояла в поиске изменений, которые могут служить пусковым механизмом при переходе к моторной дисфункции. Для этого мы сравнили статус нАХР на ранней симптомной и досимптомной стадиях паркинсонизма у мышей.

Для создания модели экспериментального паркинсонизма используется 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридин (МФТП) [см. обзор 10]. МФТП проникает через гематоэнцефалический барьер и превращается в астроцитах в нейротоксический

\* - адресат для переписки

катион 1-метил-4-фенилпиридиния с последующим его переносом мембранным транспортером ДА в ДА-ергические нейроны, что приводит к их гибели из-за окислительного стресса. Степень поражения ДА-нейронов nigrostriатной системы и тяжесть клинических проявлений в значительной степени зависит от схемы введения МФТП, что позволяет моделировать разные стадии БП [11, 12].

В данной работе, используя МФТП-индуцированные нейротоксические модели, мы исследовали изменения в экспрессии генов и содержании nAХР на досимптомной стадии паркинсонизма по сравнению с ранней симптомной. На досимптомной стадии у мышей не наблюдается никаких изменений в двигательной функции, тем не менее, около 30% тел ДА-ергических нейронов в ЧС и 60% терминалей их аксонов в стриатуме погибают [11]. Ранняя симптомная стадия у мышей характеризуется моторными нарушениями, что связано с дегенерацией около 40% тел ДА-ергических нейронов в ЧС и 70% терминалей их аксонов в стриатуме [11].

**МЕТОДИКА**

*Животные и схема введения МФТП*

Все эксперименты на животных проводились в строгом соответствии с директивой 2010/63ЕU Европейского парламента и Совета Европейского Союза от 22 сентября 2010 года по охране животных, используемых для научных целей.

Модели двух стадий БП, ранее разработаны и охарактеризованы в Институте биологии развития имени Н.К. Кольцова РАН [11]. Мышам (n=10) вводили с 2-х часовым интервалом две или четыре подкожные инъекции МФТП (“Sigma”, США) в дозе 12 мг/кг массы тела для получения досимптомной или ранней симптомной стадии, соответственно. Контрольным мышам (n=10) вводили физиологический раствор. Через 14 дней мышей декапитировали с использованием гильотины для мелких животных (“NEMI Scientific”, США), и выделяли стриатум и ЧС. В препаратах компактной части ЧС может присутствовать немного прилежащей нервной ткани.

*Таблица 1. Последовательности использованных праймеров и зондов*

Ген	Последовательности нуклеотидов
<i>Chrna4</i> NM_015730.5 <sup>a</sup>	Зонд: 5'-ROX-ТСТСАГАТГТGGТCCTTGТССG-ВНQ2-3' Прямой праймер: 5'-СТТGGТСААСАAGТG-3' Обратный праймер: 5'-GТТGGТCGТСАТСАТCTG-3'
<i>Chrna6</i> NM_021369.2	Зонд: 5'-ROX-ССААСGСААТCTGТАGТCCTТСС-ВНQ2-3' Прямой праймер: 5'-GGАТGAAGТСААССАГАТТА-3' Обратный праймер: 5'-СТCGАТGССАТСАТАCTC-3'
<i>Chrna7</i> NM_007390.3	Зонд: 5'-ROX-АСТТGGТТCTТCTСАТССАТССА-ВНQ2-3' Прямой праймер: 5'-СТСАССGТGТАCTТCTCC-3' Обратный праймер: 5'-ССААGАСАТТТGТАGССААА-3'
<i>Bcat2</i> NM_001243053.1	Зонд: 5'-FAM-СGGАТАСАТССААСAGCTCCTGCTTGT-ВНQ1-3' Прямой праймер: 5'-ТСААТGGAСAGGАТGCTACG-3' Обратный праймер: 5'-ССAGТCTТТGТCTACTТСААТGAGC-3'
<i>Psmд7</i> NM_010817.2	Зонд: 5'-FAM-AGТCCTAGGТCCTТТGGCTTCAСGТCGA-ВНQ1-3' Прямой праймер: 5'-CTGCACAAGAATGАТATCGCCATC-3' Обратный праймер: 5'-CTCCACTGAGATGТАGGCTTCG-3'

Примечание: а - номер в GenBank.

*Выделение РНК*

Общую РНК выделяли из 10 мг каждого образца ткани (ЧС и стриатума) с помощью набора QIAamp РНК Mini Kit (“Qiagen”, Германия) и спектрофотометрически определяли её количество. Реакцию обратной транскрипции проводили с помощью набора RevertAid™ Н Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (“Fermentas”, Литва) и 50 нг общей РНК. Каждый образец ткани анализировали в трёх независимых повторах.

*Определение уровня мРНК*

Относительный уровень экспрессии генов *Chrna4*, *Chrna6*, *Chrna7*, кодирующих α4, α6 и α7 субъединицы nAХР, анализировали с помощью ПЦР в реальном времени, основанной на технологии TaqMan. Транскрипты генов *Bcat2* и *Psmд7* амплифицировали с помощью StepOnePlus™ System (“Applied Biosystems”, США) совместно с транскриптом исследуемого гена для нормализации данных по экспрессии. Праймеры и зонды разрабатывали с помощью программного обеспечения Beacon Designer 7.02 (табл. 1). Каждый образец был проанализирован в трёх независимых экспериментах. Относительный уровень РНК в каждой тестовой группе был вычислен как  $R = 2^{-\Delta\Delta C_p}$  [13]. Уровни РНК в контрольной группе приняты за единицу. Данные анализировали с помощью непараметрического критерия U Манна-Уитни, все вычисления выполнены с применением программного обеспечения Statistica 8.0 и MS Excel 2010 (“Microsoft”, США).

*Получение препарата мембран мозга*

Выделенные отделы мозга гомогенизировали с использованием гомогенизатора Potter S (“B. Braun”, Германия) в 10-кратном объёме гипотонического буфера (2 мМ НЕРЕС, 14 мМ NaCl, 0,2 мМ KCl, 0,2 мМ CaCl<sub>2</sub>, 0,1 мМ MgSO<sub>4</sub>, 1 мМ PMSF, pH 7,5). Гомогенат разводили в пятикратном объёме того же буфера и центрифугировали в течение 20 мин при 20000 g (ротор JA-21 “Beckman Coulter”, США). Все операции проводили при 4°C. Осадок ресуспендировали в 50-кратном объёме того же буфера,

выдерживали при 37°C в течение 25 мин, после чего повторно центрифугировали в тех же условиях. Осадок ресуспендировали в гомогенизационном буфере, замораживали и хранили при -70°C. Содержание белка определяли с помощью набора Micro BSA Protein Assay Kit ("Thermo Scientific", США), используя бычий сывороточный альбумин (BSA) в качестве стандарта.

#### Синтез $\alpha$ -коногоксина МПУ0 и его радиоактивно-меченого аналога

Аналог  $\alpha$ -коногоксина МП, удлинённого с N-конца на аминокислотный остаток тирозина (МПУ0) получали методом синтеза пептидов на твёрдой фазе [14]. Полученный препарат МПУ0 очищали с помощью ВЭЖХ; его структура подтверждена с помощью MALDI-TOF масс-спектрометрии. Синтез радиоактивно-меченого производного  $\alpha$ -коногоксина МПУ0 проводили по методу, разработанному ранее [15]. Для радиолигандного анализа использовали моно-[<sup>125</sup>I]- $\alpha$ -коногоксин МПУ0 (<sup>125</sup>I-МПУ0).

#### Радиолигандный анализ

Для оценки количества участков связывания  $\alpha$ -бунгаротоксина или  $\alpha$ -коногоксина МПУ0 препараты мембран (50 мкг белка) инкубировали с 1 нМ <sup>125</sup>I-Бгт ("GE Healthcare", Великобритания) или 0,6 нМ <sup>125</sup>I-МПУ0 (удельная активность 2000 Ки/ммоль) в 50 мкл буфера для связывания: 50 mM Трис-НСl, 150 mM NaCl (pH 8,0), содержащего 0,1% БСА (вес/объём), 5 mM ЭДТА и коктейль ингибиторов протеаз. После инкубации в течение 2 ч при комнатной температуре связывание останавливали фильтрацией через фильтры Whatman GF/F, выдержанные в 0,5% полиэтиленимине. Фильтры промывали холодным 50 mM Трис-НСl (pH 8,0) и связавшуюся радиоактивность определяли на  $\gamma$ -счетчике Wallac 1470 WIZARD® Gamma Counter ("PerkinElmer", США). Для определения количества сайтов связывания эпибатидина образцы (50 мкг белка) инкубировали с 2 нМ <sup>3</sup>H-эпибатидина (30–60 Ки/ммоль, "PerkinElmer Life Sciences", США) в 125 мкл буфера для связывания (144 mM NaCl, 1,5 mM KCl, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 50 mM Трис-НСl, 0,1% БСА, 1 mM PMSF, pH 7,5) в течение 3 ч. После фильтрования, фильтры промывали холодным 50 mM Трис-НСl (pH 8,0), высушивали, помещали во флаконы со сцинтиллятором и просчитывали количество связавшегося <sup>3</sup>H-эпибатидина в жидкостном сцинтилляционном счетчике Tri-carb 2100TR ("Packard", США). Неспецифическую сорбцию <sup>3</sup>H-эпибатидина, <sup>125</sup>I-МПУ0 или <sup>125</sup>I-Бгт определяли в присутствии 1 мкМ никотина, МПУ0 или  $\alpha$ -коброатоксина, соответственно. Все измерения были выполнены в 3-5 повторах.

#### Статистическая обработка результатов

Для математической обработки данных использовали программу OriginPro 7.5 ("OriginLab Corporation", США). Статистическую обработку проводили с помощью t-теста Стьюдента. Результаты радиолигандного анализа представлены в виде средних значений двух независимых экспериментов  $\pm$  S.E.M.

Для оценки относительного уровня мРНК использована медиана и интерквартильный размах (25%-75%). Уровень значимости был определен при  $p=0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На ранней симптомной модели паркинсонизма у мышей в течение 6 ч после последней инъекции нейротоксина происходит дегенерация тел ДА-ергических нейронов, после чего их количество остается постоянным, и одновременно с дегенерацией начинают развиваться компенсаторные процессы, направленные на улучшение ДА-ергической передачи в стриатуме [16]. В настоящей работе мы исследовали содержание нАХР в стриатуме и ЧС через две недели после последней инъекции МФТП, когда в выживших ДА-ергических нейронах преобладают компенсаторные изменения.

Гибель нигростриатных ДА-ергических нейронов сопровождается изменениями в уровне экспрессии и функциональной активности различных подтипов нАХР [17]. На используемых моделях, мы определили количество сайтов связывания лигандов с наиболее представленными в нигростриатной системе  $\alpha 4$ ,  $\alpha 6$  и  $\alpha 7$  субъединицами нАХР, а также проследили изменения содержания мРНК данных субъединиц. Содержание индивидуальных подтипов нАХР в гомогенатах отделов мозга определено радиолигандным анализом с использованием производных  $\alpha$ -бунгаротоксина (<sup>125</sup>I-Бгт), <sup>3</sup>H-эпибатидина или аналога  $\alpha$ -коногоксина МП (<sup>125</sup>I-МПУ0) (табл. 2).

$\alpha$ -Коногоксин МП из яда морских улиток *Conus magus* является специфическим лигандом и обладает высоким сродством к  $\alpha 6\beta 2^*$  и  $\alpha 3\beta 2^*$  нАХР [18]. Для количественного определения  $\alpha 6$  субъединицы используется <sup>125</sup>I-меченый аналог  $\alpha$ -коногоксина МП, содержащий на N-конце дополнительный остаток тирозина (МП-У0) [19]. Исследования на мышах, нокаутных по гену *Chrnab* ( $\alpha 6^{-/-}$ ), показали, что именно  $\alpha 6$  субъединица является основным сайтом связывания <sup>125</sup>I-МПУ0 в центральной нервной системе грызунов [18].

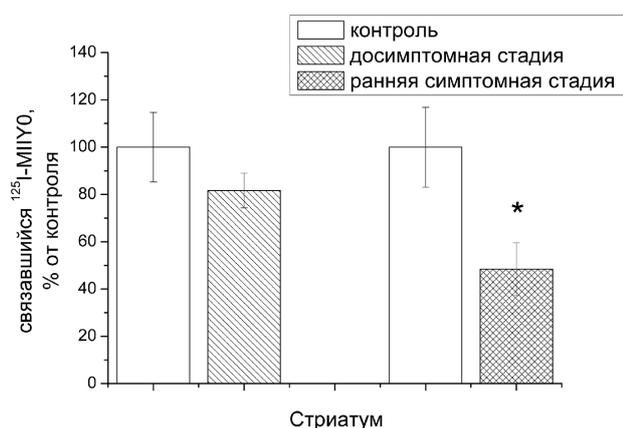
По нашим данным, в стриатуме общее количество сайтов связывания <sup>125</sup>I-МПУ0 находилось в пределах от 16 до 45 фмоль/мг белка, и их количество менялось в зависимости от стадии паркинсонизма. В стриатуме на досимптомной стадии отмечено уменьшение участков связывания <sup>125</sup>I-МПУ0 до 80% от контрольного уровня. На ранней симптомной стадии, одновременно с более тяжёлыми поражениями нейронов, наблюдалась тенденция к дальнейшему снижению связывания <sup>125</sup>I-МПУ0 (до 48%) (рис. 1, табл. 2). Поскольку в модели МФТП-индуцированной БП разрушение ДА-ергических терминалей в стриатуме происходит раньше и более выражено, чем дегградация тел нейронов в ЧС [11], наши данные о снижении  $\alpha 6^*$  нАХР согласуются с данными о числе сохранившихся терминалей ДА-ергических нейронов (рис. 1, табл. 2). При переходе от досимптомной к ранней симптомной стадии число рецепторов снизилось в два раза

## НИКОТИНОВЫЕ АЦЕТИЛХОЛИНОВЫЕ РЕЦЕПТОРЫ ПРИ БОЛЕЗНИ ПАРКИНСОНА

**Таблица 2.** Изменения количества участков связывания радиоактивных лигандов на разных стадиях паркинсонизма. Количество участков связывания у контрольных мышей принято за 100%. Представлены средние значения двух независимых экспериментов  $\pm$  S.E.M

			Контроль	Досимптомная стадия	Контроль	Ранняя симптомная стадия
<b>Стриатум</b>			n=10	n=9	n=10	n=10
Белок, мг/мл			0,71 $\pm$ 0,07 <sup>a</sup> (n=19)		1,24 $\pm$ 0,1 (n=16)	
Связывание радиоактивно-меченого лиганда	<sup>125</sup> I-Bgt	фмоль/мг белка	8,89 $\pm$ 0,59	10,62 $\pm$ 1,4	8,44 $\pm$ 1,09	6,33 $\pm$ 0,62
		% от контроля	<b>119,5<math>\pm</math>15,75</b>		<b>75,0<math>\pm</math>7,34</b>	
	<sup>125</sup> I-MPIYO	фмоль/мг белка	44,95 $\pm$ 6,63	36,7 $\pm$ 3,29	33,69 $\pm$ 5,72	16,31 $\pm$ 3,76 <sup>b</sup>
		% от контроля	<b>81,64<math>\pm</math>7,31</b>		<b>48,41<math>\pm</math>11,16</b>	
<sup>3</sup> H-эпибатидин	фмоль/мг белка	64,35 $\pm$ 10,6	42,8 $\pm$ 3,68 <sup>b</sup>	37,91 $\pm$ 3,4	26,86 $\pm$ 4,92	
	% от контроля	<b>66,51<math>\pm</math>5,7</b>		<b>70,85<math>\pm</math>12,9</b>		
<b>Чёрная субстанция</b>			n=10	n=10	n=10	n=8
Белок, мг/мл			0,43 $\pm$ 0,04 (n=10)		0,33 $\pm$ 0,02 (n=10)	
Связывание радиоактивно-меченого лиганда	<sup>125</sup> I-Bgt	фмоль/мг белка	14,63 $\pm$ 1,33	9,13 $\pm$ 1,07 <sup>b</sup>	14,14 $\pm$ 0,85	10,50 $\pm$ 1,06 <sup>b</sup>
		% от контроля	<b>62,41<math>\pm</math>7,31<sup>b</sup></b>		<b>74,25<math>\pm</math>7,5<sup>b</sup></b>	
	<sup>3</sup> H-эпибатидин	фмоль/мг белка	20,4 $\pm$ 2,55	32,6 $\pm$ 5,85	25,8 $\pm$ 4,1	28,1 $\pm$ 10,7 <sup>c</sup>
		% от контроля	<b>159,8<math>\pm</math>20,0<sup>d</sup></b>			

Примечание: a - различия в концентрациях белка связаны с различным количеством препарированных тканей отделов мозга; b -  $p < 0,05$ ; c - данные недостоверны из-за недостаточного количества препаратов; d -  $p < 0,1$ .



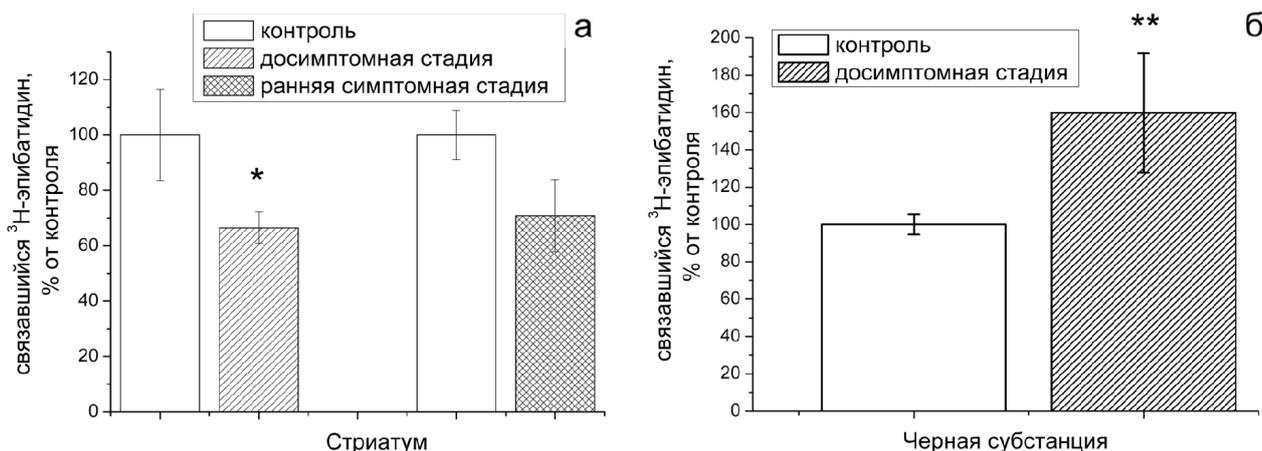
**Рисунок 1.** Содержание сайтов связывания <sup>125</sup>I-MPIYO в гомогенатах стриатума. Показаны статистически значимые различия по сравнению с контрольными при \* $p < 0,05$ . На досимптомной стадии количество связывающих сайтов не отличалось достоверно от контрольных значений ( $p > 0,1$ ). В этом и следующих рисунках представленные данные соответствуют досимптомной и ранней симптомной стадиям паркинсонизма. Количество сайтов связывания у контрольных животных (0,9% NaCl) принято за 100%.

по сравнению с контролем (рис. 1), при этом число терминалей DA-ергических аксонов снижается на 10% и составляет около 30% от начального количества [11]. Поскольку  $\alpha 6^*$  нАХР в стриатуме расположены исключительно на терминалях DA-ергических аксонов [19], наблюдается соответствие между изменениями количества аксонов и представленностью данного подтипа нАХР. Таким образом, на досимптомной стадии, когда в нигростриатной системе развиваются компенсаторные механизмы, при общем снижении количества пресинаптических  $\alpha 6^*$  рецепторов их относительное число на уцелевших терминалях аксонов остаётся постоянным, и наши результаты могут отражать неучастие

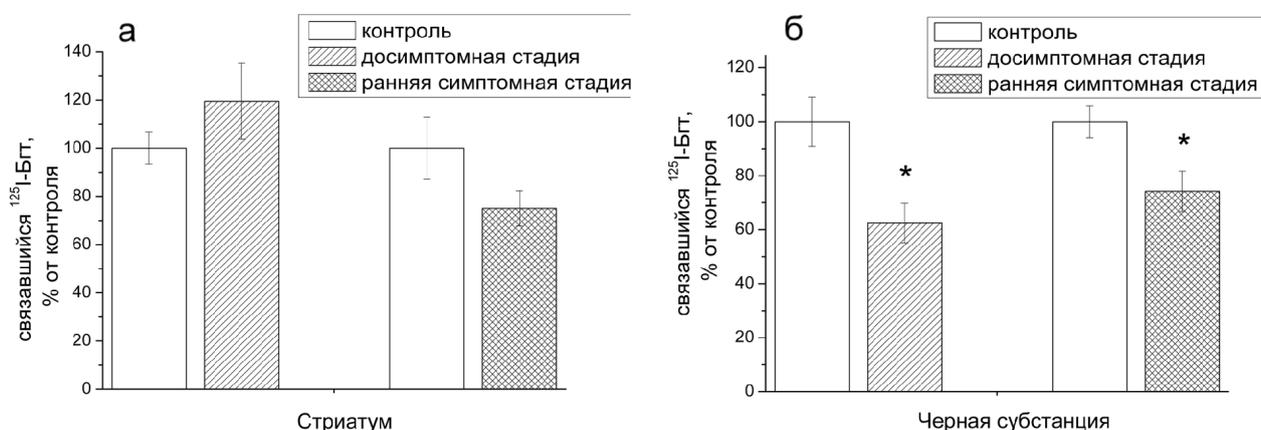
в компенсаторных механизмах  $\alpha 6^*$  нАХР стриатума. К сожалению, для  $\alpha 6^*$  нАХР в ЧС мы не смогли добиться достаточной достоверности подобных измерений из-за очень малого количества препаратов.

В отличие от  $\alpha 6$  субъединиц,  $\alpha 4^*$  нАХР присутствуют на DA-ергических аксонах и на других нейронах стриатума [20], а также в ЧС грызунов [21, 22]. Для количественного определения  $\alpha 4^*$  гетеромерных рецепторов нами использовался <sup>3</sup>H-эпибатидин. Общее количество сайтов связывания составляло от 20 до 60 фмоль/мг белка. В стриатуме на досимптомной стадии количество эпибатидин-связывающих сайтов значительно снизилось (до 66% от контрольного уровня) и оставалось постоянным при переходе к ранней симптомной стадии (рис. 2а, табл. 2). Принимая во внимание, что при этом число  $\alpha 6^*$  нАХР уменьшалось (рис. 1), постоянный уровень связывания <sup>3</sup>H-эпибатидина может поддерживаться посредством компенсаторного увеличения числа  $\alpha 4^*$  нАХР. В гомогенатах ЧС на досимптомной стадии наблюдалась обратная зависимость: при уменьшении числа тел DA-ергических нейронов на 30% происходило увеличение количества участков связывания эпибатидина на 60% (рис. 2б). Таким образом, увеличение сайтов связывания <sup>3</sup>H-эпибатидина на досимптомной стадии в ЧС и относительное увеличение  $\alpha 4^*$  нАХР в стриатуме может свидетельствовать об участии данной субъединицы в компенсаторных процессах. Данные для ЧС на ранней симптомной стадии не были достоверными из-за недостаточного количества рецепторов.

Мы также определили количественное связывание <sup>125</sup>I-Бгт, специфического и высокоаффинного лиганда гомомерных  $\alpha 7$  нАХР. Кроме DA-ергических нейронов  $\alpha 7$  субъединица нАХР представлена на ГАМК-ергических нейронах, холинергических интернейронах, глутаматергических аксонах



**Рисунок 2.** Содержание сайтов связывания  $^3\text{H}$ -эпибатидина в гомогенатах стриатума (а) и ЧС (б). Показаны статистически значимые различия по сравнению с контрольным при \* $p < 0,05$  и \*\* $p < 0,1$ . Для других приведённых данных отличия от контроля не были статистически достоверны ( $p > 0,1$ ).



**Рисунок 3.** Содержание сайтов связывания  $^{125}\text{I}$ -Бгт в гомогенатах стриатума (а) и ЧС (б). Показаны статистически значимые различия по сравнению с контрольным при \* $p < 0,05$ . Для других приведённых значений отличия от контроля не были статистически достоверны ( $p > 0,1$ ).

и на астроглиальных клетках ЧС и стриатума [22]. В стриатуме на досимптомной стадии мы наблюдали некоторое увеличение сайтов связывания  $^{125}\text{I}$ -Бгт до 119% от контроля (рис. 3а, табл. 2). На ранней симптомной стадии паркинсонизма обнаружено снижение на 25% (рис. 3а, табл. 2). Поскольку  $\alpha 7$  нАХР практически отсутствуют в стриатуме на ДА-ергических терминалях аксонов, наблюдаемые изменения указывают на то, что  $\alpha 7$  нАХР, присутствующие на других типах нейронов в ЧС, стриатуме или базальных ганглиях могут участвовать в регуляции ДА-ергической активности. В препаратах ЧС уровень  $^{125}\text{I}$ -Бгт-связывающих сайтов уменьшился до 62% уже на досимптомной стадии, и остался постоянным на ранней симптомной (рис. 3б, табл. 2). Поскольку около половины ДА-ергических нейронов ЧС экспрессируют  $\alpha 7$  нАХР [21], это может означать, что все МФТП-чувствительные нейроны, содержащие эту субъединицу погибают уже на досимптомной стадии. Несмотря на невысокую представленность  $\alpha 7$  нАХР на ДА-ергических нейронах, имеются данные об участии рецепторов именно данного типа в патогенезе БП [23]. У крыс с токсической моделью паркинсонизма,

вызванной 6-гидроксидамином, нейропротекторное действие оказывают высокоселективные агонисты  $\alpha 7$  [24, 25]. Кроме того, в патогенезе БП участвует нейровоспаление [26], а активация  $\alpha 7$  нАХР никотином уменьшает синтез цитокинов и вызывает противовоспалительное действие [27]. Поэтому возможным механизмом участия  $\alpha 7$  нАХР в пластичности мозга является торможение воспаления в ответ на повреждающее действие нейротоксина МФТП.

Мы проследили изменения в уровнях экспрессии генов *Chrna4*, *Chrna6* и *Chrna7*, кодирующих  $\alpha 4$ ,  $\alpha 6$  и  $\alpha 7$  субъединицы нАХР в стриатуме и ЧС. Обнаружено снижение уровня мРНК  $\alpha 4$  и  $\alpha 6$  субъединиц на досимптомной и ранней симптомной стадиях паркинсонизма по сравнению с контролем (табл. 3). В стриатуме уже на досимптомной стадии для всех изучаемых генов отмечено снижение уровней мРНК более чем на порядок, причём на ранней симптомной стадии эти изменения были менее существенны, чем на досимптомной. Одновременно, как было показано выше, уровень соответствующих рецепторов снизился в гораздо меньшей степени, не падая ниже 66% и 80% для ( $\alpha 4^* + \alpha 6^*$ ) и  $\alpha 6^*$  нАХР,

Таблица 3. Относительный уровень мРНК на разных стадиях паркинсонизма

Ген	мРНК, Ме (25%-75%) <sup>a</sup> , p<0,05	
	Досимптомная стадия	Ранняя симптомная стадия
	Стриатум	
<i>Chrna4</i>	0,10 (0,03 – 0,45)	0,12 (0,04 – 0,57)
<i>Chrna6</i>	0,08 (0,02 – 0,51)	0,39 (0,11 – 1,61) <sup>b</sup>
<i>Chrna7</i>	0,06 (0,02 – 0,25)	0,12 (0,04 – 0,53)
Чёрная субстанция		
<i>Chrna4</i>	0,62 (0,23 – 1,58)	0,29 (0,10 – 0,83)
<i>Chrna6</i>	0,67 (0,22 – 1,71)	0,17 (0,06 – 0,45)
<i>Chrna7</i>	13,35 (11,77 – 15,37)	0,29 (0,04 – 0,76)

Примечание: мРНК в контрольной группе принята за 1. а - Ме, медиана; b - данные статистически недостоверны.

соответственно (табл. 2). В ЧС на досимптомной стадии экспрессия генов *Chrna4* и *Chrna6* снижалась менее чем в 2 раза (табл. 3), что сопровождалось снижением до 60% числа рецепторов, чувствительных к эפיбатидину. На ранней симптомной стадии, по сравнению с досимптомной, обнаружено дальнейшее падение уровня мРНК в ЧС и небольшое увеличение в стриатуме, при этом общее количество соответствующих рецепторов продолжало снижаться. Только для гена *Chrna7* отмечено резкое 13-кратное повышение уровня транскриптов в ЧС мышей на досимптомной стадии, которое сопровождалось уменьшением Бгт-связывающих сайтов. Подобный рост уровня мРНК был зафиксирован ранее: временное 2-кратное увеличение мРНК  $\alpha 7$  в стриатуме и ЧС происходило на острой модели симптомной стадии БП [28]. Есть сведения о том, что изменения уровня нАХР не всегда коррелируют с изменениями уровня мРНК субъединиц [29]; при хроническом введении никотина рост связывания радиоактивно-меченого Бгт или эпибатидина определяется влиянием никотина в качестве шаперона при сборке функциональных рецепторов и не зависит от уровня мРНК [30]. Для всех остальных изученных нами субъединиц, изменения экспрессии нАХР коррелируют с изменениями уровня мРНК, но происходят менее резко. При переходе к симптомной стадии происходит снижение количества транскриптов всех генов.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Увеличение содержания  $\alpha 7$  нАХР в стриатуме, а также  $\alpha 4^*$  в ЧС на досимптомной стадии паркинсонизма мышей свидетельствует о возможном вовлечении холинорецепторов в пластичность мозга. Рецепторы, содержащие  $\alpha 4$  и  $\alpha 7$ , но не  $\alpha 6$  субъединицы могут участвовать в компенсаторных механизмах на досимптомной стадии БП, свидетельствуя о перспективности использования в качестве нейропротекторов новых высокоэффективных агонистов данных подтипов нАХР на ранней стадии развития БП.

## БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ “Изучение механизмов пластичности мозга и разработка доклинической диагностики при болезни Паркинсона – в эксперименте и в клинике” (КОМФИ РФФИ 13-04-40375).

## ЛИТЕРАТУРА

1. Samii A., Nutt J.G., Ransom B.R. (2004) Lancet, **363**, 1783-1793.
2. Quik M., Bordia T., Huang L., Perez X. (2011) CNS Neurol. Disord. Drug Targets, **10**, 651-658.
3. Quik M., Zhang D., Perez X.A., Bordia T. (2014) Pharmacol. Ther., **144**, 50-59.
4. Grady S.R., Salminen O., Laverty, D.C., Whiteaker P., McIntosh J.M., Collins A.C. Marks M.J. (2007) Biochem. Pharmacol., **74**, 1235-1246.
5. Cacheo R., Mateo Y., Mathur B.N., Irving J., Wang H.L., Morales M., Lovinger D.M., Cheer J.F. (2012) Cell Rep., **26**, 33-41.
6. Wonnacott S., Sidhpura N., Balfour D.J. (2005) Curr. Opin. Pharmacol., **5**, 53-59.
7. Lindstrom J.M. (2003). Ann. N.-Y. Acad. Sci., **998**, 41-52.
8. Riederer P., Wuketich S. (1976) J. Neural. Transm., **38**, 277-301.
9. Bezard E., Gross C., Brotchie J. (2003) Trends Neurosci., **26**, 215-221.
10. Jakowec M.W., Petzinger G.M. (2004) Comp. Med., **54**, 497-513.
11. Ugrumov M.V., Khaindrava V.G., Kozina E.A., Kucheryanu V.G., Bocharov E.V., Kryzhanovsky G.N., Kudrin V.S., Narkevich V.B., Klodt P.M., Rayevsky K.S., Pronina T.S. (2011) Neuroscience, **181**, 175-188.
12. 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., Ugrumov M.V. (2014) J. Neurol. Sci., **340**, 198-207.
13. Livak K.J., Schmittgen T.D. (2001) Methods, **25**, 402-408.
14. Сури́н А.М., Крю́кова Е.В., Стру́ков А.С., Жма́к М.Н., Талка П., Туо́минен П., Салми́нен О., Хи́руг Л.С., Каи́шеверов И.Е., Цетли́н В.И. (2012) Биоорг. химия, **38**, 214-222.
15. Kasheverov I.E., Zhmak M.N., Khrushchov A.Y., Tsetlin V.I. (2011) Mar. Drugs, **9**, 1698-1714.
16. Колачева А.А., Козина Е.А., Волина Е.В., Угрюмов М.В. (2014) Докл. Акад. Наук, **456**, 246-250.
17. Quik M., Bordia T., O'Leary K. (2007) Biochem. Pharmacol., **74**, 1224-1234.
18. Champiaux N., Han Z-Y., Bessis A., Rossi F.M., Zoli M., Marubio L., McIntosh J.M., Changeux J.-P. (2002) J. Neurosci., **22**, 1208-1217.
19. Salminen O., Whiteaker P., Grady S.R., Collins A.C., McIntosh J.M., Marks M.J. (2005) Neuropharmacology, **48**, 696-705.
20. Zoli M., Moretti M., Zanardi A., McIntosh J.M., Clement F., Gotti C. (2002) J. Neurosci., **22**, 8785-8789.
21. Klink R., de Kerchove d'Exaerde A., Zoli M., Changeux J.P. (2001) J. Neurosci., **21**, 1452-1456.
22. Poisik O.V., Shen J., Jones S., Yakel J.L. (2008) J. Physiol., **586**, 1365-1378.
23. Kawamata J., Suzuki S., Shimohama S. (2012) Curr. Drug Targets, **13**, 623-630.

24. Suzuki S., Kawamata J., Matsushita T., Matsumura A., Hisahara S., Takata K., Kitamura Y., Kem W., Shimohama S. (2013) *J. Neurosci. Res.*, **91**, 462-471.
25. Bordia T., McGregor M., Papke R.L., Decker M.W., McIntosh J.M., Quik M. (2015) *Exp. Neurol.*, **263**, 277-284.
26. Gao H.M., Jiang J., Wilson B., Zhang W., Hong J.S., Liu B. (2002) *J. Neurochem.*, **81**, 1285-1297.
27. Yoshikawa H., Kurokawa M., Ozaki N., Nara K., Atou K., Takad E., Kamochi H., Suzuki N. (2006) *Clin. Exp. Immunol.*, **146**, 116-123.
28. Hu J., Zhu C., Liu Y., Wang F., Huang Z., Fan W., Wu J. (2011) *Neurosci. Lett.*, **494**, 232-236.
29. Ke L., Eisenhour C.M., Bencherif M., Lukas R.J. (1998) *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **286**, 825-840.
30. Huang L.Z., Winzer-Serhan U.H. (2006) *Brain Res.*, **1113**(1), 94-109.

Поступила: 04. 04. 2017.  
Принята к печати: 02. 05. 2017.

## POSSIBLE INVOLVEMENT OF NEURONAL NICOTINIC ACETYLCHOLINE RECEPTORS IN COMPENSATORY BRAIN MECHANISMS AT EARLY STAGES OF PARKINSON'S DISEASE

*E.V. Kryukova<sup>1</sup>, I.V. Shelukhina<sup>1</sup>, A.A. Kolacheva<sup>2</sup>, A.Kh. Alieva<sup>3</sup>, M.I. Shadrina<sup>3</sup>, P.A. Slominsky<sup>3</sup>, I.E. Kasheverov<sup>1</sup>, Y.N. Utkin<sup>1</sup>, M.V. Ugrumov<sup>2</sup>, V.I. Tsetlin<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, 16/10 Miklukho-Maklaya str., Moscow 117997, Russia, tel.: 8(495)330-7374; e-mail: evkr@mail.ru

<sup>2</sup>Koltsov Institute of Developmental Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia.

<sup>3</sup>Institute of Molecular Genetics, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

A role of nicotinic acetylcholine receptors (nAChR) in the development of Parkinson's disease (PD) has been investigated using two mouse models corresponding to the presymptomatic stage and the early symptomatic stage of PD. Quantitative determination of nAChR in the striatum and substantia nigra (SN) was performed using the radioactive derivatives of epibatidine,  $\alpha$ -conotoxin MII, and  $\alpha$ -bungarotoxin as ligands. The number of ligand-binding sites changed differently depending on their location in the brain, the stage of the disease and the receptor subtype. Epibatidine binding decreased in the striatum to 66% and 70% at the presymptomatic and early symptomatic stages, respectively, whereas in SN a 160% increase was registered at the presymptomatic stage. The  $\alpha$ -conotoxin MII binding on striatal dopaminergic axonal terminals at the presymptomatic stage decreased by 20% and at the symptomatic stage it demonstrated a further decrease. The increase in  $\alpha$ -bungarotoxin binding at the presymptomatic stage and a decrease at the early symptomatic stage was observed in the striatum. In SN, the level of  $\alpha$ -bungarotoxin binding decreased at the presymptomatic stage and kept constant at the symptomatic stage. The significant decrease in the expression of *Chrna4* and *Chrna6* genes encoding  $\alpha 4$  and  $\alpha 6$  nAChR subunits was observed in SN at the early symptomatic stage, while a 13-fold increase in expression of the *Chrna7* gene encoding the  $\alpha 7$  nAChR subunit was detected at the presymptomatic stage. The data obtained suggest possible involvement of nAChR in compensatory mechanisms at early PD stages.

**Key words:** nicotinic acetylcholine receptors, dopaminergic neuron, 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine, striatum, substantia nigra