

Гормони тимуса, антиоксидантні ферменти та нейрогенез у нюховій цибулині щурів при паркінсонізмі: вплив мелатоніну

¹І.Ф. Лабунець, ²С.О.Таланов, ¹Р.Г. Васильєв, ¹А.Є. Родніченко, ¹Н.О. Утко, ¹І.А. Кузьміна, ²Б.С.Коп'як, ¹О.В. Под'яченко, ²В.Ф. Сагач, ¹Г.М. Бутенко

¹ ДУ «Інститут генетичної та регенеративної медицини НАМН України», Київ; ²Інститут фізіології ім. О.О.Богомольця НАН України, Київ; e-mail: irina_labunets@ukr.net

У щурів, які отримували лише нейротоксин 6-гідроксидофамін або у комплексі із мелатоніном, досліджували зв'язок порушень активності антиоксидантних ферментів головного мозку, ендокринної функції тимуса як можливих патогенетичних ланок паркінсонізму, зі зміною числа нейтральних стовбурових клітин (НСК) у нюховій цибулині. Встановлено, що у щурів із руховою асиметрією в апоморфіновому тесті, що відповідає значним ушкодженням дофамінергічних нейронів чорної субстанції, активність супероксиддисмутази, каталази і глутатіонредуктази у стріатумі в 1,3–1,4 раза, а вмісту у крові тимуліну у 8 разів менше, ніж у псевдооперованих тварин ($P < 0,05$). Навпаки, у щурів без рухової асиметрії і, відповідно, частковим ушкодженням нейронів значення показників майже не змінювалися. Частка nestin⁺-клітин у нюховій цибулині щурів із відсутністю рухової асиметрії збільшувалась із 91,2 до 99,3 % і залишалась такою після курсового введення мелатоніну (10 мг/кг, впродовж 18 діб). Курс мелатоніну щурам із циркуляторними рухами призводить до зменшення відсотка nestin⁺-клітин, що спостерігається на тлі значного зростання зниженої активності антиоксидантних ферментів і вмісту в крові тимуліну. Обговорюється можливість посилення у таких тварин диференціювання НСК нюхової цибулини в нейрональному напрямку. Обґрунтовується перспективність використання мелатоніну як нейропротекторного засобу в терапії паркінсонізму. Ключові слова: паркінсонізм; антиоксидантні ферменти; тимулін; мелатонін; нейральні стовбурові клітини; нюхова цибулина.

ВСТУП

Хвороба Паркінсона (ХП) – одне із найбільш розповсюджених прогресуючих нейродегенеративних захворювань, при якому масова загибель дофамінергічних нейронів компактної частини чорної субстанції середнього мозку призводить до дефіциту дофаміну в нео-стріатумі та розвитку характерних моторних порушень [1, 2].

Загально визнані механізми нейродегенерації при ХП включають розвиток оксидативного стресу, нейрозапалення з активацією мікроглії, ушкодження шляхів деградації протеїнів, глутаматергічну ексайтотоксичність, дисфункцію мітохондрій тощо, а основним

шляхом загибелі нервових клітин є апоптоз [3, 4]. Існує думка, що саме оксидативний стрес – один із ключових факторів ушкодження клітинних мембран, органел і нуклеїнових кислот дофамінергічних нейронів та їх наступної загибелі [5]. Навпаки, у головному мозку на тлі зростання вмісту вільних радикалів та активних форм кисню зменшується синтез антиоксидантних ферментів [6].

Разом з тим з'являється все більше вагомих доказів щодо змін імунних реакцій при розвитку ХП/паркінсонізму, а також значення активованих імунних клітин для ушкодження дофамінергічних нейронів після інфільтрації головного мозку [7, 8]. Так, встановлено, що

© І.Ф. Лабунець, С.О.Таланов, Р.Г. Васильєв, А.Є. Родніченко, Н.О. Утко, І.А. Кузьміна, Б.С.Коп'як, О.В. Под'яченко, В.Ф. Сагач, Г.М. Бутенко

в ньому деякі субпопуляції Т-лімфоцитів, нейтрофіли, макрофаги, разом із мікроглією, синтезують такі прозапальні цитокіни, як туморнекротичний фактор (ТНФ)- α , інтерферон (ІФН)- γ , інтерлейкін (ІЛ)-1 β , хемокіни, а також вивільняють активні форми кисню та азоту; і, навпаки, оксидативний стрес здатен змінити функціонування клітин імунної системи. Крім того, порушення імунних реакцій при нейродегенеративних захворюваннях може бути пов'язане з дисфункцією центрального органа імунної системи тимуса, що нами було виявлено раніше на експериментальній моделі ішемії головного мозку [9]. Як відомо, саме в ньому утворюються субпопуляції Т-лімфоцитів із різними функціональними властивостями. Їх диференціювання, міграція на периферію і прояв функціональної активності контролюються гормонами тимуса, зокрема високоактивного тимуліну [10,11]. Цей гормон також впливає на функціонування макрофагів і виявляє протизапальну дію при нейрозапаленні, зменшуючи концентрацію ТНФ- α , ІЛ-1 β , ІЛ-6 і підвищуючи вміст ІЛ-10 [12, 13]. Як результат впливу імунних факторів, у центральній нервовій системі (ЦНС) може змінитися нейрогенез [14, 15].

Відомо про можливість не тільки адаптивного посилення нейрогенезу, але і його пригнічення в основних нейрогенних ділянках головного мозку тварин із нейродегенеративними захворюваннями [16, 17]. При паркінсонізмі однією із таких ділянок є нюхова цибулина, в яку по роstralьному шляху мігрують нейральні стовбурові клітини (НСК) та прогеніторні клітини із субвентрикулярної зони бокових шлуночків [18]. Нюхову цибулину вважають унікальним джерелом для отримання власних НСК, що можуть диференціюватись у зрілі дофамінергічні нейрони, астроцити і олігодендроцити як *in vivo*, так і *in vitro* [18, 19]. Цей орган пов'язаний з нюховою функцією, порушення якої може бути однією із ранніх преклінічних ознак розвитку паркінсонізму [1].

Слід зазначити, що ефективність репаративних процесів у головному мозку при нейродегенеративних захворюваннях значною мірою залежить від впливу факторів макрооточення, зокрема гормонів [19, 20]. Серед останніх гормон епіфіза мелатонін пригнічує розвиток ХП/паркінсонізму в експериментальних і клінічних умовах [21–23]. Він виявляє широкий спектр біологічної активності, показана його участь у антиоксидантному захисті організму [6, 24]. Так, цей гормон – один із найпотужніших прямих антиоксидантів, що поглинає ендогенні вільні радикали (гідроксильний радикал, супероксидний аніон-радикал, синглетний кисень, оксид азоту) і зберігає макромолекули клітин (білки, жири, ядерну та мітохондріальну ДНК) від окисного пошкодження. Мелатонін діє також як непрямий антиоксидант, стимулюючи активність антиоксидантних ферментів у головному мозку тварин із нейродегенеративними захворюваннями. Крім того, встановлено його позитивний вплив на порушений функціональний стан тимуса, баланс регуляторних субпопуляцій Т-лімфоцитів і активність макрофагів [25, 26]. Є дані щодо підсилення під впливом мелатоніну проліферативного потенціалу НСК головного мозку та їх диференціювання у напрямку нейронів [22, 27, 28].

Мета нашої роботи – оцінити можливий зв'язок змін активності антиоксидантних ферментів у головному мозку, функціонального стану органів імунної системи та вмісту НСК у нюховій цибулині щурів із експериментальним паркінсонізмом, а також за умов введення мелатоніну.

МЕТОДИКА

Досліди проводили на 36 щурах-самцях популяції Вістар віком від 3 до 4 міс масою 200–250 г із розплідника віварію Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України. Всі тварини знаходились у стандартних умовах віварію при природному світловому

режимі. Період дослідження – жовтень – травень. Біологічний матеріал для дослідів брали у тварин у ранкові години доби під ефірним наркозом. Усі роботи виконували з дотриманням “Європейської конвенції по захисту хребетних тварин, які використовуються з експериментальною та іншою науковою метою”, а також принципів біоетики та норм біологічної безпеки [29].

Моделювання геміпаркінсонізму. Для створення моделі геміпаркінсонізму використовували селективний нейротоксин 6-гідроксидофамін (6-ГОДА), який є важливим ендегенним патогенетичним фактором розвитку ХП, що ушкоджує дофамінергічні нейрони чорної субстанції середнього мозку та спричинює розвиток ендегенного оксидативного стресу, нейрозапалення і дисфункції мітохондрій [21, 30]. У нашому експерименті однобічне пошкодження дофамінергічних нейронів викликали стереотаксичною ін'єкцією у лівий висхідний латеральний пучок переднього мозку 8,0 мкг 6-ГОДА (“Sigma”, США), розведеного у 4,0 мкл фізіологічного розчину, з додаванням 0,1%-ї аскорбінової кислоти як стабілізатора, що гальмує окиснення 6-ГОДА. За 30 хв до мікроін'єкції нейротоксину внутрішньоочеревинно вводили 40 мг/кг паргліліну (“Sigma”, США), який пригнічує метаболічні перетворення 6-ГОДА моноамінооксидазою, і 25 мг/кг дезипраміну (“Sigma”, США), що блокує захоплення нейротоксину норадренергічними клітинами. Усі вказані маніпуляції проводили під нембуталовим наркозом (50 мг/кг, внутрішньоочеревинно, “Sigma”, США). Контрольній групі тварин (псевдооперовані щури) робили всі вищевказані маніпуляції, але стереотаксично вводили 4,0 мкл 0,1%-ї аскорбінової кислоти.

Через тиждень після стереотаксичної ін'єкції 6-ГОДА у тварин за викликану рухову активність визначали ступінь однобічної дегенерації дофамінергічних нейронів чорної субстанції [21]. Для цього щурам внутрішньоочеревинно вводили агоніст дофамінових рецепторів апоморфін (0,5 мг/кг,

“Sigma”, США) і оцінювали циркуляторні рухи (число обертів за хвилину) у бік, контра-латеральний відносно півкулі, в яку вводили нейротоксин. Інтенсивність таких рухів була індикатором ступеня однобічної дегенерації нігостріатної дофамінергічної системи. За нашими попередніми морфологічними дослідженнями, відсутність рухової асиметрії в апоморфіновому тесті (0 об/хв) відповідає ушкодженню в середньому близько 44 % дофамінергічних нейронів, а наявність інтенсивних циркуляторних рухів у цьому тесті (понад 6 об/хв) близько 97 %. [21, 31].

Введення мелатоніну. Починаючи з 5-ї доби після проведення апоморфінового тесту, відповідним групам тварин вводили внутрішньоочеревинно мелатонін (“Sigma”, США) щоденно о 18.00 упродовж 18 діб, із розрахунку 10 мг/кг, у 0,0001%-му розчині аскорбінової кислоти. Ефективність впливу такої дози мелатоніну на перебіг паркінсонізму показана нами та іншими дослідниками раніше [21, 23]. Контроль – ін'єкції розчинника мелатоніну за аналогічною схемою.

Експериментальні групи щурів. У роботі були використані такі групи тварин (у кожній по шість особин): інтактні; псевдооперовані; із введенням 6-ГОДА і розчинника мелатоніну та апоморфіновим тестом відповідно 0 та понад 6 об/хв); із введенням 6-ГОДА і мелатоніну та апоморфіновим тестом відповідно 0 та понад 6 об/хв).

Методи. Активність антиоксидантних ферментів оцінювали у супернатантах гомогенатів стріатумів лівої півкулі головного мозку експериментальних тварин (10 000 g протягом 20 хв) спектрофотометричними методами (спектрофотометр «μQuant, Bio-Tek», США) [32]. Для дослідження активності супероксиддисмутази (СОД) використовували метод, оснований на здатності ферменту пригнічувати реакцію аутоокиснення адреналіну (“Fluka”, Німеччина) в адренохром при рН 10,2. Активність СОД виражали в умовних одиницях із розрахунку на 1 мг білка за 1 хв. Активність каталази визначали з кінетики руйнування H₂O₂

(“Riedel-deHaën”, Німеччина) і виражали в мікромолях утилізованої H_2O_2 на 1 мг білка за 1 хв. Активність глутатіонпероксидази (ГП) і глутатіонредуктази (ГР) вимірювали за зменшенням НАДФН (“Sigma”, США) у сполученій глутатіонредуктазній реакції з додаванням у реактивну суміш відповідних реагентів і виражали в наномолях окисненого НАДФН на 1 мг білка за 1 хв. Вміст білка у стріатумі вимірювали за методом Лоурі.

Вміст тимуліну у сироватці крові оцінювали за методом Bach та співавт. [33], який оснований на відновленні чутливості спонтанних розеткоутворювальних клітин селезінки мишей із вилученим тимусом до азотіоприну (“Sigma”, США). Сироватку тварин пропускали через ультрафільтр CF-25 фірми “Amicon” (США) для видалення високомолекулярного інгібітора тимуліну. Результати наводили у вигляді \log_2 титру гормону.

У щурів вимірювали масу селезінки та підраховували кількість життєздатних ядромісних клітин в органі за допомогою 0,2%-го розчину трипанового синього. Наявність НСК визначали в культурі нюхової цибулини за їх здатністю утворювати нейросфери та експресувати маркер nestin [20]. Для цього нюхову цибулину виділяли з головного мозку щурів під контролем стереомікроскопа. Надалі, за власним протоколом, суспензію клітин, отриману після інкубації біоптату при 37°C з ферментами (0,05%-на проназа та 0,05%-на колагеназа ІА), центрифугували у десятикратному об’ємі холодного фосфатного буфера (ФБ; “Sigma”, США) впродовж 10 хв при 800 g та +4°C. Осад ресуспендували та клітини вносили до покритих колагеном І типу чашок Петрі діаметром 35 мм у середовищі росту такого складу: базальне середовище Neuronal Base Medium, 1%-й розчин антибіотиків/антимікотиків (“РАА”, Австрія), 10%-на ембріональна теляча сироватка, L-глутаміну – 2ммоль/л, 20 нг/мл bFGF (фактор росту фібробластів) та 20 нг/мл EGF (епідермальний фактор росту) (“Sigma”, США). При досягненні субконфлуентного

стану клітини знімали трипсином-ЕДТА (“Sigma”, США) та пересівали в покритий колагеном І типу флакон Т25. Для оцінки на здатність до утворення нейросфер використовували культури першого пасажу. Для цього при 70-80% моношарі клітини знімали та вносили до чашок Петрі діаметром 35 мм для суспензійних культур у концентрації 10 000 клітин/мл у 2 мл середовища росту такого складу: базальне середовище DMEM/F12, 2 %-ї поживної добавки B27 (“Gibco”, США), 2 ммоль/л L-глутаміну, 20 нг/мл bFGF і 20 нг/мл EGF та культивували впродовж 14 діб.

Для оцінки відсотка nestin⁺-клітин у культурі нюхової цибулини їх фіксували протягом 10 хв при кімнатній температурі додаванням 100 мкл 4%-го розчину параформальдегіду на 0,1 М ФБ з рН7,4. Потім 1-2 рази відмивали ФБ та пермеабілізували протягом 15 хв додаванням 100 мкл Perm/Wash buffer з подальшим відмиванням тим самим буфером. Для визначення nestin⁺-клітин використовували мишачі анти-nestin моноклональні антитіла (МАТ), мічені фікоеритрином (“Becton Dickinson”, США) у розведенні 1:50, згідно з рекомендаціями фірми-виробника. Клітини ($1,0 \cdot 10^6$) інкубували з МАТ упродовж 60 хв при кімнатній температурі. Безпосередньо перед аналізом додавали розчин FACSFlow для проточної цитометрії та аналізували на проточному цитофлюориметрі-сортері BD FACSAria (“Becton Dickinson”, США).

Статистичну обробку результатів проводили за критерієм t Стьюдента [34].

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Активність антиоксидантних ферментів у стріатумі щурів із моделлю геміпаркінсонізму та її зміни після введення мелатоніну. В експериментальних групах тварин нами досліджена активність таких ключових ферментів антиоксидантного захисту організму, як СОД, каталаза, ГП та ГР [32]. При цьому активність антиоксидантних ферментів у групах інтактних і псевдооперованих тварин

практично не відрізнялася ($P>0,05$). Активація СОД є першою ланкою антиоксидантного захисту; цей фермент переводить супероксидний аніон-радикал в електронейтральну форму H_2O_2 , подальше перетворення якої до H_2O контролюється каталазою і ГП. Нами встановлено суттєве зменшення активності СОД і каталази у стріатумі дослідних щурів із циркуляторними рухами відносно псевдооперованих тварин (рис.1). У тварин спостерігається також значне зниження активності ГР, яка відповідає за відновлення окисненого глутатіону в реакції, що каталізує ГП. Слід зазначити, що ступінь зниження активності антиоксидантних ферментів у стріатумі щурів, яким вводили нейротоксин 6-ГОДА, збігається із вираженістю ушкодження дофамінергічних нейронів чорної субстанції.

Ін'єкції мелатоніну щурам із руховою асиметрією у апоморфіновому тесті відновлюють знижену активність більшості антиоксидантних ферментів до рівня псевдооперованих тварин (див. рис.1). Спостерігається підсилення активності саме СОД і каталази, які формують єдину координовану пару в своїй антиоксидантній діяльності [32]. Дія мелатоніну на активність цих ферментів реалізується на генетичному рівні підсиленням експресії mRNA [6]. При цьому він попереджує індукцію прооксидантного фермента мітохондріальної індукцйбельної NO-синтази у клітинах чорної субстанції і стріатума мишей із моделлю ХП [35]. Оскільки дисфункція мітохондрій – важлива патогенетична ланка ХП/паркінсонізму, треба відмітити протекторно-пригнічувальну дію мелатоні-

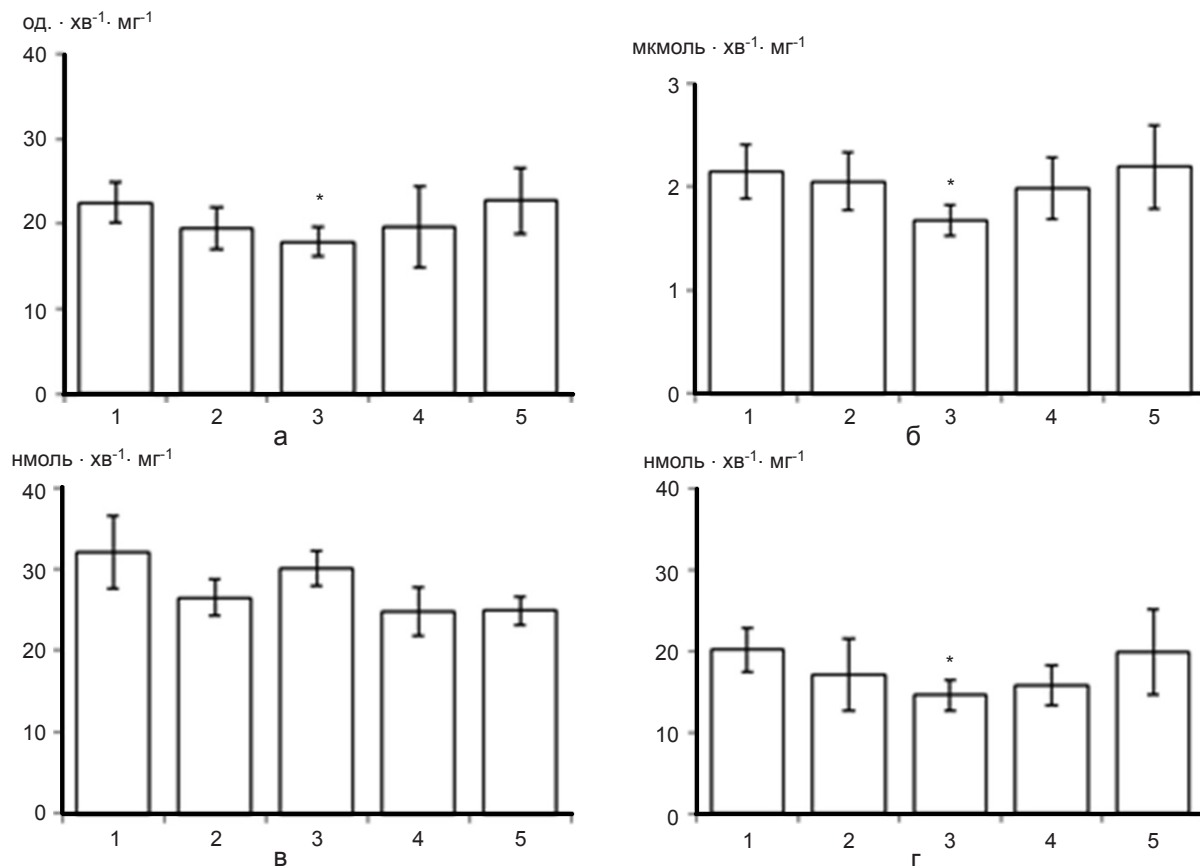


Рис.1 Активність супероксиддисмутази (а), каталази (б), глутатіонпероксидази (в), глутатіонредуктази (г) у стріатумі щурів: 1 – псевдооперовані, 2 – без рухової асиметрії в апоморфіновому тесті, 3 – із руховою асиметрією, 4 – без рухової асиметрії та із введенням мелатоніну, 5 – із руховою асиметрією та введенням мелатоніну; * $P<0,05$ порівняно із псевдооперованими тваринами

ну на пори мітохондрій [6]. Доведено, що їх відкриття за умов дії вільних радикалів супроводжується виходом у цитозоль цитохрому С, який активує цитоплазматичні каспази, що призводить до підсилення останніми протеолізу клітинних білків і сприяє розвитку апоптозу клітин нервової системи.

Отже, завдяки широкому спектру антиоксидантних властивостей, мелатонін здатний стримувати дегенерацію дофамінергічних нейронів, яка викликана у щурів переважно вільнорадикальним окисненням у результаті введення 6-ГОДА. Нами раніше виявлена подібна здатність мелатоніну при його введенні тваринам перед експериментальним моделюванням геміпаркінсонізму [21]. Позитивний вплив гормону саме за умов зміни активності антиоксидантних ферментів узгоджується з даними літератури щодо модулювальної дії на порушені функції організму [6, 25, 26].

Функціональний стан тимуса і селезінки у тварин із моделлю геміпаркінсонізму та вплив на нього мелатоніну. Встановлено, що ендокринна функція тимуса у псевдооперованих щурів пригнічується порівняно з інтактними тваринами, що можна пояснити реакцією залози на оперативне втручання (рис.2). У дослідних щурів із циркуляторними рухами вміст у крові тимуліну суттєво зменшується відносно псевдооперованих тварин. Після курсу мелатоніну вміст гормону зростає ($P < 0,05$) у щурів обох дослідних груп до значень інтактних тварин (див. рис.2). Маса селезінки у щурів інтактних, псевдооперованих та дослідних із руховою асиметрією становить $733,2 \pm 90,7$, $564,6 \pm 66,3$ і $487,1 \pm 29,9$ мг відповідно; при цьому різниця між першою і останньою групами вірогідна. Кількість ядровмісних клітин у селезінці була $(946,4 \pm 157,4) \cdot 10^6$, $(680,8 \pm 158,8) \cdot 10^6$ і $(559,9 \pm 118,8) \cdot 10^6$ відповідно. У дослідних щурів із руховою асиметрією, які отримували мелатонін, маса селезінки $637,5 \pm 71,1$ мг і число в ній ядровмісних клітин $(763,6 \pm 130,8) \cdot 10^6$ збільшувалися і наближувалися до значень у інтактних тварин. Тобто після введення мелатоніну спостерігаються

позитивні зміни функціонування тимуса, а також клітинності селезінки, яку вважають інтегральним показником, що значною мірою віддзеркалює стан таких процесів в імунній системі, як проліферація, міграція та диференціювання лімфоїдних клітин [10].

Таким чином, встановлено, що функціональний стан тимуса погіршується при 6-ГОДА-індукованому пошкодженні нігостриатної дофамінергічної системи; при цьому ступінь пригнічення ендокринної функції залози у тварин із геміпаркінсонізмом узгоджена з вираженістю дегенеративних змін дофамінергічних нейронів чорної субстанції. Існування двобічного зв'язку дефіциту дофаміну головного мозку і гіпофункції тимуса доводять такі факти. Як відомо, дофамін – один із важливих нейромедіаторів ЦНС, який впливає не тільки на рухову активність, але й функціонування ендокринної та імунної систем організму [36]. Оскільки він не проникає через гематоенцефалічний бар'єр, механізм порушень функцій периферичних імунних клітин при паркінсонізмі пов'язують як зі змінами кількісних відношень мозкового дофаміну з іншими нейромедіаторами із імуносупресивними властивостями (наприклад, метенкефаліном), так і його опосередкованим впливом на лімфоцити через деякі гормони гіпоталамо-гіпофізарної системи (зокрема,

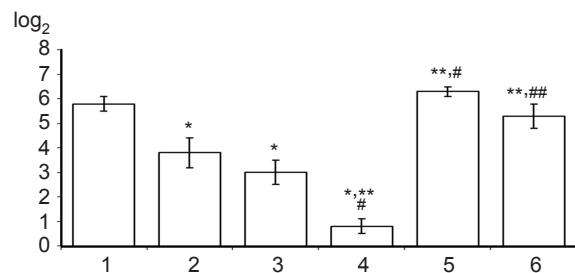


Рис. 2. Вміст тимуліну в крові щурів із моделлю геміпаркінсонізму та його зміни після введення мелатоніну: 1 – інтактні, 2 – псевдооперовані, 3 – без рухової асиметрії в апорфіновому тесті, 4 – із руховою асиметрією, 5 – без рухової асиметрії та із введенням мелатоніну, 6 – із руховою асиметрією та введенням мелатоніну; $P < 0,05$ порівняно: * з інтактними, ** з псевдооперованими, # без рухової асиметрії у апорфіновому тесті, ## із руховою асиметрією

адренекортитропний та соматотропний гормони тощо) [36]. При цьому ми не виключаємо можливості реалізації ефекту вказаних гормонів на лімфоцити на рівні секреторного компонента тимуса, в якому знаходяться рецептори до останніх [11, 37].

У свою чергу існує зворотна дія продуктів імунної системи на концентрацію дофаміну в ЦНС [36, 38]. Так, показано, що ІЛ-2 у фізіологічній концентрації стимулює *in vitro* дозозалежним способом вивільнення дофаміну нейронами головного мозку, а трансформуючий фактор росту α є нейротрофічним *in vitro* для дофамінергічних нейронів середнього мозку. Враховуючи біологічні властивості тимуліну, можна припустити і його участь у зворотній дії факторів імунної системи на вміст дофаміну у ЦНС. При цьому має значення безпосередній вплив гормону на синтез прозапальних цитокінів у головному мозку тварин із експериментальною моделлю нейрозапалення за допомогою NF- κ B-залежного механізму [12]. Зниження вмісту тимуліну в крові щурів із геміпаркінсонізмом – важлива патогенетична ланка формування у лімфоїдних органах дисбалансу регуляторних Т-лімфоцитів у бік накопичення Т-супресорів, які після міграції у головний мозок здатні чинити пряму цитотоксичну дію на нейрони [8, 36]. Ми вважаємо, що виявлений нами факт стійкої тенденції до зменшення маси селезінки та числа в ній ядромісних клітин частково пояснюється посиленням міграції периферичних Т-лімфоцитів у головний мозок.

Активация ендокринної функції тимуса після введення мелатоніну може забезпечуватися його безпосереднім впливом на секреторний компонент залози [26, 37]. Крім того, мелатонін підвищує число Т-хелперів у лімфоїдних органах, діючи через рецептори в цих клітинах [22]. Як результат, у щурів із геміпаркінсонізмом відновлюються внутрішньосистемні зв'язки, і, не виключено, вміст різних Т-субпопуляційний лімфоцитів у селезінці.

Число НСК у культурі нюхової цибулини тварин із моделлю геміпаркінсонізму та за

умов введення мелатоніну. Із нюхової цибулини щурів були отримані культури клітин, які спроможні до швидкої проліферації, а за спеціальних гіпоадгезивних умов культивування – до росту з формуванням нейрофер (рис.3).

Аналіз культур клітин нюхової цибулини першого пасажу методом протокової цитометрії показав суттєве зростання частки nestin⁺-клітин у дослідних щурів без рухової асиметрії порівняно з псевдооперованими тваринами, тоді як у щурів із її наявністю підвищення значень показника було неістотним (рис.4). Курс мелатоніну зберігає підвищений відсоток nestin⁺-клітин у щурів без рухової асиметрії; у щурів із циркуляторними рухами частка цих клітин практично не відрізнялася від значень у псевдооперованих тварин (див. рис.4).

Встановлене нами зростання відсотка НСК у нюховій цибулині щурів узгоджується з даними літератури [18]. Разом з тим ми спостерігали значне збільшення частки цих клітин саме у тварин без рухової асиметрії в апоморфіновому тесті. Характерно, що менш виражене підвищення відсотка НСК у нюховій цибулині дослідних щурів із циркуляторними рухами, на відміну від щурів із їх відсутністю,

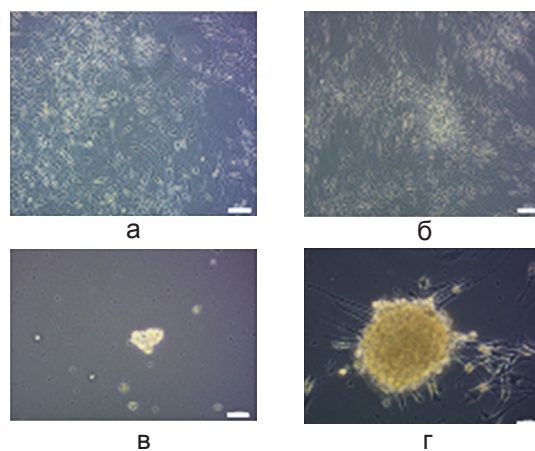


Рис 3. Біологічні властивості нейральних стовбурових клітин із культури клітин нюхової цибулини: а – первинна культура клітин; б – культура клітин першого пасажу; в і г – здатність клітин нюхової цибулини до росту у вигляді нейрофер через 72 год і 14 діб культивування відповідно. Фазово-контрастна мікроскопія. Масштабний відрізок 50 мкм

збігалось з інтенсивним зниженням активності антиоксидантних ферментів у стріатумі, а також вмісту в крові тимуліну. Тобто при експериментальному геміпаркінсонізмі активація нейрогенезу, зокрема посилення проліферації НСК у нюховій цибулині, спостерігається на тлі відносно збереженого стану антиоксидантного захисту головного мозку та функціонування тимуса.

Ми припустили, що застосування при паркінсонізмі фармакологічних засобів, які спроможні одночасно вплинути на активність факторів імунної системи та антиоксидантного захисту, може спричинити і нейропротекторний ефект. Так, за даними літератури, позитивний вплив мелатоніну на етапи нейрогенезу у головному мозку пов'язаний не тільки з комбінацією антиоксидантного і антиапоптозного ефектів, але й посиленням проліферативного потенціалу НСК та їх диференціювання у нейрони, зміною активності та/або вмісту деяких факторів мікрооточення (зокрема, BDNF, нейротрофічний фактор головного мозку), які важливі для виживання нейральных клітин та утворення нових нейронів [22, 27]. Дійсно, нами встановлено, що курсове введення мелатоніну підтримує підвищений вміст НСК у нюховій цибулині дослідних щурів без рухової асиметрії. Дія мелатоніну на НСК цього органа може реалізуватися не тільки безпосередньо, через рецептори, але й опосередкована антизапальним ефектом тимуліну в ЦНС. При цьому показано

зменшення проліферативного потенціалу НСК у головному мозку за умов зростання концентрації таких прозапальних цитокінів, як ТНФ- α , ІЛ-1 β [14].

Разом з тим відсоток НСК у нюховій цибулині дослідних тварин із руховою асиметрією зменшувався після введення мелатоніну до значень псевдооперованих тварин. З одного боку, відомо щодо зменшення числа та/або афінності рецепторів до мелатоніну в різних тканинах організму, в тому числі у нейрогенних зонах головного мозку при прогресуванні ХП [6, 22]. З іншого боку, ми припускаємо, що подібний напрямок змін частки НСК у нюховій цибулині таких щурів після введення мелатоніну можна пояснити посиленням їх диференціювання у бік нейронів. Таке припущення базується, по-перше, на даних літератури щодо нейропротекторних властивостей мелатоніну при ХП/паркінсонізмі [21–23]. По-друге, за нашими результатами, таким змінам нейрогенезу може сприяти активація мелатоніном механізмів, які спрямовані на зменшення проявів оксидативного стресу і нейрозапалення при паркінсонізмі. Крім того, у дослідних тварин, що отримували мелатонін, абсолютний вміст nestin⁺-клітин у культурі нюхової цибулини менше, ніж у щурів, яким не вводили мелатонін, а також у псевдооперованих ($0,96 \cdot 10^6$, $1,26 \cdot 10^6$ і $1,3 \cdot 10^6$, відповідно). В подальшому нами буде досліджена здатність НСК нюхової цибулини до диференціювання у нейрональ-

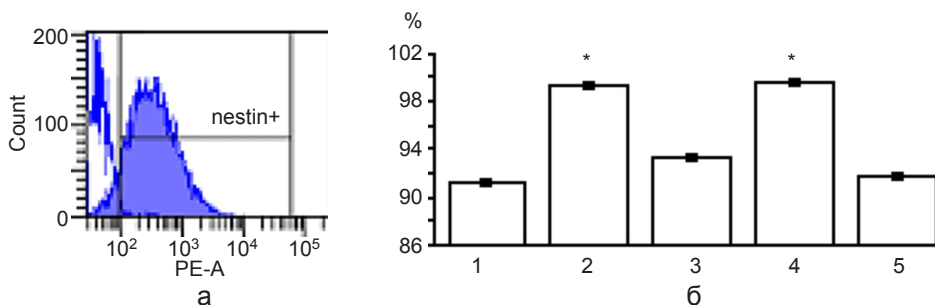


Рис. 4 Фенотипування культур нюхової цибулини першого пасажу (а) від тварин різних груп (б) на наявність nestin⁺-клітин: 1 – псевдооперовані, 2 – без рухової асиметрії в апорфіновому тесті, 3 – із руховою асиметрією, 4 – без рухової асиметрії та із введенням мелатоніну, 5 – із руховою асиметрією та введенням мелатоніну; *P<0,05 порівняно із псевдооперованими тваринами

ному напрямку з одночасною оцінкою нюхової функції та структурних змін у чорній субстанції при експериментальному паркінсонізмі, а також за умов введення мелатоніну.

Таким чином, у результаті досліджень виявлена узгодженість змін деяких етапів нейрогенезу в нюховій цибулині зі станом антиоксидантного захисту головного мозку і функціональною активністю органів імунної системи, а також показана можливість участі мелатоніну у таких взаємодіях.

Використання в експерименті щурів як із частковим, так і значним ушкодженням дофамінергічних нейронів чорної субстанції дало змогу оцінити зміни досліджених показників на етапах розвитку паркінсонізму, які значною мірою відповідають преклінічній стадії захворювання із розвитком компенсаторних процесів у головному мозку, а також його прогресії з появою моторних порушень [1]. Мелатонін виявив ефект у щурів обох дослідних груп, хоча напрямок його переважного впливу на етапи нейрогенезу може мати особливості залежно від стадії розвитку захворювання. У механізмі нейропротекторного ефекту мелатоніну при паркінсонізмі має значення його позитивний вплив на досліджені патогенетичні ланки захворювання. Отже, мелатонін можна розглядати як перспективний засіб у схемах індивідуалізованої терапії паркінсонізму з урахуванням стадії захворювання та схеми його застосування.

І.Ф. Лабунець, С.А.Таланов, Р.Г. Васильєв, А.Е. Родніченко, Н.А. Утко, І.А. Кузьміна, Б.С.Коп'як, Е.В. Под'яченко, В.Ф. Сагач, Г.М. Бутенко

ГОРМОНЫ ТИМУСА, АНТИОКСИДАНТНЫЕ ФЕРМЕНТЫ И НЕЙРОГЕНЕЗ В ОБОНЯТЕЛЬНОЙ ЛУКОВИЦЕ КРЫС ПРИ ПАРКИНСОНИЗМЕ: ВЛИЯНИЕ МЕЛАТОНИНА

У взрослых крыс, получавших нейротоксин 6-гидроксидофамин самостоятельно или в сочетании с мелатонином, исследовали связь нарушений активности антиоксидантных

ферментов головного мозга, эндокринной функции тимуса как возможных патогенетических звеньев паркинсонизма, с изменением числа нейральных стволовых клеток (НСК) в обонятельной луковице. Установлено, что у крыс с двигательной асимметрией в апоморфиновом тесте, что соответствует значительным повреждениям дофаминергических нейронов черной субстанции, активность в стриатуме супероксиддисмутазы, каталазы и глутатионредуктазы в 1,3-1,4 раза, а содержания в крови тимулина в 8 раз ниже, чем у ложнопериоперированных животных ($P<0,05$). Напротив, у крыс с отсутствием двигательной асимметрии, а значит, частичным повреждением нейронов, показатели практически не изменялись. Доля nestin⁺-клеток в обонятельной луковице крыс с отсутствием двигательной асимметрии увеличивалась с 91,2 до 99,3% и оставалась такой после курсового введения мелатонина (10 мг/кг, в течение 18 сут). Курс мелатонина крысам с циркуляторными движениями приводит к уменьшению доли nestin⁺-клеток, что наблюдается на фоне значительного увеличения сниженной активности антиоксидантных ферментов и содержания в крови тимулина. Обсуждается возможность усиления у таких животных дифференцировки НСК обонятельной луковицы в нейрональном направлении. Обсуждается перспективность применения мелатонина как нейропротекторного средства в терапии паркинсонизма. Ключевые слова: паркинсонизм; антиоксидантные ферменты; тимулин; мела тонин; нейральные стволовые клетки; обонятельная луковица.

I.F.Labunets¹, S.A. Talanov², R.G. Vasilyev¹, A.E. Rodnichenko¹, N.A. Utko¹, I.A. Kyzminova¹, B.S.Kopjak², E.V. Podjachenko¹, V.F.Sagach², G.M. Butenko¹

THYMIC HORMONES, ANTIOXIDANT ENZYMES AND NEUROGENESIS OF BULBUS OLFACIORIUS IN RATS WITH PARKINSONISM: THE EFFECT OF MELATONIN

The adult rats received both neurotoxin 6-hydroxidophamine and neurotoxin and melatonin. It was investigated a link between the disturbances of the brain antioxidant enzymes activity and thymic endocrine function, as possible pathogenic factors of parkinsonism, with changes in the number of neural stem cells (NSC) in the bulbus olfactorius. Rats with motor asymmetry in the apomorphine test and significant damage of the dopaminergic neurons in the substantia nigra have decreased levels of superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase activities in striatum (1.3-1.4 times) and blood thymulin content (8 times) compared to control group. On the contrary, examined indices were not changed in rats without motor asymmetry and correspondingly partly damaged neurons. The number of nestin⁺-cells in the bulbus olfactorius of rats without motor asymmetry increased from 91.2% to 99.3% and remained unchanged after melatonin administration course (10 mg/kg during 18 days). Melatonin

administration resulted in the decrease in the number of nestin⁺-cells along with significant elevation of the decreased antioxidant enzymes activity and blood thymulin content in rats with circulatory movements. Possibilities of the enhancement of NSC differentiation in bulbus olfactorius into neuronal direction in such animals has been discussed. The conclusion about the potential use of melatonin as a neuroprotector in parkinsonism therapy has been made.

Key words: parkinsonism; antioxidant enzymes; thymulin; melatonin; neural stem cells; bulbus olfactorius

¹*Institute of Genetic and Regenerative Medicine of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine;*

²*O.O. Bogomoletz Institute of Physiology, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv*

REFERENCES

- Ugrumov MV. Neurodegenerative diseases: fundamental and applied aspect. Nauka: Moscow; 2010. [Russian].
- Karaban IN, Karaban NV, Karasevich NV. Means of neuroprotection in Parkinson's disease. *Int J Neurol.* 2011;44(6):25-35 [Russian].
- Bove J, Perier C. Neurotoxin-based models of Parkinson's disease. *Neuroscience.* 2012;211: 55-76.
- Taylor JM, Main BS, Crack PJ. Neuroinflammation and oxidative stress: co-conspirators in the pathology of Parkinson's disease. *Neurochem Int.* 2013;62(5):803-19.
- Hwang O. Role of oxidative stress in Parkinson's disease. *Exp Neurobiol.* 2013;22(1):11-7.
- Reiter RJ, Manchestr LC, Tan DX. Neurotoxins: free radical mechanisms and melatonin protection. *Curr Neuropharmacol.* 2010;8(3):194-210.
- Monahan AJ, Warren M, Carvey PM. Neuroinflammation and peripheral immune infiltration in Parkinson's disease: an autoimmune hypothesis. *Cell Transplant.* 2008;17(4):363-72.
- Abdurasulova IN, Klimenko VM. The role of immune and glial cells in neurodegenerative process. *Med Acad J.* 2011;11(1):12-29. [Russian].
- Labunets IF, Tsupikov OM, Kyryk VM, Kuchuk OV, Pivneva TA, Skibo GG, Butenko GM. The influence of neurotransplantation on functional activity of pineal gland and thymus in brain ischemic injury. In: *Genetic and Regenerative Medicine: Problems and Perspectives, Proceedings of the International Conference, Kiev, Ukraine, October 14-15, 2010; J. AMS Ukr., 2010, 16, suppl., 100-1.* [Ukrainian].
- Yarilin AA, Pinchuk VG, Grinevich YuA. Structure of Thymus and Differentiation of T Lymphocytes. *Naukova Dumka: Kiev; 1991.* [Ukrainian].
- Lunin SM, Novoselova EG. Thymus hormones as a prospective anti-inflammatory agents. *Expert Opin Ther Targets.* 2010;14(8):775-86.
- Haddad JJ, Hanbali LH. The anti-inflammatory and immunomodulatory activity of thymulin peptide is NF- κ B dependent and involves the downregulation of I κ B- α . *Am J Med Biol Res.* 2013;1(2):41-9.
- Pardo J., Schwerdt JI, Reggiani PC, Zappa MF, Pereyra AS, Brown OA, Goya RG. Physiology, molecular biology and therapeutic potential of the thymic peptide thymulin. *Physiol. Mini Reviews.* 2012;6(1):2-12.
- Carpentier PA, Palmer TD. Immune influence on adult neural stem cell regulation and function. *Neuron.* 2009;64(1):79-92.
- Kokaia Z, Martino G, Schwartz M, Lindvall O. Cross-talk between neural stem cells and immune cells: the key to better brain repair. *Nat Neurosci.* 2012;15(8):1078-87.
- Lindvall O, Kokaia Z. Stem cells in human neurodegenerative disorders – time for clinical translation? *JCI.* 2010;120(1):29-40.
- Rybachuk O, Pivneva T. Contribution of neural stem cells to regeneration of the central nervous system. *Int J Physiol Pathophysiol.* 2014;5(1):83-96.
- Hermann A, Storch A. Endogenous regeneration in Parkinson's disease: Do we need orthopic dopaminergic neurogenesis? *Stem Cells.* 2008;26:2749-52.
- Zozulya YuA, Lisyany NI. Neurogenic differentiation of stem cells. Kyiv: OOO UIPK "EksOb"; 2005. [Ukrainian].
- Labunets IF, Talanov SA, Rodnichenko AE, Vasilyev RG, Utko NA, Kyzminova IA, Rymar SE, Sagach VF, Butenko GM. The study in experiment of cytokine and hormone influence on neurodegenerative diseases pathogenesis stages as possible way to increase cell therapy efficacy. In: *Transplantation: Present, Past and Future, Proceedings of the International Conference. Kyiv, 2014;p.28.* [Ukrainian].
- Talanov SA, Sagach VF. Antioxidants prevent experimental hemiparkinsonism in rats. *Fiziol Zh.* 2008;54(4):23-9. [Ukrainian].
- Srinivasan V. Therapeutic potential of melatonin and its analogs in Parkinson's disease: focus on sleep and neuroprotection. *Ther Adv Neurol Disord.* 2011;4(5):297-317.
- Gutierrer-Valdez AL, Anaya-Martinez V, Ordonez-Librado JL, Garcia-Ruiz R, Torres-Esquivel C, Moreno-Rivera M, Sanchez-Betancourt J, Montiel-Flores E, Avila-Costa MR. Effect of chronic L-Dopa or melatonin treatments after dopamine deafferentation in rats: dyskinesia, motor performance, and cytological analysis. *ISRN Neurology.* 2012;article ID 360379,16p.
- Tomas-Zapico C, Coto-Montes A. A proposed mechanisms to explain the stimulatory effect of melatonin on antioxidative enzymes. *J Pineal Res.* 2005;39(2):99-104.
- Cardinali DP, Esquifino AI, Srinivasan V, Pandi-Perumal SR. Melatonin and the immune system in aging. *Neuroimmunomodulation.* 2008;15(4-6):272-8.
- Labunets I. Pineal gland and rhythms of immune system in aging. Experimental study. LAP LAMBERT Academic Publishing: Saarbrücken; 2012.
- Moriya T, Horie N, Mitome M, Shinohara K. Melatonin influences the proliferative and differentiative activity of neural stem cells. *J Pineal Res.* 2007;42(4):411-8.
- Sothibundhu A, Phansuwan-Pujito P, Govitrapong P.

- Melatonin increase proliferation of cultured neural stem cells obtained from adult mouse subventricular zone. *J Pineal Res.* 2010; 49(3):291-300.
29. European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes. Council of Europe, Strasbourg, 1986; 53.
 30. Blandini F, Armentero M. Animal models of Parkinson's disease. *FEBS J.* 2012;279(7):1156-66.
 31. Talanov SA, Oleshko NN, Tkachenko MN, Sagach V.F. Pharmacoprotective influences on different links of the mechanism underlying 6-hydroxydopamine-induced degeneration of nigro-striatal dopaminergic neurons. *Neurophysiology.* 2006;38(2):150-6. [Ukrainian].
 32. Muradian KK, Utko NA, Mozhukhina TG, Pishel IN, Litoshenko AY, Bezrukov VV, Fraifeld VE. Correlative links between superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase activities in the liver of mice. *Ukr Biochem J.* 2003;75(1):33-7. [Ukrainian].
 33. Bach JF, Dardenne M, Bach MA. Demonstration of a circulation thymic hormone in mouse and man. *Transplant Proc.* 1973;1(1):99-101.
 34. Lakin GF. *Biometrics.* Vysshaya Shkola: Moscow; 1990 [Russian].
 35. Esposito E, Cuzzocrea S. Antiinflammatory activity of melatonin in central nervous system. *Curr Neuropharmacol.* 2010;8(3):228-42.
 36. Hritcu L. Neurotransmitters and immunity: 1. Dopamine. In: *Analele stiintifice ale Universitatii "Alexandree Ioan Cuza".* 2007; VIII:107-13.
 37. Reggiani P, Morel G, Console G, Barbeito CG, Rodriguez SS, Brown OA, Bellini MJ, Pléau JM, Dardenne M, Goya RG. The thymus–neuroendocrine axis. Physiology, molecular biology, and therapeutic potential of the thymic peptide thymulin. *Ann N Y Acad Sci.* 2009;1153(1):98-106.
 38. Alonso R, Chaudieu I, Diorio J, Krishnamurthy A, Boksa P. Interleukin2 Modulates Evoked Release of [3H] Dopamine in Rat Cultured Mesencephalic Cells. *J Neurochem.* 1993;61(4):1284-90.

*Матеріал надійшов
до редакції 27.05.2015*