

ИЗМЕНЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ СФИНГОЛИПИДОВ В НИГРОСТРИАТНОЙ ДОФАМИНЕРГИЧЕСКОЙ СИСТЕМЕ МОЗГА У МЫШЕЙ НА НЕЙРОТОКСИЧЕСКОЙ МОДЕЛИ БОЛЕЗНИ ПАРКИНСОНА

© 2021 г. А. В. Алесенко^{1, *}, В. Е. Блохин², М. А. Шупик¹, У. А. Гутнер¹, А. Т. Лебедев³,
О. А. Малошицкая^{1, 3}, С. А. Соколов³, М. В. Угрюмов²

¹Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля, Москва, Россия

²Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, Москва, Россия

³Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

Поступила в редакцию 28.10.2020 г.

После доработки 16.12.2020 г.

Принята к публикации 19.01.2021 г.

Показано, что сфинголипиды необходимы для нормального функционирования нейронов, а нарушение их метаболизма сопровождается развитием болезней мозга, включая болезнь Паркинсона (БП). Поскольку возможности для изучения роли сфинголипидов в патогенезе БП на больных крайне ограничены, для решения этой задачи необходимо использовать экспериментальные модели. Так, в данной работе с помощью хромато-масс-спектрометрии впервые изучено содержание ключевых молекулярных видов сфинголипидов – суммарных церамидов, гексозилцерамидов и их молекулярных видов, сфингозина и сфинганина, обладающих проапоптотическими свойствами, у мышей на модели клинической стадии БП. Эта модель получена путем системного введения 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридин (МФТП), который в мозге превращается в МФТП+ – токсин катехоламинергических нейронов. В контроле вместо МФТП вводили 0.9% NaCl. Было показано, что общая концентрация всех изученных сфинголипидов увеличивается в черной субстанции – в месте локализации тел дофаминергических нейронов, по сравнению с контролем. Это происходит за счет увеличения концентрации церамидов, связанных с жирными кислотами, таких как C18:1/14:0, C18:1/18:0, C18:1/24:1, а также моногексозилцерамидов, связанных с жирными кислотами, таких как C18:1/18:0 и C18:1/24:1. В отличие от черной субстанции, в стриатуме – месте проекции дофаминергических аксонов, изменения в содержании сфинголипидов не было обнаружено. Полученные данные свидетельствуют о том, что гибель нигростриатных дофаминергических нейронов на модели БП сопровождается изменением метаболизма сфинголипидов, что открывает новые возможности для изучения их роли в патогенезе этого заболевания и поиска нового класса препаратов, корректирующих метаболизм сфинголипидов.

Ключевые слова: болезнь Паркинсона, МФТП-модель, черная субстанция, стриатум, мышцы, церамид, гексозилцерамид, сфингозин, сфинганин, масс-спектрометрия

DOI: 10.31857/S1027813321020023

ВВЕДЕНИЕ

В последние десятилетия накоплены многочисленные клинические и экспериментальные данные, свидетельствующие о важной роли сфинголипидов и их производных в патогенезе болезней мозга, таких как рассеянный склероз, болезнь Гоше, болезнь Альцгеймера [1–4]. В основе патогенеза этих заболеваний лежит нарушение функций специфических нейронов – дифференцировки и межнейрональной сигнализации, а также некроза и апоптоза, в регуляции которых принимают участие такие простые

сфинголипиды как церамид, сфингозин, сфингозин-1-фосфат и гликозилцерамид (рис. 1) [5–7]. Все перечисленные классы сфинголипидов, как показано пока еще в немногочисленных исследованиях, включая и модельные эксперименты, претерпевают значительные изменения в ходе развития нейродегенеративных патологий, в том числе и БП [1, 8–11].

В последние годы появились первые доказательства участия сфинголипидов в патогенезе БП. Так, при БП, как и при болезни Гоше, выявлена мутация гена глюкоцереброзидазы – фермента, расщепляющего сфинголипид гликозилцерамид до глюкозы и церамида [12]. Кроме того,

* Адресат для корреспонденции: 119334 Россия, Москва, ул. Косыгина, 4, e-mail: alicealessenko@gmail.com.

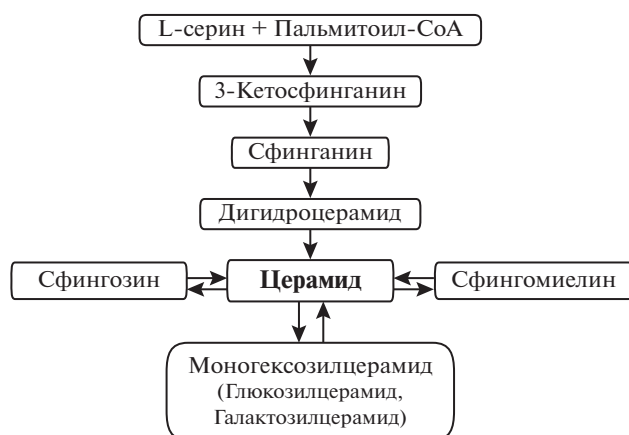


Рис. 1. Схема метаболизма церамида, моногексозилцерамида, сфинганина и сфингозина.

есть основания считать, что нарушение метаболизма церамида определенным образом связано с развитием синуклеинопатии [9] и образованием телец Леви – ключевого маркера БП [13]. Эти пионерские исследования открывают широкую перспективу для исследований роли сфинголипидов в молекулярных механизмах патогенеза БП, особенно нейродегенерации и нейропластичности.

Было установлено, что метаболические изменения в системе сфинголипидов при начальных стадиях БП сопровождаются увеличением риска развития данного заболевания, в том числе и с дементными осложнениями, а коррекция уровня отдельных видов сфинголипидов путем регулирования активности ферментов, участвующих в их метаболизме, может либо замедлить, либо предупредить развитие данной патологии [14]. Такие исследования непременно дадут возможность обнаружить новые мишени из числа ферментов сфинголипидного метаболизма и создать новые лекарственные средства для предупреждения и лечения болезни Паркинсона.

Учитывая то, что возможности проведения исследований на больных при БП, как и при большинстве других болезней мозга, крайне ограничены, особое значение приобретает возможность проведения систематических исследований на экспериментальных генетических и нейротоксических моделях БП. Поэтому целью данной работы явился анализ содержания сфинголипидов у мышей на разработанной нами ранее нейротоксической модели ранней клинической стадии БП.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Животные. В данной работе использованы 16 самцов мышей линии C57Bl/6J в возрасте от 2 до 2,5 мес. и весом от 23 до 25 г. Животных содержали в виварии с 12 часовым циклом дня и ночи и сво-

бодным доступом (*ad libitum*) к пище и воде. Все манипуляции с животными были проведены в соответствии с национальными и международными требованиями и правилами, утвержденными комитетом по охране животных ФГБУН Института биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН.

Моделирование болезни Паркинсона и подготовка для анализа сфинголипидов. Мышам в контрольной группе ($n = 6$) 4 раза с интервалом в 2 ч подкожно вводили физиологический раствор. Для моделирования БП мышам ($n = 10$) четырежды с интервалом в 2 ч подкожно вводили МФТП в физрастворе (Sigma-Aldrich, США) в однократной дозе 10 мг/кг. Через 2 нед. после введения МФТП или физраствора мышей наркотизировали изофлураном (KentScientific, США), декапитировали и вычленили мозг. Из мозга при 4°C под контролем бинокулярной лупы выделяли росто-дорзальную область стриатум и черную субстанцию в соответствии с атласом мозга мышей. Кусочки ткани взвешивали, замораживали в жидком азоте и хранили при -70°C до измерения содержания сфинголипидов.

Липиды выделяли из плазмы по методу Блайя–Дайера [15].

Масс-спектрометрическое детектирование молекулярных видов сфингомиелинов, церамидов и сфингоидных оснований (сфингозина и сфинганина), а также галактозилцерамидов проводили с помощью прибора TSQ Endura (Thermo Fisher Scientific; Германия) в режиме мониторинга множественных реакций (MMP) при давлении в ячейке соударений 2.0 мТорр. Разрешение на Q1 и Q3 составляло 1.2 Да. Для церамидов фрагментацию исходных протонированных и дегидратированных молекул проводили при энергии 20 эВ до иона с отношением массы к заряду (m/z) 264.2 Да, время накопления сигнала составляло 35 мс. Для сфингомиелинов фрагментацию исходных протонированных молекул проводили при энергии 20 эВ до иона с m/z 184.1 Да, время накопления сигнала составляло 35 мс. Для сфингозина и его дейтерированного стандарта (d7, Avanti; США) фрагментацию протонированных молекул проводили при энергии 12.5 эВ до ионов с m/z 259.3 и 252.3 Да, соответственно, время накопления сигнала составляло 35 мс. Для сфинганина фрагментацию исходной протонированной молекулы проводили при энергии 12.5 эВ до иона с m/z 266.3 Да, время накопления сигнала составляло 35 мс. Для галактозилцерамида d18:1/18:0: ион $[M + H]^+$ с массой 728.5 Да. Использовали следующие параметры источника ионизации: температура нагревателя 300°C, температура капилляра 340°C, поток газа завесы – 45 п.е. (приборные единицы), поток вспомогательного газа – 13 п.е., поток продувочного газа – 1 п.е. В качестве стандартов использовали сфингозин d7, сфинганин, сфинго-

Таблица 1. Содержание сфингомиелинов, церамидов и моногексозилцерамидов в стриатуме и черной субстанции контрольных мышей и при введении МФТП

Группа	СФМ, нг/10 мг ткани		Цереброзиды, нг/10 мг ткани		Церамиды, нг/10 мг ткани	
	стриатум	ЧС	стриатум	ЧС	стриатум	ЧС
Контроль	9934.78 ± 1483.14	13594.24 ± 860.14	6156.11 ± 1079.42	12918.01 ± 1062.12	1948.55 ± 230.97	804.87 ± 73.25
БП	14056.55 ± 1047.92	20068.72 ± 1643.55	8703.38 ± 1174.79	17033.41 ± 1680.14	1874.10 ± 206.76	1575.66 ± 440.24

миелин d18:1/16:0, сфингомиелин d18:1/18:0, церамид d18:1/16:0, церамид d18:1/18:1, церамид d18:1/18:0, церамид d18:1/24:1, церамид d18:1/24:0, галактозилцерамид d18:1/18:0 (Avanti; США).

Хроматографическое разделение проводили с использованием системы Ultimate 3000 (Thermo Fisher Scientific; Германия) на колонке Eclipse Plus C8 3.0 × 150 мм (Agilent; США), размер частиц 3.5 мкм. Температура составляла 50°C, поток – 400 мкл/мин. При определении сфингозина, церамидов и сфингомиелина использовали следующие составы мобильных фаз: фаза А – вода + 0.1% (по объему) муравьиной кислоты, фаза Б – метанол + 0.1% (по объему) муравьиной кислоты (0.7 мин 55% фазы Б, 100% фазы Б к 6, 7-й мин, 100% фазы Б до 12-й мин, 55% фазы Б от 13-й до 17-й мин, 55% фазы Б к 13-й мин). При определении сфинганина использовали следующие составы мобильных фаз: фаза А – вода + 0.1% (по объему) муравьиной кислоты, фаза Б – 50% метанол + 50% ацетонитрил + 0.1% (по объему) муравьиной кислоты (1.5 мин 20% фазы Б, 100% фазы Б к 3, 2-й мин, 100% фазы Б до 6, 7-й мин, 20% фазы Б к 7, 7 мин, 20% фазы Б до 10-й мин).

Обработка данных. Относительное содержание церамидов оценивали по внешней калибровке (метод стандарта). В качестве стандарта использовали смесь церамидов Ceramide Porcine Brain 860052P (Avanti; США) с содержанием церамида d18:1/18:0 50% и d18:1/24:1 20%. Вычисления проводили по площадям пиков ММР-переходов $MH^+ \rightarrow m/z$ 264.4 Да и $(M + H - H_2O)^+ \rightarrow m/z$ 264.4 Да. Содержание сфингозина d18:1 определяли по внутренней калибровке (метод внутреннего стандарта, стандарт D-erythro-sphingosine d7, Sigma; США) по площадям ММР-переходов (m/z 300 $^+ \rightarrow m/z$ 252.3 Да для недеитерированного и m/z 307 $^+ \rightarrow m/z$ 259.3 Да для дейтерированного сфингозина). Содержание сфинганина d18:0 определяли по внешней калибровке (стандарт – DL-erythro-dihydrosphingosine, Sigma; США) по площадям ММР-переходов m/z 302 $^+ \rightarrow m/z$ 266.3 Да.

Статистическая обработка результатов. Размер выборок для биохимического анализа составил 3 и 5 в каждой из экспериментальных групп, т.е. статистика сделана для $n = 3$ и $n = 5$ в контрольной и подопытной группах. Достоверность различий оценивалась для 2 независимых выборок по

критерию Манна-Уитни. Для всех видов анализа достоверными считали различия при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Церамиды. В стриатуме у мышей в контроле общая концентрация всех молекулярных видов церамидов примерно в 2 раза выше, чем в черной субстанции. Около 80% церамидов в стриатуме представлено молекулярным видом C18:1/18:0. В черной субстанции основной вклад в общую концентрацию церамидов вносят C18:1/18:0 (34%) и C18:1/24:1 (9%). Молекулярные виды церамидов C18:1/14:0, C18:1/14:1, C18:1/16:1, C18:1/18:1, C18:1/20:1, C18:1/22:1, C18:1/26:0 и C18:1/26:1 либо определяются на грани разрешения метода, либо вообще не определяются (рис. 2а, б).

В стриатуме у мышей на модели БП общая концентрация всех изученных и отдельных церамидов была на уровне контроля. В черной субстанции у мышей на модели БП суммарная концентрация церамидов увеличилась по сравнению с контролем вдвое, в основном за счет двукратного увеличения концентрации молекулярных видов C18:1/16:0, C18:1/18:0 и C18:1/24:1. Также как и в контроле, молекулярные виды церамидов C18:1/14:0, C18:1/14:1, C18:1/16:1, C18:1/18:1, C18:1/20:1, C18:1/22:1, C18:1/26:0 и C18:1/26:1 определяются на грани разрешения или вообще не определяются (рис. 2а, б).

Моногексозилцерамиды. Общая концентрация всех изученных моногексозилцерамидов в стриатуме у мышей в контроле была примерно в три раза ниже, а в черной субстанции примерно в 1.5 раза ниже, чем общая концентрация церамидов (табл. 1). У мышей на модели БП отмечена тенденция к увеличению общей концентрации моногексозилцерамидов, в стриатуме и в черной субстанции по сравнению с контролем. Увеличение общей концентрации моногексозилцерамидов в черной субстанции (табл. 1) обеспечивается за счет увеличения концентрации двух молекулярных видов – C18:1/18:0 и C18:1/24:1 (рис. 3). Следует отметить, что большая часть других молекулярных видов моногексозилцерамидов в стриатуме и в черной субстанции в контроле и в опыте не определяется.

Сфингоидные основания. Анализ сфингозина и сфинганина, способных более активно вызывать апоптоз, чем церамиды, в клетках ЦНС [21] показал,

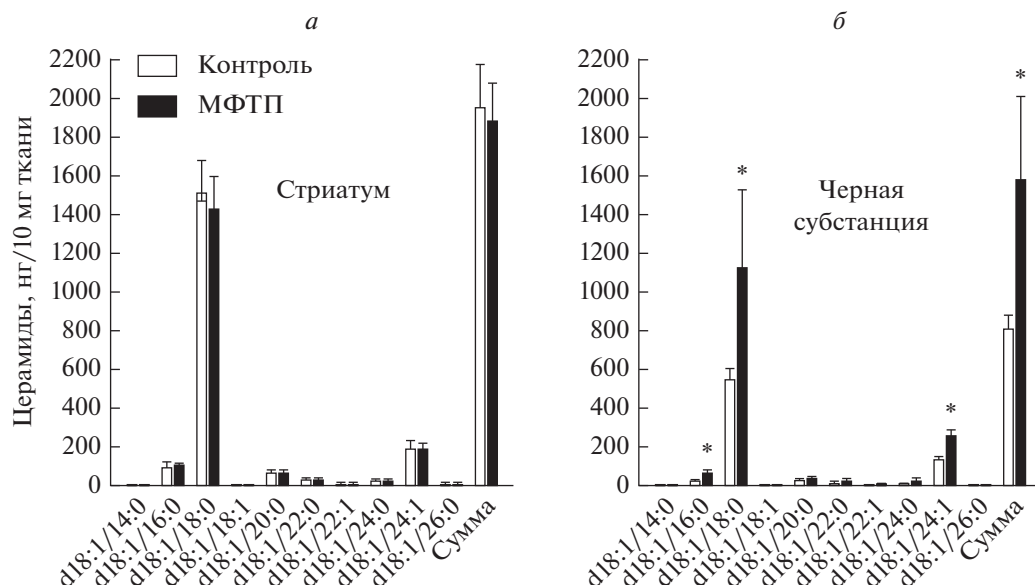


Рис. 2. Изменение содержания молекулярных видов церамидов в стриатуме и черной субстанции мозга мышей после введения физиологического раствора (контроль) и после четырехкратного введения 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридина (МФТП) в разовой дозе 10 мг/кг (4×10). Статистическая значимость: * $p < 0.05$ — относительно контроля.

что наблюдается значительное накопление сфингозина, обладающего выраженными проапоптотическими свойствами, в черной субстанции по сравнению с контролем на клинической стадии заболевания (рис. 4). В стриатуме таких резких изменений нет (рис. 4). Изменений в количестве

сфинганина по отношению к контрольным значениям в расчетах на ткань в стриатуме не происходит, но в черной субстанции наблюдается тенденция к повышению уровня этого сфинголипида, также обладающего апоптотическими свойствами. Однако следует отметить, что доля сфинганина и сфингозина в общем содержании сфинголипидов в нигростриатной системе у мышей в контроле и в опыте ничтожно мала. Тем не менее, концентрация сфингозина в стриатуме и в черной субстанции в контроле в несколько раз выше, чем концентрация сфинганина.

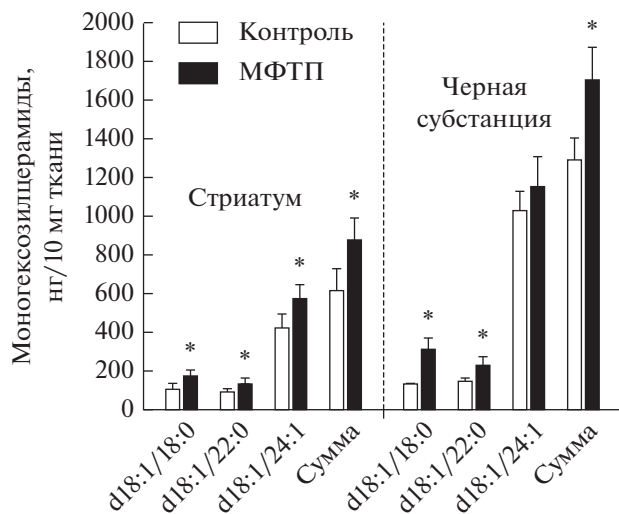


Рис. 3. Изменение содержания молекулярных видов моногалактозилцерамидов в стриатуме и черной субстанции мозга мышей после введения физиологического раствора (контроль) и после четырехкратного введения 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридина (МФТП) в разовой дозе 10 мг/кг (4×10). Статистическая значимость: * $p < 0.05$ — относительно контроля.

ОБСУЖДЕНИЕ

В данной работе была поставлена задача выяснить, можно ли воспроизвести на модели БП характерное для больных при нейродегенеративных заболеваниях нарушение метаболизма наиболее функционально значимых сфинголипидов — церамидов, включая моногалактозилцерамиды, а также сфинганина и сфингозина. Если это возможно, то откроются большие перспективы для изучения молекулярных механизмов и регуляции метаболизма сфинголипидов при БП. Метаболизм церамидов и галактозилцерамидов тесно связаны друг с другом (рис. 1) [16]. Гликозилсфинголипиды являются производными церамидов, к которым добавляется один или несколько сахарных остатков, присоединенных с помощью гликозидной связи к 1 гидроксигруппе церамида.

Для решения поставленной задачи была выбрана разработанная нами ранее острая модель

ранней клинической стадии БП, полученная на мышцах с помощью системно вводимого 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридина (МФТП), который при поступлении в мозг превращается в МФП+ — специфический токсин катехоламинергических нейронов, включая дофаминергические нейроны [17]. Проведенный в последние года тщательный анализ этой модели показал, что она в гораздо большей степени, чем другие известные модели БП, воспроизводит фенотип этого заболевания [18–21]. Выбор области мозга для изучения был предопределен тем, что именно дофаминергические нейроны nigrostriатной системы являются ключевым звеном регуляции двигательной функции [22]. Именно в этой структуре мозга нейроны подвергаются гибели по апоптотическому типу в результате действия МФТП [23, 24].

На модели БП и в контроле с помощью максимально чувствительного метода — масс-спектрометрии измеряли отдельно в черной субстанции и в стриатуме содержание указанных выше сфинголипидов, обладающих в значительной степени проапоптотическими свойствами. В данной работе показано, что концентрация суммарной фракции церамидов, особенно фракций С:18:1/18:0 и С:18:1/24:1, у мышей в черной субстанции на модели БП увеличена почти вдвое по сравнению с контролем. Напротив, в стриатуме изменений по этим показателям не было обнаружено. Полученные данные свидетельствуют о том, что метаболизм церамидов существенно изменился только в той области nigrostriатной системы, в которой произошла дегенерация дофаминергических нейронов. В той же области, где произошла только дегенерация аксонов этих нейронов, метаболизм церамидов не изменился. В дальнейшем необходимо выяснить, какие молекулярные механизмы лежат в основе нарушения метаболизма церамидов в черной субстанции и характерны ли эти изменения для нейронов и/или для глии.

По нашим данным, помимо церамидов, в nigrostriатной системе у мышей на модели БП также увеличилось содержание суммарной фракции моногексозилцерамидов по сравнению с контролем. Это особенно характерно для молекулярных видов с длинной цепью С18:0 и С24:1. Важно отметить, что, в отличие от церамидов, содержание молекулярных видов моногексозилцерамидов, у которых длина жирнокислотной цепи совпадает с церамидами, повышается не только в черной субстанции, но и в стриатуме. Эти результаты демонстрируют, с одной стороны, связь метаболизма этих сфинголипидов, а с другой — то, что дегенерация дофаминергических аксонов, также как и дегенерация тел нейронов, сопровождается нарушением метаболизма сфинголипидов, хотя и в меньшей степени.

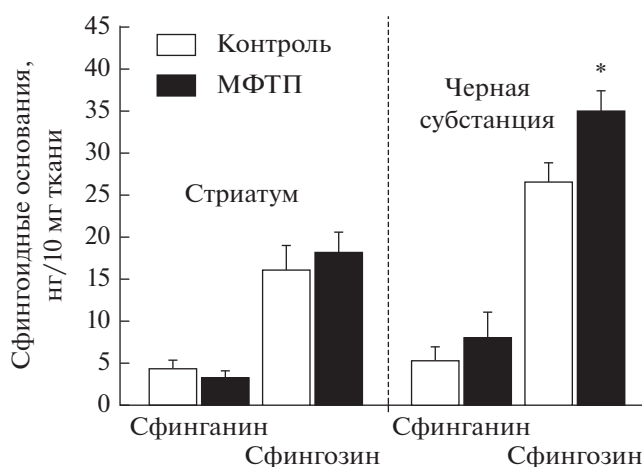


Рис. 4. Изменение содержания сфинганина и сфингозина в стриатуме и черной субстанции мозга мышей после введения физиологического раствора (контроль) и после четырехкратного введения 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридина (МФТП) в разовой дозе 10 мг/кг (4 × 10). Статистическая значимость: **p* < 0.05 — относительно контроля.

Следует отметить, что роль сфинголипидов в патогенезе БП не ограничивается нарушением межнейрональной сигнализации и стимулированием апоптоза, а также распространяется на формирование патологически измененного α-синуклеина. Так, при БП снижается активность глюкоцереброзидазы (ГЦ) — фермента, расщепляющего глюкозилцерамид до глюкозы и церамида. Это сопровождается накоплением в лизосомах глюкозилцерамида, который стабилизирует агрегированную олигомерную токсичную форму α-синуклеина [9, 14].

Особого внимания заслуживают полученные нами данные о содержании сфингоидных оснований — сфингозина и сфинганина, в nigrostriатной системе у мышей при моделировании БП. Оказалось, что у мышей на модели БП изменяется содержание только сфингозина и только в черной субстанции — оно увеличивается. В дальнейших исследованиях важно понять, какие последствия это может иметь для больного с учетом его способности индуцировать апоптоз [25–27]. Этот сфинголипид вызывает дегенерацию ДНК [28], передает токсический сигнал от фактора некроза опухоли-α [25], индуцирует окислительный стресс, активирует каспазы [27] и многие другие сигнальные молекулы апоптоза. Некоторые свойства сфингозина характерны также и для другого сфингоидного основания — дигидросфингозина или сфинганина — предшественника сфингозина в процессе его синтеза (рис. 1).

Мы впервые продемонстрировали участие сфингоидных оснований в гибели дофаминергических нейронов в черной субстанции при БП.

Однако ранее в ряде работ [29] было обнаружено, что гликозилированный сфингозин, который образуется в результате деацилирования из глюкозилцерамида, обладает более высоким токсическим эффектом на нейроны и другие клетки, чем церамид. Его содержание при болезни Гоше даже выше, чем глюкозилцерамида.

Оценивая в целом полученные в данной работе результаты, можно считать, что среди них самым важным является повышение уровня большинства из изученных сфинголипидов в черной субстанции у мышей на модели БП. Хотя до сих пор отсутствуют попытки оценить изменение содержание сфинголипидов в нигростриатной системе у больных при БП на патологическом материале, данные, полученные нами на модели БП, хорошо согласуются с данными, полученными при изучении коры мозга больных при болезни Альцгеймера [30]. Это в определенной степени означает, что использованная нами нейротоксическая модель БП адекватно воспроизводит изменение метаболизма сфинголипидов у больных при нейродегенеративных заболеваниях, что делает возможным переход к изучению молекулярных механизмов этого патологического процесса.

Таким образом, на нейротоксической модели БП получены доказательства того, что развитие этого заболевания может сопровождаться нарушением метаболизма сфинголипидов, вовлеченных в регуляцию дифференцировки и гибели нейронов

ВЫВОДЫ

На мышинной модели БП с введением подкожно 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропириндин (МФТП) показаны изменения в молекулярных видах церамидов, гексозилцерамидах, сфингозине и сфинганине.

Довольно значительные изменения происходят в сфингоидном основании — сфингозине в черной субстанции на клинической стадии заболевания, когда отмечается гибель нейронов. Эти данные получены впервые при изучении новых механизмов БП.

Применение метода масс-спектрометрии позволило изучить специфические различия в спектре молекулярных видов церамидов и гексозилцерамидов в процессе развития БП по сравнению с контролем. Отмечено повышение уровня церамидов с насыщенными жирными кислотами. Более глубокое понимание биологических путей, регулирующих метаболизм различных сфинголипидов при развитии БП, может привести к идентификации мишеней для лекарственных препаратов. В качестве таких мишеней могут выступить ферменты метаболизма сфинголипидов, участвующих в патогенезе БП. Таким образом, подробное изучение

изменений в метаболизме сфинголипидов при БП позволит более подробно понять патологические аспекты БП и создать новые лекарственные средства для лечения данной нейродегенеративной патологии.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ-КОМФИ 18-00-01334.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Этическое одобрение. Все манипуляции с животными были проведены в соответствии с национальными и международными требованиями и правилами, утвержденными комитетом по охране животных ФГБУН Института биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН. Протокол № 27 от 04.07.2019 г.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Alessenko A.V., Albi E.* Front Neurol. 2020 May 21; 11:437.
2. *Gutner U.A., Shupik M.A., Maloshitskaya O.A., Sokolov S.A., Rezyukh A.P., Funikov S.Y., Lebedev A.T., Ustyugov A.A., Alessenko A.V.* // Biochemistry (Mosc.). 2019. V. 84(10). P. 1166–1176.
3. *Sardi S.P., Viel C., Clarke J., Treleaven C.M., Richards A.M.* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2017 V. 114(10). P. 2699–2704.
4. *Wang, G., Bieberich, E.* // Adv. Biol. Regul. 2018. V. 70. P. 51–64.
5. *Hannun Y.A., Obeid L.M.* // Nat. Rev. Mol. Cell. Biol. 2008. V. 9(2). P. 139–150.
6. *Maceyka M., Spiegel S.* // Nature. 2014. V. 510. P. 58–67.
7. *Trayssac M., Hannun Y.A., Obeid L.M.* // J. Clin. Invest. 2018. V. 128(7):2702-2712.
8. *Alecu I., Bennett S.* // Front. Neurosci. 2019. V. 13. P. 328–332.
9. *Galvagnion C.* // J. Parkinson's Disease. 2017. V. 7. P. 433–450.
10. *Xicoy H., Wieringa B., Martens G.J.* // Cells. 2019. V. 8(1). P. 27–33.
11. *Indellicato R., Trinchera M.* // Int. J. Mol. Sci. 2019. V. 20. P. E3304.
12. *Gegg M.E., Schapira A.H.V.* // FEBS J. 2018. V. 285. P. 3591–3603.
13. *Rocha E.M., Smith G.A., Park E., Cao H., Graham A.R., Brown E., McLean J.R. et al.* // Antioxid. Redox. Signal. 2015. V. 23(6). P. 550–564.
14. *Mielke M.M., Maetzler W., Haughey N.J., Bandaru V.V., Savica R., Deuschle C., et al.* // PLoS One. 2013. V. 8(9). P. 73094.
15. *Bligh T.G., Dyer W.J.* // A rapid method of total lipid extraction and purification, Can. J. Biochem. Physiol. 1959. V. 37. P. 911–917.

16. Hannun Y.A., Luberto C. // Trends. Cell. Biol. 2000. V. 10. P. 73–80.
17. 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. // Neuroscience. 2011. V. 181. P. 175–188.
18. Kozina E.A., Kim A.R., Kurina A.Y., Ugrumov M.V. // Neurobiol. Dis. 2017. V. 98. P. 108–121.
19. 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. // J. Neurol. Sci. 2014. V. 340. P. 198–207.
20. Mingazov E.R., Khakimova G.R., Kozina E.A., Medvedev A.E., Buneeva O.A., Bazyan A.S., Ugrumov M.V. // Mol Neurobiol. 2018. V. 55. P. 2991–3006.
21. Kim A., Nigmatullina R., Zalyalova Z., Soshnikova N., Krasnov A., Vorobyeva N., Georgieva S., Kudrin V., Narkevich V., Ugrumov M // Mol. Neurobiol. 2019. V. 56. P. 3437–3450.
22. Nicotra A., Parvez S. // Neurotoxicol. Teratol. 2002. V. 24. P. 599–605.
23. Jackson–Lewis V., Jakowec M., Burke R.E., Przedborski T. // Neurodegeneration. 1995 V.4. P. 257–269.
24. Agid Y. // Lancet. 1991. V. 337. P. 1321–1324.
25. Krown K.A., Page M.T., Nguyen C., Zechner D., Gutierrez V., Comstock K.L. et al. // J. Clin. Invest. 1996. V. 98. P. 2854–2865.
26. Sweeney E.A., Sakakura C., Shirahama T., Masamune A., Ohta H., Hakamori S., Igarashi Y. // Int. J. Cancer. 1996. V. 66. P. 358–366.
27. Cuvillier O., Nava V.T., Murthy S.K., Edsall L.C., Levade T., Milstien S., Spiegel S. // Cell Death Differ. 2001. V. 8. P. 162–171.
28. Tamiya–Koizumi K., Murate T., Suzuki M., Simbulan C.M., Nakagawa M., Takemura M. et al. // Biochem. Mol. Biol. Int. 1997. V. 41. P. 1179–1189.
29. Taguchi Y.V., Liu J., Ruan J., Pacheco J., Zhang X., Abbasi J. et al. J. Neurosci. 2017. V. 37(40). P. 9617–9631.
30. Filippov V., Song M.A., Zhang K., Vinters H.V., Tung S., Kirsch W.M., Yang J., Duerksen-Hughes P.J. 2012. J. Alzheimers. Dis. V. 29. P. 537–547.

Changes in the Content of Sphingolipids in the Nigrostriate Dopaminergic System of the Mice Brain on the Neurotoxic Model of Parkinson's Disease

A. V. Alessenko^a, V. E. Blokhin^b, M. A. Shupik^a, U. A. Gutner^a, A. T. Lebedev^c,
O. A. Maloshitskaya^{a,c}, S. A. Sokolov^c, and M. V. Ugrumov^b

^aEmanuel Institute of Biochemical Physics,
Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

^bKoltsov Institute of Developmental Biology,
Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

^cLomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

It was shown that sphingolipids are necessary for the normal functioning of neurons, and a violation of their metabolism accompanies the development of brain diseases, including Parkinson's disease (PD). Since the possibilities for studying the role of sphingolipids in the pathogenesis of PD in patients are extremely limited, experimental models must be used to solve this problem. Thus, in this work, using the chromatography-mass spectrometry for the first time, we studied the content of key molecular species of sphingolipids – total ceramides, hexosylceramides and their molecular species, sphingosine and sphinganin with proapoptotic properties in mice using a model of the clinical stage of PD. This model was obtained by systemically administering 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP), which in the brain turns into MPP⁺, a toxin of catecholaminergic neurons. In the control, instead of MPTP, 0.9% NaCl was injection. It was shown that the total concentration of all studied sphingolipids increases in the substantia nigra – at the site of dopaminergic neuron bodies localization, compared to the control. This is due to an increase in the concentration of ceramides associated with fatty acids, such as C18:1/14:0, C18:1/18:0, C18:1/24:1, and monohexosylceamides associated with fatty acids such as C18:1/18:0 and C18:1/24:1. Unlike the substantia nigra, in the striatum – the site of projection of dopaminergic axons, no changes in the content of sphingolipids were detected. The obtained data indicate that the death of nigrostriatal dopaminergic neurons in the PD model is accompanied by a change in the metabolism of sphingolipids, which opens up new possibilities for studying their role in the pathogenesis of this disease and searching for a new class of drugs that correct sphingolipid metabolism.

Keywords: Parkinson's disease, MPTP model, substantia nigra, striatum, mice, ceramide, hexosylceramide, sphingosine, sphinganin, mass spectrometry