

ЗМІНИ РІВНЯ ЕКСПРЕСІЇ ГЕНА ІНОЗИТОЛ-1,4,5-ТРИФОСФАТНИХ РЕЦЕПТОРІВ У НЕЙРОНАХ МОТОРНОЇ КОРИ ТА МОЗОЧКА ЩУРІВ З ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИМ ГЕМПАРКІНСОНІЗМОМ

Надійшла 1 березня 2014 р.

Незважаючи на величезний інтерес науковців до вивчення внутрішньоклітинної кальцієвої сигналізації і, зокрема, до механізмів її порушення при різних патологіях, на цей час накопичено відносно небагато відомостей про роль інозитол-1,4,5-трифосфатних рецепторів (IP_3R) у розвитку нейродегенеративних процесів. Метою нашої роботи було з'ясувати, чи відбуваються зміни в експресії IP_3R1 у нейронах в умовах експериментального паркінсонізму. У наших дослідах ми викликали одностороннє пошкодження дофамінергічних нейронів чорної субстанції щурів за допомогою стереотаксичної ін'єкції 6-гідроксидофаміну в лівий висхідний медіальний пучок переднього мозку (стан експериментального геміпаркінсонізму). Використовуючи метод полімеразної ланцюгової реакції в реальному часі, ми досліджували рівень експресії гена *itpr1*, який кодує субодиницю IP_3R типу 1, у нейронах мозочка та моторної кори в інтактних щурів та тварин з експериментальним геміпаркінсонізмом. В останніх спостерігався вищий рівень експресії гена *itpr1* у нейронах обох згаданих відділів мозку. Зокрема, в моторній корі експресія цього гена перевищувала таку у контрольних щурів більш ніж вдвічі, а в мозочку – майже на 30 %. Підвищений рівень експресії гена *itpr1* у нейронах головного мозку може бути однією з причин надмірного виходу Ca^{2+} з клітинних депо під час розвитку нейродегенеративних процесів.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: інозитол-1,4,5-трифосфатні рецептори, хвороба Паркінсона, експериментальний геміпаркінсонізм, рівень експресії гена.

ВСТУП

На сьогодні виключно актуальним є вивчення механізмів розвитку нейродегенеративних захворювань, які поки що залишаються невиліковними. Незважаючи на інтенсивний пошук причин розвитку таких хвороб, механізми нейродегенерації у відповідних умовах у багатьох випадках досі не з'ясовані. Стало очевидним, що атрофічні та дегенеративні процеси в нейронах звичайно супроводжуються змінами кальцієвого гомеостазу. Модуляція концентрації Ca^{2+} у цитоплазмі нервових клітин внаслідок його виходу з внутрішньоклітинних депо через інозитол-1,4,5-

трифосфатні рецептори (IP_3R) є істотним фактором, що лежить в основі численних фізіологічних процесів, включаючи нейропередачу та синаптичну пластичність [1–3], проліферацію і диференціацію клітин [4], експресію генів [5–9], загибель клітин [9–12] тощо. На сьогоднішній день показано прямий зв'язок між порушенням функціонування IP_3R типу 1 (IP_3R1) та розвитком хвороби Альцгеймера [13], хвороби Гантінгтона та деяких видів спіноцеребелярних атаксій [14, 15]. Можна припустити, що зміни в роботі цих рецепторів можуть бути задіяні також у розвитку хвороби Паркінсона.

Метою нашої роботи було визначити, чи відбуваються зміни в рівні експресії IP_3R , які містяться в нейронах кори головного мозку та мозочка щурів, при експериментальному геміпаркінсонізмі.

¹ Інститут фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України, Київ (Україна).

² Державна ключова лабораторія молекулярної та клітинної біології, Київ (Україна).

Ел. пошта: olena.fedorenko@biph.kiev.ua (О. А. Федоренко).

МЕТОДИКА

Індуція експериментального геміпаркінсонізму. Робота була виконана на щурах лінії Вістар. Однобічну дегенерацію дофамінергічних нейронів чорної субстанції викликали за допомогою стереотаксичного введення 8 мкг 6-гідроксидофаміну в лівий медіальний пучок переднього мозку. Операцію проводили під нембуталовим наркозом (50 мг/кг, внутрішньоочередивно – в. о.). За 30 хв до ін'єкції нейротоксину виконували премедикацію, вводячи інгібітор монооксидази паргілін (40 мг/кг, в. о.) та дезіпрамін (25 мг/кг, в. о.); останній інгібує захоплення 6-гідроксидофаміну норадренергічними клітинами.

Для визначення ступеня дегенерації нігрозіатної дофамінергічної системи лівої півкулі через тиждень після введення нейротоксину у тварин досліджували поведінкову асиметрію, викликану системним уведенням агоніста дофамінових рецепторів апоморфіну (0.5 мг/кг, в. о.). Виникнення у щурів у відповідь на ін'єкцію дофаміноміметика мимовільних обертальних рухів у правий бік з частотою більше 6 хв⁻¹ свідчило про загибель у них більше 90 % дофамінсинтезуючих клітин чорної субстанції зліва [16]. Таких тварин залучали до подальших експериментів. Дана модель є загальновідомою, широко використовується і визнана цілком адекватною для використання в дослідженнях хвороби Паркінсона [17–19].

Полімеразна ланцюгова реакція в реальному часі (РЧ-ПЛР). Дослідження було проведено за допомогою набору для РЧ-ПЛР з SYBR Green I та пасивним референтним барвником ROX („Синтол”, РФ), а також специфічних праймерів до *itpr1* щура з наступною послідовністю:

ITPR1S 5'- CCACTGCAACTGGTTGATGC-3',
ITPR1A 5'- GTCTCTACGAGCAGCGTTGC-3'.

Праймери були підібрані до фрагмента гена *itpr1* щура (номер гена в базі даних NCBI-X00336) у програмі „Vector NTI” і перевірені на унікальність у програмі онлайн „BLAST”. Кожен зразок був проаналізований тричі. Склад реакційної суміші був приготований за протоколом виробника. Умови реакції були наступні: початкова денатурація – 4 хв при 94 °С, денатурація в циклах – 10 с при 94 °С, відпалювання праймерів – 30 с при 54 °С, полімеризація – 15 с при 72 °С. Для перевірки наявності неспецифічних продуктів ампліфікації в продукті РЧ-ПЛР було проведено його плавлення в інтервалі температур 50–95 °С з кроком підйому

температури 0.5 °С та експозицією при температурі на кожному рівні впродовж 30 с. Довжину отриманого продукту перевіряли за допомогою електрофорузу в 2 %-вому агарозному гелі.

Для побудови стандартної кривої для результатів РЧ-ПЛР ми використовували серійне розведення клонованого фрагмента гена *itpr1* у векторі pUC19 з кінцевою концентрацією 1, 0.1, 0.01 та 0.001 пг у розрахунку на вставку.

Зміни рівня експресії гена *itpr1* представлено нижче як відношення рівня експресії гена *itpr1* до рівня експресії гена *gapdh* (гена ферменту гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогенази, який відомий та широко використовується як «ген домашнього господарства»).

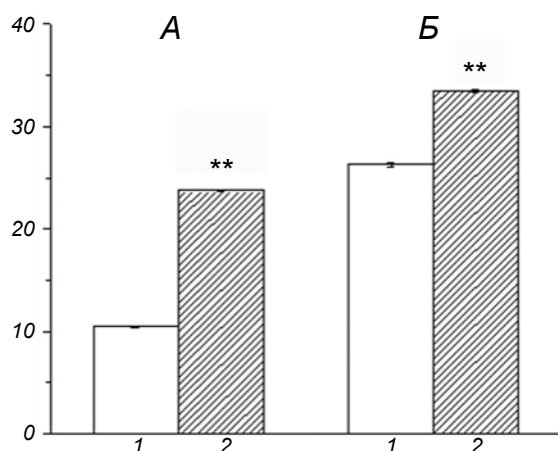
РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

У своїх дослідженнях ми визначили рівень експресії гена *itpr1* у нейронах моторної ділянки кори головного мозку та мозочка контрольних щурів та тварин з експериментальним геміпаркінсонізмом.

Нещодавно було показано, що у тварин після однобічного стереотаксичного введення 6-ГОДА в нейронах моторної кори концентрація інозитол-1,4,5-трифосфату (IP₃) значно збільшується [20]. Таким чином, наш вибір нейронів кори великих півкуль головного мозку для використання в дослідженнях оснований на припущенні, що збільшення концентрації IP₃ може спричинити зміни у властивостях IP₃R або змінити рівень їх експресії.

Отримані нами результати підтвердили це припущення. Було встановлено, що відношення рівнів експресії генів *itpr1* та *gapdh* у зразках, отриманих від інтактних тварин, дорівнювало в середньому 10.47, а в зразках, отриманих від щурів після введення 6-ГОДА, – 23.75. Отже, у щурів з експериментальним геміпаркінсонізмом рівень експресії гена *itpr1* у моторній корі відповідав 227 % такого в контролі (див. рисунок).

Крім того, ми досліджували рівень експресії гена *itpr1* у мозочку. Відомо, що для нейронів Пуркін'є кори мозочка є характерним найбільший рівень експресії IP₃Rs, з яких 98 % відносяться до типу 1 [21]. Згідно з нашими результатами, у щурів з експериментальним геміпаркінсонізмом відношення експресії генів *itpr1/gapdh* становило в середньому 33.47, у той час як у інтактних тварин – 26.29. Таким чином, у щурів із 6-ГОДА-індукованим експе-



Діаграма відношень рівня експресії гена *itpr1* до рівня експресії гена *gapdh* у нейронах моторної кори великих півкуль головного мозку (А) і мозочка (Б) інтактних шурів (1) та тварин із 6-ГОДА-індукованим геміпаркінсонізмом (2).

** $P < 0.01$.

риментальним паркінсонізмом експресія гена *itpr1* є на 27 % вищою, ніж у контрольних тварин (див. рисунок).

Отже, отримані нами дані вказують на те, що при паркінсонізмі рівень експресії гена *itpr1* у нейронах структур головного мозку є значно вищим, ніж у інтактних шурів. Це може бути однією з причин надмірного виходу Ca^{2+} з клітинних депо під час розвитку нейродегенеративних процесів у нейронах. Проте, очевидно, що дані висновки потребують підтвердження за допомогою інших методів. Наразі тривають дослідження з використанням методів імуногістохімії, спрямовані на визначення того, чи відбувається також збільшення числа молекул вказаного рецептора. Адже зміни в рівні експресії генів не завжди забезпечують паралельне збільшення продукування відповідного білка в клітині.

Дослідження механізмів регуляції активності IP_3R при паркінсонізмі є зараз дуже важливими та актуальними. З практичної точки зору IP_3R можуть стати новою мішенню для фармакологічних впливів під час розробки препаратів для попередження або лікування нейродегенеративних захворювань, зокрема хвороби Паркінсона.

Робота виконана при підтримці Державної ключової лабораторії молекулярної та клітинної біології (грант ДФД F 46.2/001) та НАН України (грант на підтримку проектів науково-дослідних робіт молодих учених НАН України).

Дослідження виконували відповідно до положень Міжнародної конвенції із захисту тварин, які використовуються

в експериментах (Страсбург, 1985), а також положень Комітету з біоетики Державної ключової лабораторії молекулярної та клітинної біології.

Автори даної роботи – О. А. Федоренко, С. М. Мамонтов, О. А. Котик та С. А. Таланов – засвідчують відсутність у них конфлікту інтересів.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. M. J. Berridge, "Neuronal calcium signalling," *Neuron*, **21**, No. 1, 13-26 (1998).
2. C. P. Bengtson and H. Bading, "Nuclear calcium signaling," *Adv. Exp. Med. Biol.*, **970**, 377-405 (2012).
3. K. D. Baker, T. M. Edwards, and N. S. Rickard, "The role of intracellular calcium stores in synaptic plasticity and memory consolidation," *Neurosci. Biobehav. Rev.*, **37**, No. 7, 1211-1239 (2013).
4. M. J. Berridge, "Inositol trisphosphate and calcium signalling mechanisms," *Biochim. Biophys. Acta.*, **1793**, No. 6, 933-940 (2009).
5. H. Bading, "Transcription-dependent neuronal plasticity: the nuclear calcium hypothesis," *Eur. J. Biochem.*, **267**, No. 17, 5280-5283 (2000).
6. P. L. Greer and M. E. Greenberg, "From synapse to nucleus: calcium-dependent gene transcription in the control of synapse development and function," *Neuron*, **59**, No. 6, 846-860 (2008).
7. A. B. Parekh and S. Muallem, " Ca^{2+} signalling and gene regulation," *Cell Calcium*, **49**, No. 5, 279 (2011).
8. J. S. Wiegert and H. Bading, "Activity-dependent calcium signaling and ERK-MAP kinases in neurons: a link to structural plasticity of the nucleus and gene transcription regulation," *Cell Calcium*, **49**, No. 5, 296-305 (2011).
9. A. Verkhratsky and O. H. Petersen, "The endoplasmic reticulum as an integrating signalling organelle: from neuronal signalling to neuronal death," *Eur. J. Pharmacol.*, **447**, Nos. 2/3, 141-154 (2002).
10. P. Pinton, C. Giorgi, R. Siviero, et al., "Calcium and apoptosis: ER-mitochondria Ca^{2+} transfer in the control of apoptosis," *Oncogene*, **27**, No. 50, 6407-6418 (2008).
11. J. P. Decuyper, G. Monaco, G. Bultynck, et al., "The IP_3 receptor-mitochondria connection in apoptosis and autophagy," *Biochim. Biophys. Acta*, **1813**, No. 5, 1003-1013 (2011).
12. Y. Yuan, C. Y. Jiang, H. Xu, et al., "Cadmium-induced apoptosis in primary rat cerebral cortical neurons culture is mediated by a calcium signaling pathway," *PLoS One*, **8**, No. 5, 330 (2013).
13. C. Supnet and I. Bezprozvanny, "The dysregulation of intracellular calcium in Alzheimer disease," *Cell Calcium*, **47**, No. 2, 183-189 (2010).
14. I. Bezprozvanny, "Role of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors in pathogenesis of Huntington's disease and spinocerebellar ataxias," *Neurochem. Res.*, **36**, No. 7, 1186-1197 (2011).
15. O. A. Fedorenko, E. Popugaeva, M. Enomoto, et al., "Intracellular calcium channels: Inositol-1,4,5-trisphosphate receptors," *Eur. J. Pharmacol.*, **99**, No. 13, 902-923 (2013).
16. D. Kirik, C. Rosenblad, and A. Björklund, "Characterization

- of behavioral and neurodegenerative changes following partial lesions of the nigrostriatal dopamine system induced by intrastriatal 6-hydroxydopamine in the rat,” *Exp. Neurol.*, **152**, 259-277 (1998).
17. S. A. Talanov, N. N. Oleshko, M. N. Tkachenko, and V. F. Sagach, “Pharmacoprotective influences on different links of the mechanism underlying 6-hydroxydopamine-induced degeneration of nigrostriatal dopaminergic neurons,” *Neurophysiology*, **38**, 128-133 (2006).
 18. U. Ungerstedt, “Adipsia and aphagia after 6-hydroxydopamine induced degeneration of the nigro-striatal dopamine system,” *Acta Physiol. Scand.*, **367**, 95-122 (1997).
 19. V. A. Maisky, N. N. Oleshko, O. V. Bazilyuk, et al., “Fos and nitric oxide synthase in rat brain with chronic mesostriatal dopamine deficiency: effects of nitroglycerin and hypoxia,” *Parkinsonism Relat. Disord.*, **8**, No. 4, 261-270 (2002).
 20. M. S. Nandhu, J. Paul, K. P. Kuruvilla, et al., “Enhanced glutamate, IP3 and cAMP activity in the cerebral cortex of unilateral 6-hydroxydopamine induced Parkinson’s rats: effect of 5-HT, GABA and bone marrow cell supplementation,” *J. Biomed. Sci.*, **18**, No. 5, 23-27 (2011).
 21. C. W. Taylor, A. A. Genazzani, and S. A. Morris, “Expression of inositol trisphosphate receptors,” *Cell Calcium*, **26**, No. 6, 237-251 (1999).