

С.О. Таланов, В.Ф. Сагач, М.М. Олешко, В.О. Майський

## Попередження апоптозу дофамінергічних нейронів середнього мозку інгібіторами мітохондріальної пори

*Исследована роль апоптоза в развитии дегенерации дофаминергических нейронов компактной части черной субстанции и вентрального поля покрышки под действием нейротоксина б-гидроксиамина. Обнаружено, что интервальная гипоксическая тренировка или антиоксиданты тролокс и мелатонин, ингибирующие открывание митохондриальных пор, значительно предотвращают индуцированную нейротоксином апоптотическую гибель дофаминсинтезирующих клеток среднего мозга. Предполагается важное значение открывания мегаканалов митохондриальной мембраны в запуске процесса апоптоза дофаминергических нейронов и, как следствие, возникновение дефицита мезостриатного дофамина, что характерно для болезни Паркинсона.*

### ВСТУП

Апоптоз є фізіологічною загибеллю клітин, що виникає в багатоклітинних організмах, щоб реконструювати тканини під час розвитку, підтримувати тканинний гомеостаз, ліквідувати старіючі або інфіковані вірусами клітини, та клітини з ушкодженням геному. З іншого боку, апоптоз при перевищенні його швидкості над процесом репарації може призвести до розвитку різних захворювань, у тому числі нейродегенеративних. Прикладом надмірної активації механізмів апоптозу клітин нервової тканини може бути розвиток хвороби Паркінсона (ХП) [18, 23, 24].

При імуногістохімічних дослідженнях мозку померлих людей з ХП у хвостатих ядрах був виявлений білок  $\alpha$ -синуклеїн [18], який бере участь у регуляції апоптозу та є його своєрідним маркером [16]. Гістохімічні дослідження виявляють ознаки апоптозу нігральних нейронів на ранніх стадіях ХП у більшості випадків [23, 24], що дозволяє вважати його основним механізмом загибелі дофамінергічних нейронів компактної

частини чорної субстанції (SNC) і вентрального поля покрийки (VTA) середнього мозку. У людей з ХП також знайдено нігральні нейрони з ознаками характерної для апоптозу фрагментації ДНК, яких не виявлено у осіб без цього захворювання. При ХП апоптотичні ядра знаходять у SNC у 2 % випадків, в той час як при фізіологічному старінні лише в 0,2 %.

Роль апоптозу в загибелі нігростриатних дофамінергічних нейронів показано в дослідах з моделюванням селективної нейродегенерації за допомогою 6-гідроксиамина (6-ГОДА) [30] і з введенням його у нейрональну культуру [8,12]. Під впливом 6-ГОДА в нейронах виникає фрагментація ДНК і розвивається набряк клітин. Загибель клітин у SNC під дією цього нейротоксину відбувається за типом апоптозу [9], що подібно до нейрональної їх загибелі при ХП. Оскільки 6-ГОДА був знайдений у мозку [10] і в сечі [5] пацієнтів з ХП, цей нейротоксин, що утворюється за допомогою аутооксидації церебрального дофаміну, можливо розглядати як ендогенний нейротоксичний фактор, який може мати

патогенетичне значення в розвитку захворювання.

Ключову роль у процесі апоптозу відіграють мітохондрії, у мембранах яких під дією вільних радикалів кисню або іонів кальцію відкриваються так звані мегаканали або пори (permeability transition pore) з перехідною проникністю для сполук масою до 1500 Да. Дисфункція мітохондрій може бути наслідком підвищеної чутливості мітохондріальної пори (МП) до індукторів її відкриття, що за умов оксидативного стресу або навантаження внутрішньоклітинним кальцієм призводить до загибелі клітин [14, 15]. Через пори з міжмембранного простору мітохондрій у цитозоль виходять такі сигнальні речовини, як кальцій і цитохром *c* [20], які активують каспази і запускають каскад реакцій, що і призводить до загибелі клітин.

Метою нашої роботи було встановити участь апоптозу в загибелі дофамінергічних нейронів середнього мозку у щурів і вивчити можливість попередження індукованого 6-ГОДА апоптозу цих клітин через інгібування відкриття МП за допомогою відомих антиоксидантів або інтервального гіпоксичного тренування (ІГТ).

## МЕТОДИКА

Експерименти проводили на 4-місячних щурах-самцях лінії Вістар-Кіото масою 200–250 г. Було використано 7 груп тварин. Щурам першої (контрольної) групи (n=197) однобічне руйнування дофамінергічних нейронів висхідної системи мозку викликали за допомогою ін'єкції 8 мкг 6-ГОДА ("Sigma", США), розчиненого у 4 мкл фізіологічного розчину з додаванням 0,1 % аскорбінової кислоти, яка гальмує окиснення нейротоксину. Мікроін'єкції 6-ГОДА робили у лівий латеральний висхідний пучок переднього мозку за координатами: А – 2,2, L + 1,5, V – 8,0 [27]. Щоб забезпечити високоефективну дію 6-ГОДА, за 25–30

хв до його ін'єкції проводили премедикацію тварин інгібітором моноамінооксидази паргліном ("Sigma", США, 40 мг/кг, внутрішньоочередивно) і блокатором захоплення нейротоксину норадренергічними нейронами дезипраміном ("Sigma", США, 25 мг/кг, внутрішньоочередивно). Операцію проводили під нембуталовим наркозом (45 мг/кг, внутрішньоочередивно). Через тиждень після однобічного введення 6-ГОДА вивчали поведінкові реакції тварин на ін'єкцію дофаміноміметика апоморфіну (Апо, "Sigma", США, 0,5 мг/кг, внутрішньоочередивно). Це було непрямим тестом на ступінь дегенерації дофамінергічних нейронів середнього мозку. Раніше нами було встановлено, що інтенсивні циркуляторні рухи у відповідь на введення Апо у бік, протилежний "оперованій" півкулі з інтенсивністю більше ніж 180 об за 30 хв свідчать про зменшення кількості дофамінергічних нейронів у SNC і VTA лівої півкулі в середньому на 96,6 і 92,1 % відповідно; у щурів з погано вираженими циркуляціями – на 84,0 і 82,1 % відповідно; у тварин без рухової асиметрії зменшення числа нігральних дофамінергічних клітин у SNC і VTA лівої півкулі обмежується в середньому 44,0 і 38,2 % відповідно [21].

Частину щурів контрольної групи (n=10) використовували у мікроскопічних дослідженнях. Для цього тварини були наркотизовані, головний мозок фіксували у нейтральному формаліні протягом 10 діб. Середній мозок піддавали кріопротекції у розчині сахарози (30 %) протягом 48 год. Зрізи виготовляли на заморожувальному мікротомі (50 мкм завтовшки) та фарбували у 0,5 %-му розчині крезил-віолету (рН 5,0). Частину виготовлених зрізів без подальшого фарбування занурювали у толуол і накривали покрівними скельцями у нелюмінесціюючу смолу (епон-812) для подальшого вивчення під люмінесцентним мікроскопом у блакитно-фіолетовому світлі (фільтр ФС-1).

Тваринам другої групи (n=25) за 10 хв до і через 4 год після введення 6-ГОДА робили ін'єкції водорозчинного вітаміну Е (тролоксу; "Sigma", США, 10 і 5 мг/кг відповідно, внутрішньоочеревинно). Щурам третьої групи (n=35) тролокс (10 мг/кг) вводили *per os* за 40 хв до ін'єкції нейротоксину. Щурам четвертої групи (n=10) за 10 хв до ін'єкції 6-ГОДА вводили мелатонін ("Sigma", США, 10 мг/кг, внутрішньоочеревинно).

Тварин п'ятої групи (n=7) перед ін'єкціями 6-ГОДА протягом місяця піддавали ІГТ (прекондиціонування), яке проводили у нормобаричних умовах за допомогою вентиляції камери гіпоксичною сумішшю (12 % O<sub>2</sub> в N<sub>2</sub>, 5 разів по 15 хв з інтервалом у 15 хв щодобово). Щурів шостої групи (n=12) піддавали ІГТ за такою самою схемою протягом трьох наступних після введення 6-ГОДА діб (посткондиціонування). Тварини сьомої групи (n=16) підлягали як гіпоксичному preconditionуванню протягом 30 діб, так і посткондиціуванню впродовж 3 діб.

Статистичну обробку проводили з використанням критеріїв  $\chi^2$  і t Стьюдента.

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

На зрізах мозку щурів з односторонньою мікроін'єкцією 6-ГОДА у SNC і VTA не встановлено характерного для некрозу сполучнотканного заміщення на місці дофамінергічних нейронів, які загинули. Реєструвалася пофарбована крезил-віолетом лише невелика кількість нейронів (не більше ніж 5 %), головним чином у межах SNC і VTA. Виразно спостерігалась активація глії в медіальній частині середнього мозку. Висока щільність інтенсивно забарвлених гліальних ядер спостерігалась у межах SNC і VTA на боці ін'єкції нейротоксину. На рис. 1 представлено люмінесценцію ліпофусцину (пігменту виснаження) у апоптотичних тільцях. Усе це свідчить про те, що дегенерація дофамінергічних клітин під дією 6-ГОДА відбувається через апоптоз.

У щурів першої (контрольної) групи у відповідь на введення Апо інтенсивні циркуляторні рухи у бік, протилежний ін'єкціям 6-ГОДА, з частотою більшою ніж 180 об протягом 30 хв після ін'єкції дофаміноміметика відбувались у 42,6 % тварин. У 3,6 % тварин поведінкова асиметрія у відповідь на дію дофаміноміметика була незначною, а в 53,8 % щурів – не спостерігалась взагалі.

У другій серії досліджень – введення тролоксу, відомого антиоксиданта й інгібітора відкривання МП – лише у 8,0 % щурів (P<0,01, рис. 2) спостерігалась поведінкова асиметрія, індукована Апо. І навіть у щурів, яким вводили цей антиоксидант *per os* (третья група), число тварин зі значним пошкодженням мезостріатної дофамінергічної системи нейротоксином становило лише 17,1 % (P<0,05). Попереднє введення іншого інгібітора МП – мелатоніну також суттєво попереджало загибель дофамінергічних клітин у середньому мозку. Жодна тварина четвертої групи не відповідала циркуляторними рухами на ін'єкцію Апо (P<0,01).

Таким чином, експерименти з тролоксом і мелатоніном показали суттєву протек-

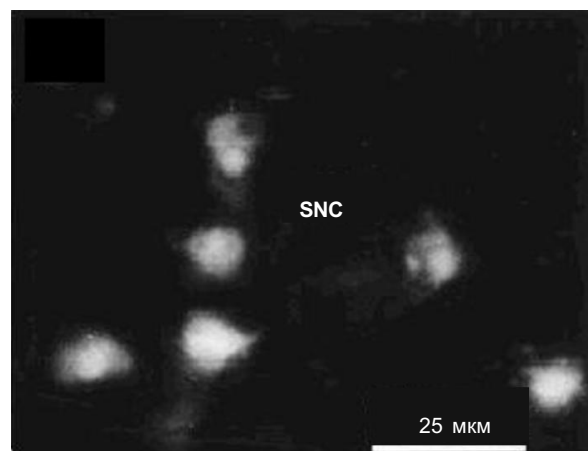


Рис. 1. Зразок зрізу середнього мозку щура з одностороннім введенням нейротоксину 6-гідроксидофаміну в люмінесцентному мікроскопі. SNC – чорна субстанція (компактна частина)

торну дію антиоксидантів, які пригнічують відкривання МП [4, 32], на розвиток апоптозу дофамінергічних нейронів середнього мозку, викликаного дією 6-ГОДА.

Як відомо, механізм патогенної дії 6-ГОДА пов'язують з продуктами його окиснення в нейроплазмі дофамінергічних нейронів. У результаті окиснення цього нейротоксину утворюються ендogenousні токсичні продукти і реактивні форми кисню. 6-ГОДА викликає апоптоз клітин у зв'язку з індукцією вільнорадикального окиснення [24]. Мітохондрії є одночасно сенсорами і регуляторами кисневого обміну живої клітини, генераторами вільних радикалів і мішенями їх руйнівної дії. Вільним радикалам належить основна роль у розвитку апоптозу. Вони є головними тригерами відкривання МП [32], мають безпосередній вплив на чутливість протеїнів МП до її індукторів [19]. У свою чергу відомо, що антиоксиданти здатні попереджати загибель клітин, яка викликається дією різних токсинів на білки МП [26]. Вітамін Е та його розчинний аналог тролокс також виявляють протекторну дію при ішемічно-реперфузійних ушкодженнях міокарда, впливаючи на структури МП [29]. Показано безпосередній вплив на МП тролоксу [32] і мелатоніну [4]. Також встановлено пригнічувальний вплив цих антиоксидантів

на відкривання пори ізольованих мітохондрій міокарда, індуковане феніларсиноксидом, а також за умов моделювання оксидативного стресу [29].

Нами встановлено, що попереднє протягом місяця ІГТ не знижувало рівень дегенерації дофамінергічних нейронів, викликаній 6-ГОДА. У п'ятій групі 42,9 % тварин ( $P > 0,05$ , див. рис. 2) інтенсивно обертались у відповідь на системне введення Апо. В той час як наступне після введення 6-ГОДА протягом 3 діб ІГТ (шоста група) вірогідно зменшувало число тварин, які відповідали на ін'єкцію агоніста дофамінових рецепторів інтенсивними циркуляторними рухами (до 8,3 %;  $P < 0,05$ ). У сьомій групі щурів з гіпоксичним пре- і посткондиціонуванням жодна тварина ( $P < 0,001$ ) не відповідала ротаційними рухами на введення дофаміноміметика. Такі результати експериментів свідчать про те, що ІГТ здатне ефективно попереджати апоптоз дофамінергічних клітин у SNC і VTA, індукований 6-ГОДА. Слід зазначити, що найбільшу протекторну дію чинить ІГТ після введення нейротоксину (посткондиціонування).

Відомо, що гіпоксічне тренування позитивно впливає на процеси антиоксидантного захисту [3], збільшуючи активність ферментної антиоксидантної системи [1], при-

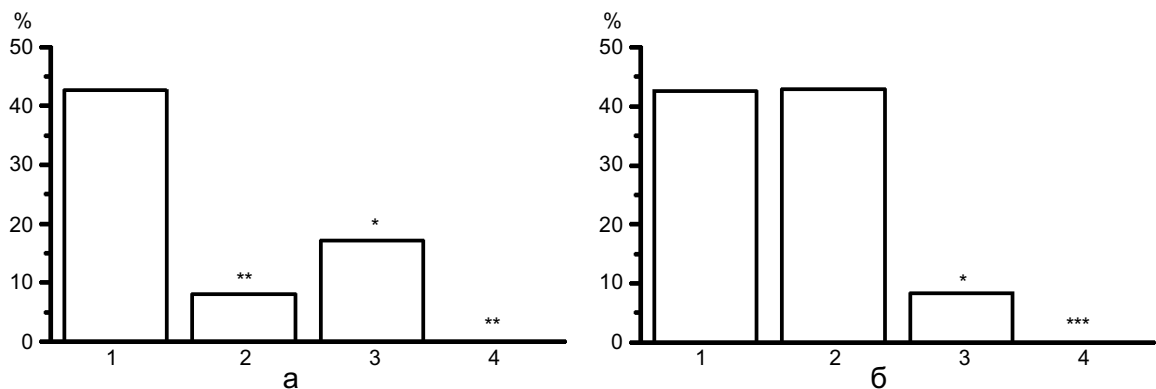


Рис. 2. Відносна кількість тварин з суттєвою, більше ніж 90 %, дегенерацією дофамінергічної системи, викликаній 6-гідроксидофаміном: а – протекторна дія антиоксидантів: 1 – контроль; 2 – тролокс внутрішньоочеревинно; 3 – тролокс per os; 4 – мелатонін; б – протекторна дія інтервального гіпоксичного тренування: 1 – контроль; 2 – прекоондиціонування; 3 – посткондиціонування; 4 – комбіноване пре- і посткондиціонування. \*  $P < 0,05$ ; \*\*  $P < 0,01$ ; \*\*\*  $P < 0,001$  відносно контролю

чому ІГТ має більш значний і довготривалий ефект, ніж хронічна гіпоксія [28]. Гіпоксичне прекодиціювання збільшує час, необхідний для відкриття МП [15], що відіграє певну роль у протекторній дії прекодиціювання [6]. Встановлено також, що гіпоксичне посткодиціювання має гальмівний вплив на відкриття МП і, таким чином, може бути використане для протидії різним ушкоджуючим факторам [6, 13]. ІГТ істотно знижує навантаження клітини кальцієм [30], що є одним із факторів пригнічення відкриття МП і зменшення пошкодження тканин *in vivo* [14].

Таким чином, отриманні нами результати свідчать про те, що моделювання геміпаркінсонізму за допомогою однобічного введення в латеральний висхідний пучок переднього мозку природного метаболіту дофаміну 6-ГОДА [5, 10], призводить до апоптотичної загибелі дофамінергічних нейронів середнього мозку. Апоптоз зазначених нейронів попереджають такі інгібітори МП, як тролокс, мелатонін, гіпоксичне пре- і посткодиціювання. Протекторний вплив серед зазначених інгібіторів МП на розвиток нейродегенерації був найбільш вираженим при застосуванні мелатоніну та комбінованого гіпоксичного пре- і посткодиціювання. Ймовірно, що наведені підходи до захисту дофамінсинтезувальних клітин середнього мозку можуть бути використані при лікуванні ХП на ранній стадії її розвитку.

**S.A. Talanov, V.F. Sagach, N.N. Oleshko,  
V.A. Maisky**

**INHIBITORS OF MITOCHONDRIAL PERMEABILITY TRANSITION PORE TAKE PART IN PREVENTION OF APOPTOSIS OF DOPAMINERGIC NEURONS IN THE MESENCEPHALON IN RAT**

In the study the role of apoptosis in development of dopaminergic neuronal cell death within substantia nigra (parts compacta) and ventral tegmental area induced by 6-OHDA was investigated. It was found that intermittent hypoxia and the water-soluble vitamine E (Trolox) and melatonin, as antioxidants and inhibitors of mitochondrial permeability transi-

tion pore protect dopaminergic cells from cytotoxic effect of 6-OHDA. It is supposed that mitochondrial permeability transition pore plays an important role in apoptosis of neurons in the brain.

*O.O. Bogomoletz Institute of Physiology, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv*

**СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ**

1. Ельчанина С.А., Смагина И.В., Кореньяк Н.А., Варшавский Б.Я. Влияние интервальной гипоксической тренировки на процессы перекисного окисления липидов и активность антиоксидантных ферментов // Физиология человека. – 2003. – 29, № 3. – С. 72–75.
2. Сагач В.Ф., Вавилова Г.Л., Струтинська Н.А., Аकोпова О.В. Вплив індукторів та інгібіторів мітохондріальної пори на її утворення та на вивільнення неідентифікованого мітохондріального фактора // Фізіол. журн. – 2003. – 49, № 1. – С. 3–12.
3. Серебровська Т.В., Кургалюк Н.М., Носар В.І., Колеснікова С.Е. Вплив інтервальних гіпоксичних подразнень та екзогенного оксиду азоту на процеси енергозабезпечення та ліпопероксидації у печінці щурів за умов гострої гіпоксії // Там же. – 2001. – 47, № 1. – С. 85–92.
4. Andrabi S.A., Sayeed I., Siemen D. et al. Direct inhibition of the mitochondrial permeability transition pore: a possible mechanism responsible for anti-apoptotic effects of melatonin // FASEB J. – 2004. – 18, № 7. – P. 869–871.
5. Andrew R., Watson D.G., Best S.A. et al. The determination of hydroxydopamines and other trace amines in the urine of parkinsonian patients and normal controls // Neurochem. Res. – 1993. – 18. – P. 1175–1177.
6. Argaud L., Gateau-Roesch O., Muntean D. et al. Specific inhibition of the mitochondrial permeability transition prevents lethal reperfusion injury // J. Mol. Cell. Cardiol. – 2005. – № 38. – P. 367–374.
7. Argaud L., Gateau-Roesch O., Raisky O. et al. Postconditioning inhibits mitochondrial permeability transition // Circulation. – 2005. – 111. – P. 194–197.
8. Burke R., Kholodilov N.C. Programmed cell death: does it play a role in Parkinson's disease? // Ann. Neurol. – 1998. – 44. – S. 126–133.
9. Choi W.S., Yoon Oh T.H. Two distinct mechanisms involved in 6-hydroxydopamine and MPP<sup>+</sup>-induced dopaminergic neuronal cell death: role of caspases, ROS, and JNK // J. Neurosci. Res. – 1999. – 57. – P. 86–94.
10. Curtius H.C., Wolfensberger M., Steinmann B. et al. Mass fragmentography of dopamine and 6-hydroxydopamine. Application to the determination of dopamine in human brain biopsies from the caudate nucleus // J. Chromatogr. – 1974. – 99. – P. 529–540.
11. Estus S., Tucker H.M., van Rooyen C. Aggregated amyloid beta protein induces cortical neuronal

- apoptosis and concomitant "apoptotic" pattern of gene indication // J. Neurosci. – 1997. – **17**. – P. 7736–7745.
12. Fall C.P., Bennet J. P. Jr. Characterization and time course of MPP<sup>+</sup>-induced apoptosis in human SH-SY5Y neuroblastoma cells // J. Neurosci. Res. – 1999. – **55**. – P. 620–628.
  13. Feng J., Lucchinetti E., Ahuja P. et al. Isoflurane postconditioning prevents opening of the mitochondrial permeability transition pore through inhibition of glycogen synthase kinase 3 beta // Anesthesiology. – 2005. – **103**. – P. 987–995.
  14. Halestrap A.P., Clarke S.J., Javadov S.A. Mitochondrial permeability transition pore opening during myocardial reperfusion – a target for cardioprotection // Cardiovasc. Res. – 2004. – **61**. – P. 372–385.
  15. Hausenloy D.J., Yellon D.M., Mani-Babu S., Duchon M.R. Precondition protects by inhibiting the mitochondrial permeability transition // Amer. J. Physiol. Heart. Circulat. Physiol. – 2004. – **287**, № 2. – P. H841–H849.
  16. Kholodilov N.G., Neustat M. Increased expression synuklein 1 protein in a model induced apoptotic death in substantia nigra // Amer. Acad. Neurol. 50<sup>th</sup> ann. Meeting program. A Suppl. to Neurol. official publication of Amer. Acad. Neurol. – Minneapolis, MN., april 25 – may 2. – 1998. Minneapolis, 1998. – P. 2–35.
  17. Kramer P.J., Caldwell J., Hoffman A. et al. Neurotoxicity risk assessment of MPTP (N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine) as a synthetic impurity of drugs // Hum. Exp. Toxicology. – 1998. – **17**. – P. 283–293.
  18. Langston J.M., Sastri S., Chan P. Novel alpha-sinuklein-immunoreactive proteins in brain samples from the Contursi kindred, Parkinson's, and Alzheimer's disease // Exp. Neurol. – 1998. – **154**. – P. 684–690.
  19. Leeuwenburg C., Phaneuf S. Cytochrom c release from mitochondria in the aging heart: a possible mechanism for apoptosis with age // Amer. J. Physiol. Reg. Int. Comp. Physiol. – 2002. – **282**. – P. R423–R430.
  20. Liu X., Kim C.M., Yang J. et al. Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for ATP and cytochrome C // Cell. – 1996. – **86**. – P. 147–157.
  21. Maisky V.A., Oleshko N.N., Bazilyuk O.V., et al. Fos and nitric oxide synthase in rat brain with chronic mesostriatal dopamine deficiency: effect of nitroglycerin and hypoxia // Parkinsonism & Relat. Disord.. – 2002. – **8**. – P. 261–270.
  22. Merad-Boudia M., Nicole A., Santiard Baron D., et al. Mitochondrial impairment as an early event in the process of apoptosis induced by glutathione depletion in neuronal cells: relevance to the Parkinson's disease // Biochem. Pharmacol. – 1998. – **56**. – P. 645–655.
  23. Moshizuki H., Goto G., Mori H., Mizuno Y. Histochemical detection of apoptosis in Parkinson's disease // J. Neurol. Sci. – 1996. – **120**. – P. 120–123.
  24. Moshizuki H., Mori H., Mizuno Y. Apoptosis in neurodegenerative disorders // J. Neurol. Transm. Suppl. – 1997. – **50**. – P. 125–240.
  25. Ozava T., Hayakawa M., Katsumata K. Fragile mitochondrial DNA: the missing link in the apoptotic neuronal death in Parkinson's disease // Biochem. Biophys. Res. Comm. – 1997. – **235**. – P. 158–161.
  26. Park T.H., Known O.S., Park S.Y. et al. N-methylated beta-carolines protect PC12 cells from cytotoxic effect of MPP<sup>+</sup> by attenuation of mitochondrial membrane permeability change // Neurosci. Res. – 2003. – **46**, № 3. – P. 349–358.
  27. Pellegrino L.J., Pellegrino A.S., Cushman A.J. Stereotaxic atlas of the rat brain // New York: Plenum press, 1979.
  28. Prabhakar N.R., Kumar G.K. Oxidative stress in the systemic and cellular responses to intermittent hypoxia // Biol. Chem. – 2004. – **385**, N 3-4. – P. 217–221.
  29. Sagach V.F., Scrosati M., Fielding J. et al. The water-soluble vitamin E analogue Trolox protects against ischaemia/reperfusion damage in vitro and ex vivo. A comparison with vitamin E // Pharmacol. Res. – 2002. – **45**. – P. 435–439.
  30. Tatton W.G., Chalmers-Redman R.M., Ju W.Y. et al. Apoptosis in neurodegenerative disorders: potential for therapy by modifying gene transcription // J. Neural Transm. – 1997. – **49**. – P. 245–268.
  31. Willner U., Kornhuber J., Weller M. Cell death and apoptosis regulating proteins in Parkinson's disease // Acta Neuropathol. (Berl.) – 1999. – **97**. – P. 408–412.
  32. Zorov D.B., Filburn C.R., Klotz L.O. et al. Reactive oxygen species (ROS)-induced ROS release: a new phenomenon accompanying induction of the mitochondrial permeability transition in cardiac myocytes // J. Exp. Med. – 2000. – **192**, № 7. – P. 1001–1014.
  33. Zhu H.F., Dong J.W., Zhu W.Z. et al. ATP-dependent potassium channels involved in the cardiac protection induced by intermittent hypoxia against ischemia/reperfusion injury // Life Sci. – 2003. – **73**. – P. 1275–1287.