

УДК 616-092.4

Фенотипирование CD38 на клетках среднего мозга при экспериментальной болезни Паркинсона

Малиновская Наталия Александровна - кандидат медицинских наук, доцент кафедры Биологической химии с курсом медицинской, фармацевтической и токсикологической химии Красноярского государственного медицинского университета имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого. **(КрасГМУ, г.Красноярск)**

Панина Юлия Анатольевна - аспирант кафедры Биологической химии с курсом медицинской, фармацевтической и токсикологической химии Красноярского государственного медицинского университета имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого. **(КрасГМУ, г.Красноярск)**

Гасымлы Эльтадж Джамил кызы - студентка Лечебного факультета Красноярского государственного медицинского университета имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого. **(КрасГМУ, г.Красноярск)**

Морозова Галина Александровна - кандидат медицинских наук, научный сотрудник НИИ молекулярной медицины и патобиохимии Красноярского государственного медицинского университета имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого. **(КрасГМУ, г.Красноярск)**

Баглаева Ольга Владимировна - студентка Лечебного факультета Красноярского государственного медицинского университета имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого. **(КрасГМУ, г.Красноярск)**

Аннотация: Многие звенья патогенеза болезни Паркинсона до сих пор не до конца изучены, в том числе роль CD38, трансмембранного гликопротеида, утилизирующего НАД⁺ в клетке. На ротеноновой модели болезни Паркинсона у крыс была проведена оценка коэкспрессии CD38 и маркеров вида клеток в процентах согласно стандартным протоколам иммуногистохимии. Обнаружено значимое увеличение CD38⁺ астроцитов и активированной микроглии в эксперименте, что подтверждает важную роль этих клеток в среднем мозге при экспериментальной болезни Паркинсона.

Ключевые слова: Болезнь Паркинсона, (ко)экспрессия, CD38, NSE, GFAP, MAP2, нейроны, астроциты, микроглия.

Исследование выполнено при поддержке гранта Президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых российских ученых МК-6907.2012.7.

Болезнь Паркинсона – нейродегенеративное заболевание, которое характеризуется агрегацией белка α -синуклеина, формированием телец Леви, массовой гибелью дофаминергических нейронов и глиозом в черной субстанции [9]. Этиологические факторы болезни Паркинсона включают генетические и эпидемиологические (применение пестицидов, повышение в окружающей среде концентрации экзогенных токсинов и индустриальные выбросы). В патогенезе болезни Паркинсона ведущую роль играют окислительный стресс, митохондриальная дисфункция, эксайтотоксичность вследствие повышения содержания глутамата и оксида азота, активация микроглии и апоптической гибели клеток ЦНС, нейровоспаление [3, 4, 8, 10], однако многие звенья патогенеза болезни Паркинсона до сих пор не до конца изучены. В числе таких звеньев – механизмы поддержания уровня внутриклеточных нуклеотидов, в частности, НАД⁺.

CD38 – трансмембранный гликопротеид II типа с молекулярной массой 45 кДа, экспрессируемый преимущественно в головном мозге на активированных лимфоцитах и астроцитах [6]. CD38 функционирует как фермент, утилизирующий НАД⁺ в клетке, превращая его в циклическую или нециклическую АДФ-рибозу.

Объектом исследования явились самцы белых зрелых крыс линии Wistar возрастом 11-12 месяцев (масса 300-500 г). Экспериментальная ротеноновая модель паркинсонизма выполнялась по методикам Ferrante R.J. et al., 1997 и Sherer T.B., 2003 с модификациями. Данная модель хронического системного введения ротенона включала ежедневные подкожные инъекции ротенона (1-3 мг/кг веса/в сутки) с растворителем, контролем являлись животные с ежедневными подкожными инъекциями растворителя (100% диметилсульфоксид). Животных декапитировали под фторотановым наркозом и на льду производили забор среднего мозга на 30-е сутки с момента моделирования болезни Паркинсона, готовили парафиновые срезы.

Для фенотипирования клеток ЦНС (нейроны, астроциты, активированная микроглия)

была проведена оценка коэкспрессии CD38 и маркеров вида клеток (NSE, GFAP и MAP2) в норме и при развитии ротеноновой нейродегенерации. Коэкспрессию антигенов оценивали с помощью иммуногистохимии по стандартным протоколам (протоколы одновременной или последовательной комбинированной иммунофлуоресценции) [1]. Флуоресцентную микроскопию проводили при увеличении 400. Подсчет относительного количества клеток, экспрессирующих одновременно CD38 и соответствующий маркер вида клеток (рисунок 1), производился на 100 клеток в образце при анализе не менее 10 полей зрения. Сравнение средних осуществляли с помощью теста Манна-Уитни. Результаты представлены в виде $M \pm m$, где M – среднее значение, m – ошибка среднего, p – уровень значимости.

Данные фенотипирования CD38-позитивных клеток в модели болезни Паркинсона представлены в таблице 1.

При экспериментальной болезни Паркинсона отмечено значимое (в сравнении с контролем) увеличение количества астроцитов ($p \leq 0,05$) и клеток активированной микроглии ($p \leq 0,01$), экспрессирующих CD38, а также тенденции к увеличению количества нейронов, экспрессирующих CD38, что согласуется с данными зарубежных исследователей об увеличении количества CD38-экспрессирующих астроцитов и микроглии, а также о реактивном астроглиозе и нейровоспалении при болезни Паркинсона [2, 3, 4, 5, 7, 9, 11].

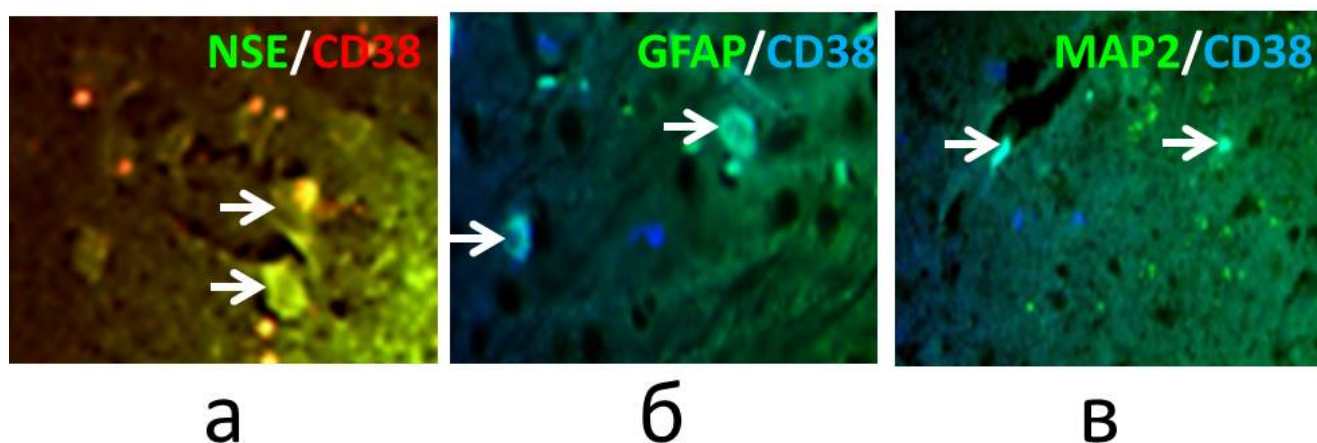


Рисунок 1. Экспрессия CD38 на нейронах (а), астроцитах (б) и клетках микроглии (в) при

болезни Паркинсона (x400, стрелками обозначены клетки, экспрессирующие оба антигена).

Таблица 1. Фенотипирование CD38-позитивных клеток (в % от общего количества клеток) в модели болезни Паркинсона.

Группы животных

Клеточные популяции (в % на 100 клеток)

Нейроны (NSE+)

астроциты (GFAP+)

активированная микроглия (MAP2+)

Контроль (растворитель), n=5

7,3±0,87

3,0±0,60

4,2±0,75

Эксперимент (ротенон), n=5

9,1±0,10

13,3±1,96*

13,1±2,11**

Примечание: * – p при сравнении экспериментальной группы с контролем.

Таким образом, фенотипирование CD38 выявило увеличение его экспрессии при развитии ротенонового паркинсонизма с преимущественной локализацией на астроцитах и микроглии, что подтверждает важную роль астроцитов и клеток активированной микроглии, экспрессирующих CD38, в среднем мозге при экспериментальной болезни Паркинсона.

Список литературы

1. Cuello A. C. Immunohistochemistry II. /ed. A. C. Cuello. Michigan : Wiley, 1993. 456 p.
2. Franco L., Bodrato N., Moreschi I. et al. Cyclic ADP-ribose is a second messenger in the lipopolysaccharide-stimulated activation of murine N9 microglial cell line //J. Neurochem. 2006. Vol. 99(1). P. 165-176.
3. Hirsch E. C., Hunot S. Neuroinflammation in Parkinson's disease: a target for neuroprotection? //Lancet Neurol. 2009. Vol. 8(4). P. 382-397.
4. Hirsch E. C., Vyas S., Hunot S. Neuroinflammation in Parkinson's disease //Parkinsonism Relat. Disord. 2012. Vol. 18, Suppl. 1. P. S210-S212.
5. Kou W., Banerjee S., Eudy J. et al. CD38 regulation in activated astrocytes: implications for neuroinflammation and HIV-1 brain infection //J. Neurosci. Res. 2009. Vol. 87(10). P.

2326-2339.

6. Mamik M. K., Banerjee S., Walseth T. F. et al. HIV-1 and IL-1 β regulate astrocytic CD38 through mitogen-activated protein kinases and nuclear factor- κ B signaling mechanisms //J Neuroinflammation. 2011. Vol. 8. P. 1-13.
 7. Mayo L., Jacob-Hirsch J., Amariglio N. et al. Dual role of CD38 in microglial activation and activation-induced cell death //J. Immunol. 2008. Vol. 181(1). P. 92-103.
 8. Olanow C. W., Tatton W. G. Etiology and pathogenesis of Parkinson's disease //Annu. Rev. Neurosci. 1999. Vol. 22. P. 123-144.
 9. Sekiyama K., Sugama S., Fujita M. et al. Neuroinflammation in Parkinson's Disease and Related Disorders: A Lesson from Genetically Manipulated Mouse Models of α -Synucleinopathies //Parkinsons Dis. 2012. Vol. 2012. P. 1-8.
 10. Sulzer D., Surmeier D. J. Neuronal vulnerability, pathogenesis, and Parkinson's disease //Mov. Disord. 2013. Vol. 28(1). P. 41-50.
 11. Yamada M., Mizugushi M., Otsuka N. et al. Ultrastructural localization of CD38 immunoreactivity in rat brain //Brain Res. 1997. Vol. 756, №1-2. P. 52-60.
- {social}