

Моделирование болезни Паркинсона в эксперименте *in vivo*

А.В. Ставровская, Н.Г. Ямщикова, А.С. Ольшанский, А.С. Гущина

ФГБНУ «Научный центр неврологии» (Москва)

Дегенеративные изменения нервной системы, ассоциированные с возрастом, являются в настоящее время одной из наиболее значимых проблем неврологии. Нейродегенеративные заболевания (болезни Альцгеймера, Паркинсона, Гентингтона и др.) связаны с селективной гибелью определенных групп нейронов в головном и/или спинном мозге и характеризуются неуклонно прогрессирующим неврологическим дефицитом, включая двигательные расстройства, психоэмоциональные и когнитивные нарушения [1]. В изучении патогенеза этих форм патологии большое значение имеет создание адекватных экспериментальных моделей на животных, которое чаще всего осуществляется либо интрацеребральным, либо системным введением соответствующих нейротоксинов [2–4].

Болезнь Паркинсона (БП) – распространенное нейродегенеративное заболевание, 200-летие описания которого широко отмечается в этом году во всем мире. В развитии БП большую роль играют генетические факторы [5–7]. Болезнь Паркинсона характеризуется прогрессирующей потерей дофаминергических нейронов среднего мозга в черной субстанции и, как следствие, значительным (свыше 80%) снижением уровня дофамина в стриатуме. Это приводит к развитию основных двигательных симптомов заболевания: брадикинезии, мышечной ригидности и тремора [8]. Болезнь Паркинсона стала первым неврологическим заболеванием, которое удалось смоделировать, а затем лечить, применяя заместительную нейромедиаторную терапию, – история этого открытия подробно представлена на стр. 10–17 и 31–36. В настоящее время известен ряд моделей БП; для их создания используются вещества, селективно нарушающие или разрушающие катехоламинергические системы. Также было обнару-

жено, что сельскохозяйственные химикаты, такие как ротенон и паракват, при системном введении могут воспроизводить многие типичные характеристики БП у грызунов [3].

На страницах Бюллетеня нам хотелось бы поделиться собственным опытом моделирования БП на крысах с помощью различных химических агентов (6-гидроксидофамин, резерпин и ротенон) с целью сравнительной оценки получаемых экспериментальных моделей.

Моделирование БП проводилось на крысах линии Wistar в возрасте 3–4 мес. Животные содержались в виварии института при свободном доступе к пище и воде и чередовании суточной освещенности 12 ч света/12 ч темноты. Содержание животных и проведение экспериментов осуществляли в соответствии с международными правилами Guide for the Care and Use of Laboratory Animals.

Модель паркинсонизма с использованием 6-гидроксидофамина предполагает прямое введение данного селективного нейротоксина (10,0 мкг в 2 мкл 0,05% раствора аскорбиновой кислоты) в компактную часть черной субстанции. Работа проводилась на 22 крысах-самцах. Ложнооперированным крысам вводили физиологический раствор в том же объеме. Наблюдали развитие эффекта в течение 4 нед после операции. Хирургические манипуляции проводили в соответствии с отработанными протоколами [4, 9, 10].

Резерпиновая модель паркинсонизма достигалась с помощью подкожного введения резерпина в дозе 3 мг/кг (n = 22). Резерпин растворяли в ледяной уксусной кислоте, затем в дистиллированной воде до нужного объема. Ранее нами было показано, что введение такой дозы позволяет наблюдать более отчетливые проявления токсического действия резерпина на поведение экспериментальных

животных, чем введение меньших доз. Это дает возможность исследовать коррекцию вызванных нарушений с помощью тех или иных терапевтических подходов, что не удается сделать при введении больших доз.

Для получения *ротеноновой модели БП* пестицид вводили крысам ежедневно в течение 4 нед ($n = 25$). Ротенон растворяли в диметилсульфоксиде, затем смешивали с растительным маслом в соотношении 2 : 98 [11]. Инъекции осуществляли подкожно, ротенон вводили в дозе 2,5 мг/кг. Все растворы вводили в объеме 1 мл/кг.

После развития паркинсонического синдрома проводили исследование двигательных поведенческих реакций экспериментальных животных и изучение возможной коррекции полученных нарушений. В наших работах в стандартный набор тестов обычно входит изучение изменения двигательной активности в установке “открытое поле”, нарушения когнитивных функций – в приподнятых Т- и Х-лабиринтах, а также методом воспроизведения условных реакций пассивного избегания в специальной камере [2, 12]. Фиксирование и анализ поведенческих экспериментов осуществляются с помощью системы видеонаблюдения за поведением животных ANY-maze. Данные обрабатываются в программе Statistica 12.0 с использованием однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA).

По окончании экспериментов животные декапитируются, затем их мозг извлекают с целью проведения на следующем этапе работы соответствующих иммуногистохимических исследований.

6-гидроксидофаминовая модель. Эффект введения избирательного токсина дофаминергических нейронов 6-гидроксидофамина в черную субстанцию развивается в течение 3–4 нед. К 3-й неделе наблюдения у экспериментальных животных отмечается нарастание мышечной ригидности и птоза, снижение моторики и исследовательского поведения. В этот период двигательная активность крыс приобретает наименьшие значения. Практически у животных развивается адинамия (рис. 1).



Рис. 1. Адинамия на высоте развития паркинсонического синдрома у крыс через 4 нед после введения 6-гидроксидофамина в черную субстанцию. У животного отчетливо виден характерный “горбик”.

Функциональной пробой для выявления одностороннего повреждения дофаминергических нейронов является эффект подкожного введения агониста дофаминовых рецепторов апоморфина в дозе 0,1 мг/кг. После введения препарата у животных наблюдается контралатеральное вращение с интенсивностью около 30 об/мин.

Как и прочие модели, 6-гидроксидофаминовая модель не воспроизводит все клинические и патологические особенности, характерные для БП. В частности, этот нейротоксин не оказывает действия на другие области мозга и не приводит к формированию в нейронах телец Леви.

Несмотря на указанные ограничения, данная модель широко используется для определения эффективности тех или иных противопаркинсонических соединений. Она позволяет проводить работы по исследованию эффектов различных новых видов терапии, в частности эффектов интраназального введения новых пептидных препаратов [13]. Кроме того, в числе перспективных терапевтических опций при БП в настоящее время рассматривается дофаминергическая реиннервация стриатума с помощью трансплантации экзогенных дофаминпродуцирующих клеток, способных обеспечить длительный, стойкий эффект [14]. Как показывает наш опыт, такой подход также весьма удобно исследовать на модели БП, индуцированной 6-гидроксидофамином.

Двигательные и вегетативные нарушения у крыс при разных дозах резерпина

Нарушение	Доза, мг/кг				
	1	2	3	4	5
Снижение двигательной активности в ОП Крысы застывали в центре ОП, куда их помещали первоначально, или перемещались на 3–4 квадрата и застывали около стенки ОП; т.е. начиная с дозы 3 мг/кг и выше наблюдалась полная адинамия	*	**	***	***	***
Ригидность мышц туловища – “симптом горбатости” – уменьшение расстояния от шеи до корня хвоста составляло 1,5–2,5 см	*	**	***	***	***
Тремор (дрожание, вздрагивание)	*	*	*	*	*
Птоз (сужение глазной щели до полного закрытия глаза)	*	**	***	***	***
Дефекация (болюсы)	*	**	***	***	***
Уринация	*	**	***	***	***

Обозначения: ОП – “открытое поле”.

Резерпин-индуцированная модель. В процессе отработки резерпиновой модели нами проводилось изучение поведенческих эффектов различных доз препарата (таблица). Как видно из таблицы, у животных развивались симптомы, характерные для паркинсонизма: гиподинамия (практически адинамия) в “открытом поле” и мышечная ригидность (по показателю “горбатости”). Кроме того, наблюдались птоз и тремор. Эти симптомы появлялись уже через 2 ч и сохранялись в течение 4 дней. После повторного введения

резерпина симптомы были более выраженными, у крыс появлялись признаки катаlepsии.

Полученные двигательные нарушения являются следствием известного эффекта резерпина – истощения внутриклеточного везикулярного пула дофамина. Основным недостатком этой модели является то, что резерпин-индуцированные изменения носят временный характер. Кроме того, введение резерпина вызывает высвобождение и других нейротрансмиттеров, которые могут не вовлекаться напрямую в патогенез БП. Тем не менее эта модель успешно использовалась для исследования терапевтических эффектов препаратов, замещающих стриатный дофамин. Она, по-видимому, является оптимальной для изучения возможности коррекции патологии с помощью интрацеребрального введения различных фармакологических агентов. Однако прогностическая ценность тестирования симптоматических лекарств на резерпиновой модели невелика, поскольку некоторые из препаратов, обращающих резерпин-индуцированные двигательные нарушения, являются неэффективными при БП.

Ротенон-индуцированная модель. При воспроизведении паркинсонизма с помощью системного введения ротенона наблюдаются все присущие данному состоянию симптомы. Однако, по нашим данным, введение ротенона приводит к высокой смертности экспериментальных крыс (рис. 2).

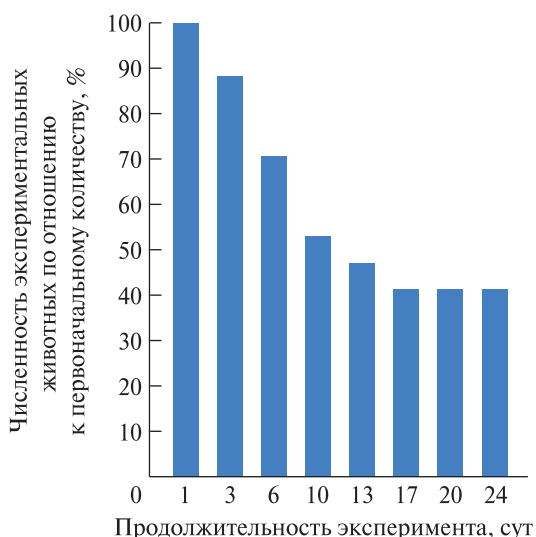


Рис. 2. Снижение численности экспериментальных животных за период исследования с системным введением ротенона.

Ротенон представляет собой липофильное соединение, которое легко проникает через гематоэнцефалический барьер. Хроническое воздействие низких доз ротенона приводит к избирательной прогрессирующей дегенерации nigrostriatalного пути, подобной той, что наблюдается у людей с БП [15], а также к образованию убихитин- и α -синуклеин-позитивных включений в нигральных клетках, которые сходны с тельцами Леви при БП. Можно сказать, таким образом, что ротенонная модель “повторяет” многие ключевые патогенетические механизмы БП. По этой причине испытание нейропротекторных препаратов на данной модели может быть более релевантным, чем на других моделях.

В заключение следует заметить, что не существует какой-то одной модели, которая бы идеально подходила для всех исследований. Модели на животных могут быть полезны для изучения патогенетических механизмов заболевания, для тестирования новых лекарственных препаратов, разработки проблем нейротрансплантации или решения каких-то иных научных задач. Они оцениваются только по степени точности моделирования тех или иных признаков БП, которые исследователь хочет изучить. Каждая модель на животных имеет свои преимущества и недостатки, которые необходимо знать и точно взвешивать при планировании конкретных экспериментов.

Список литературы

- Иллариошкин С.Н. Конформационные болезни мозга. М.: Янус-К, 2003.
- Ставровская А.В., Воронков Д.Н., Ямщикова Н.Г. и др. Опыт экспериментального моделирования болезни Гентингтона // *Анн. клин. и экспер. неврол.* 2015. № 3. С. 49–55.
- Ставровская А.В., Конорова И.Л., Иллариошкин С.Н. и др. Технологии моделирования заболеваний нервной системы // *Неврология XXI века: диагностические, лечебные и исследовательские технологии: Руководство для врачей.* В 3-х т. / Под ред. М.А. Пирадова, С.Н. Иллариошкина, М.М. Танащян. Т. III. Современные исследовательские технологии в экспериментальной неврологии. М.: АТМО, 2015. С. 73–133.

- Meredith G.E., Sonsalla P.K., Chesselet M.F. Animal models of Parkinson's disease progression // *Acta Neuropathol.* 2008. V. 115. P. 385–398.
- Иванова-Смоленская И.А., Маркова Е.Д., Иллариошкин С.Н., Никольская Н.Н. Моногенные наследственные болезни центральной нервной системы // *Наследственные болезни нервной системы.* М.: Медицина, 1998. С. 9–104.
- Иллариошкин С.Н., Zagorovskaya T.B., Markova E.D. et al. Mutation analysis of the parkin gene in Russian families with autosomal recessive juvenile parkinsonism // *Mov. Disord.* 2003. V. 18. P. 914–919.
- Periquet M., Lücking C.B., Vaughan J.R. et al. Origin of the mutations in the parkin gene in Europe: exon rearrangements are independent recurrent events, whereas point mutations may result from founder effects // *Am. J. Hum. Genet.* 2001. V. 68. P. 617–626.
- Savitt J.M., Dawson V.L., Dawson T.M. Diagnosis and treatment of Parkinson disease: molecules to medicine // *J. Clin. Invest.* 2006. V. 116. P. 1744–1754.
- Лебедева О.С., Лагарькова М.А., Киселев С.Л. и др. Морфофункциональные свойства индуцированных плюрипотентных стволовых клеток, полученных из фибробластов кожи человека и дифференцированных в дофаминергические нейроны // *Нейрохимия.* 2013. № 3. С. 233–241.
- Paxinos G., Watson C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates.* San Diego, CA: Academic Press, 1998.
- Drolet R.E., Cannon J.R., Montero L., Greenamyre J.T. Chronic rotenone exposure reproduces Parkinson's disease gastrointestinal neuropathology // *Neurobiol. Dis.* 2009. V. 36. P. 96–102.
- Ставровская А.В., Воронков Д.Н., Ямщикова Н.Г. и др. Морфохимическая оценка результатов нейротрансплантации при экспериментальном паркинсонизме // *Анн. клин. и экспер. неврол.* 2015. № 2. С. 28–32.
- Filatova E., Shadrina M., Kolomin T. et al. Synthetic peptides affect the expression of Gdnf and Gdnf receptors in rats with 6-OHDA-induced PD-like parkinsonism // *World J. Neurosci.* 2016. V. 6. P. 243–259.
- Airavaara M., Voutilainen M.H., Wang Y., Hoffer B. Neurorestoration // *Parkinsonism Relat. Disord.* 2012. V. 18. P. S143–S146.
- Betarbet R., Sherer T.B., MacKenzie G. et al. Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson's disease // *Nat. Neurosci.* 2000. V. 3. P. 1301–1306.

