

УДК 577.175.82

Провокационный тест с моноидтирозином на экспериментальной модели болезни Паркинсона

А. Р. Ким*, Е. Н. Павлова, В. Е. Блохин, В. В. Богданов, М. В. Угрюмов

Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, Москва, 119334 Россия

*E-mail: alexandrrkim@gmail.com

Поступила в редакцию 09.04.2021

Принята к печати 03.06.2021

DOI: 10.32607/actanaturae.11399

РЕФЕРАТ Ранняя (доклиническая) диагностика болезни Паркинсона остается актуальной задачей современных нейронаук. С целью выявления скрытой функциональной недостаточности nigrostriатной системы разработан диагностический провокационный тест с использованием эндогенного ингибитора тирозингидроксилазы – моноидтирозина (МИТ). Показано, что МИТ в дозе 100 мг/кг через 2 ч после подкожного введения снижает уровень дофамина в стриатуме интактных мышей на 34%, при этом дальнейшее увеличение дозы не усиливает наблюдаемый эффект. Введение выбранной дозы МИТ вызвало симптомы моторных нарушений на нейротоксической модели доклинической стадии болезни Паркинсона у мышей, но не в контроле. Это связано с тем, что только на модели болезни Паркинсона у мышей воздействие МИТ привело к снижению уровня дофамина в стриатуме до порога проявления двигательных симптомов. Таким образом, на экспериментальной модели доклинической стадии болезни Паркинсона у мышей показана эффективность провокационного теста с МИТ для выявления скрытой функциональной недостаточности nigrostriатной системы.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА болезнь Паркинсона, ранняя диагностика, провокационный тест, моноидтирозин, МФТП.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ БП – болезнь Паркинсона; ВЭЖХ-ЭД – высокоэффективная жидкостная хроматография с электрохимической детекцией; МИТ – моноидтирозин; МФТП – 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридин; ТГ – тирозингидроксилаза; ЧС – черная субстанция.

ВВЕДЕНИЕ

В основе патогенеза болезни Паркинсона (БП) – распространенного нейродегенеративного заболевания, лежит деградация nigrostriатной системы мозга, осуществляющей регуляцию двигательной функции [1]. Для БП характерна продолжительная бессимптомная доклиническая стадия, на которой происходит активация механизмов, компенсирующих развивающуюся функциональную недостаточность nigrostriатной системы [2]. Только через 20–30 лет после начала заболевания при гибели более половины дофаминергических нейронов в черной субстанции (ЧС) и снижения уровня дофамина в стриатуме ниже порогового значения (20–30% от исходного уровня) у больного проявляются специфические моторные нарушения, позволяющие поставить диагноз [3].

В связи с этим актуальной становится разработка способа выявления скрытой нейродегенерации в nigrostriатной системе, который позволит поставить

диагноз БП задолго до перехода заболевания в необратимую клиническую стадию. Одним из наиболее перспективных подходов считается провокационный тест, суть которого заключается в кратковременном и обратимом ингибировании тирозингидроксилазы (ТГ), ключевого фермента синтеза дофамина [4]. Использование такого ингибитора в дозе, понижающей уровень дофамина в стриатуме на 30–40% от исходных значений, не вызовет нарушений моторики у здоровых людей. В свою очередь, на доклинической стадии БП уровень дофамина в стриатуме изначально снижен и дальнейшее его понижение под воздействием ингибитора приведет к достижению порога, при котором проявятся моторные симптомы, что позволит поставить диагноз [5].

В качестве такого провокационного агента мы использовали моноидтирозин (МИТ) – обратимый ингибитор ТГ, который присутствует в организме как промежуточный продукт синтеза тиреоидных

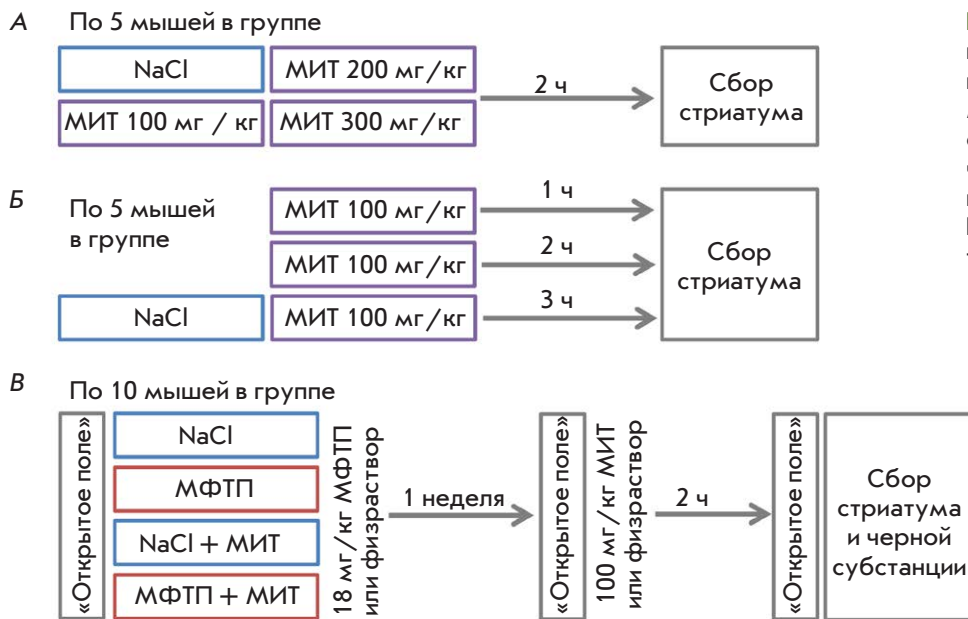


Рис. 1. Схемы экспериментов: подбор дозы МИТ (А), времени после его введения на интактных мышах (Б) и провокационный тест с МИТ на МФТП-модели доклинической стадии болезни Паркинсона (В). МИТ – моноидотирозин, NaCl – физиологический раствор, МФТП – 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридин

гормонов [6]. В отличие от синтетических ингибиторов, таких, как α -метил-*n*-тирозин, МИТ имеет эндогенное происхождение и подвергается быстрому метаболизму, что минимизирует время ингибирования синтеза дофамина и снижает риск побочных эффектов [7].

Цель нашей работы состояла в экспериментальной разработке провокационного теста с помощью МИТ для определения скрытой нейродегенерации на модели доклинической стадии БП у мышей. В качестве такой модели использовали созданную ранее в нашей лаборатории нейротоксическую модель доклинической стадии БП, основанную на дозированном системном введении мышам 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридина (МФТП) – предшественника нейротоксина дофаминергических нейронов [8].

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали 80 самцов мышей линии C57BL/6 в возрасте 2–2,5 месяца и массой 22–26 г (питомник «Столбовая»), которых содержали в стандартных условиях вивария со свободным доступом к пище и воде. Проведение экспериментов с животными одобрено этическим комитетом Института биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН (протокол № 43 от 19.11.2020 г.).

В ходе работы выполнено три эксперимента (рис. 1). В первом оценили влияние разных доз МИТ на уровень дофамина в стриатуме интактных мышей и выбрали оптимальную дозу для дальнейшего анализа (рис. 1А). Во втором эксперименте выбранную дозу МИТ (100 мг/кг) использовали для оценки фармакодинамики и определения оптимального временного интервала после введения, при котором наблю-

дается наиболее сильное снижение уровня дофамина в стриатуме интактных мышей (рис. 1Б). Третий эксперимент посвящен разработке провокационного теста с МИТ на нейротоксической МФТП-модели доклинической стадии БП у мышей (рис. 1В).

МИТ (здесь и далее, все реактивы – Sigma-Aldrich, США) вводили животным подкожно в указанных дозах, растворяя в физиологическом растворе (0,9% NaCl), содержащем также 5% аскорбиновой кислоты и 0,5% диметилсульфоксида. Контрольные группы получали аналогичный раствор без МИТ. Для моделирования БП на доклинической стадии мышам однократно подкожно вводили МФТП в дозе 18 мг/кг [8]. Контрольные группы получали физиологический раствор.

Двигательную активность мышей оценивали по параметрам пройденного пути и вертикальных стоек в поведенческом тесте «открытое поле». Мышей для адаптации переносили в помещение для тестирования поведения за 2 ч до начала теста. Тест «открытое поле» проводили с помощью автоматизированной поведенческой установки PhenoMaster (TSE Systems, Германия) в течение 6 мин. Параметры рассчитывали с использованием прилагаемого программного обеспечения.

Для сбора структур нигростриатной системы анестезированных изофлураном мышей декапитировали, дорсальный стриатум и ЧС выделяли из мозга согласно ранее описанной методике [8]. Пробы структур мозга взвешивали, замораживали в жидком азоте и хранили при -70°C . Концентрацию дофамина в пробах измеряли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с электрохимической детекцией согласно [9].

Данные представлены в виде среднего (в процентах от контроля) \pm стандартная ошибка среднего. Нормальность данных проверяли с помощью критерия Шапиро–Уилка. Статистический анализ результатов проводили с помощью однофакторного метода ANOVA, параметрического *t*-критерия Стьюдента или непараметрического критерия Манна–Уитни в программном пакете GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software, США). В качестве критерия значимости использовали $p \leq 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Подбор эффективной дозы МИТ и времени после его введения

При подборе дозы МИТ установили, что максимальное снижение концентрации дофамина в стриатуме нормальных мышей (на 34% от уровня в контроле) обеспечивало уже использование 100 мг/кг МИТ (рис. 2А). Однако дальнейшее увеличение дозы МИТ – до 200 и 300 мг/кг – не привело к дальнейшему снижению уровня дофамина (рис. 2А), что указывает на насыщение ТГ ингибитором и отсутствие линейной зависимости МИТ в данном интервале доз. Поэтому для дальнейшей работы в качестве эффективной дозы МИТ выбрали 100 мг/кг.

При анализе временных интервалов установили, что через 1 ч после введения МИТ концентрация дофамина в стриатуме снижается на 22% по сравнению с контролем, через 2 ч – на 35%, а через 3 ч происходит полное восстановление уровня дофамина до контрольных значений (рис. 2Б). Эти результаты подтверждают кратковременность и обратимость ингибирующего действия МИТ на ТГ в стриатуме. Поэтому для разработки провокационного теста с МИТ выбрали временной интервал – 2 ч после введения ингибитора.

Интересно, что, как показано ранее, через 4 ч после введения α -метил-*n*-тирозин в аналогичной дозе (100 мг/кг) снижал уровень дофамина в стриатуме в несколько большей степени – на 40.2% [5]. При этом согласно *in vitro* оценкам, МИТ является более эффективным ингибитором ТГ по сравнению с α -метил-*n*-тирозином [10]. По-видимому, более быстрый метаболизм МИТ при применении его *in vivo* ограничивает его ингибирующее воздействие на ТГ.

Провокационный тест на экспериментальной модели доклинической стадии БП

Важным фактором при моделировании БП является точно установленный порог нейродегенерации, по достижении которого проявляются симптомы двигательных нарушений – это гибель 50–60% тел дофаминергических нейронов в ЧС, снижение числа

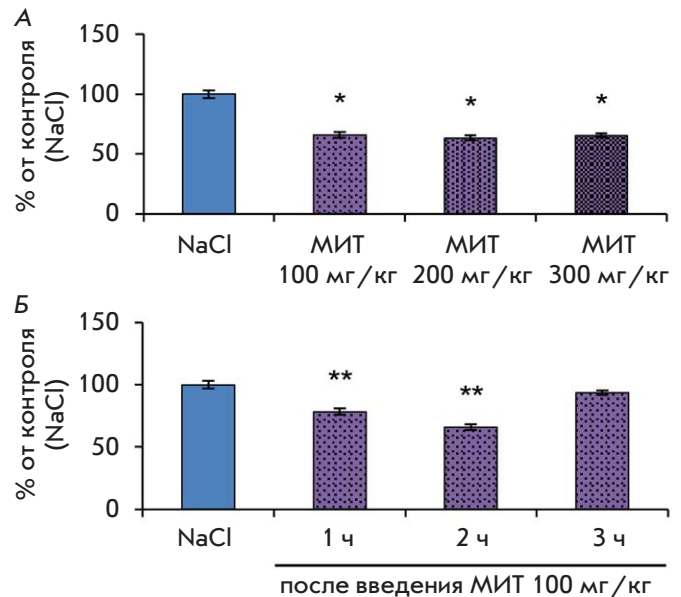


Рис. 2. Дофамин в стриатуме мышей через 2 ч после введения моноидотиросина (МИТ) в различных дозах (А) и через различные сроки после введения 100 мг/кг МИТ (Б). * $p < 0.05$ относительно контроля (NaCl); ** $p < 0.05$ относительно контроля и других групп

их аксонов и концентрации дофамина в стриатуме на 70–80% по сравнению с контролем [8]. Поэтому в качестве ключевых параметров модели доклинической стадии БП мы выбрали отсутствие изменений двигательной активности животных в тесте «открытое поле» и уровня дофамина в ЧС, а также снижение уровня дофамина в стриатуме менее чем на 70%.

Пройденный путь и число вертикальных стоек в тесте «открытое поле» у мышей, получивших 18 мг/кг МФТП, перед введением МИТ (т.е. через 1 неделю после введения МФТП) не отличалось от значений в контроле (рис. 3А, Б). Кроме того, введение МФТП не повлияло на уровень дофамина в ЧС, но привело к снижению его уровня в стриатуме на 49% (рис. 3В), что меньше указанного порога, равного 70%. Таким образом, экспериментальная модель по ключевым параметрам соответствует характеристикам доклинической стадии БП.

Через 2 ч после подкожного введения 100 мг/кг МИТ у мышей, моделирующих доклиническую стадию БП, проявились нарушения двигательной активности: пройденный путь в тесте «открытое поле» сократился на 50% относительно контрольной группы (рис. 3А), наблюдалась тенденция к снижению вертикальных стоек на 39% (рис. 3Б). При этом ни у здоровых мышей, получавших МИТ, ни у МФТП-мышей, получавших физраствор, подобные изменения моторного поведения не обнаружены.

По-видимому, это объясняется тем, что под действием МИТ концентрация дофамина снизилась

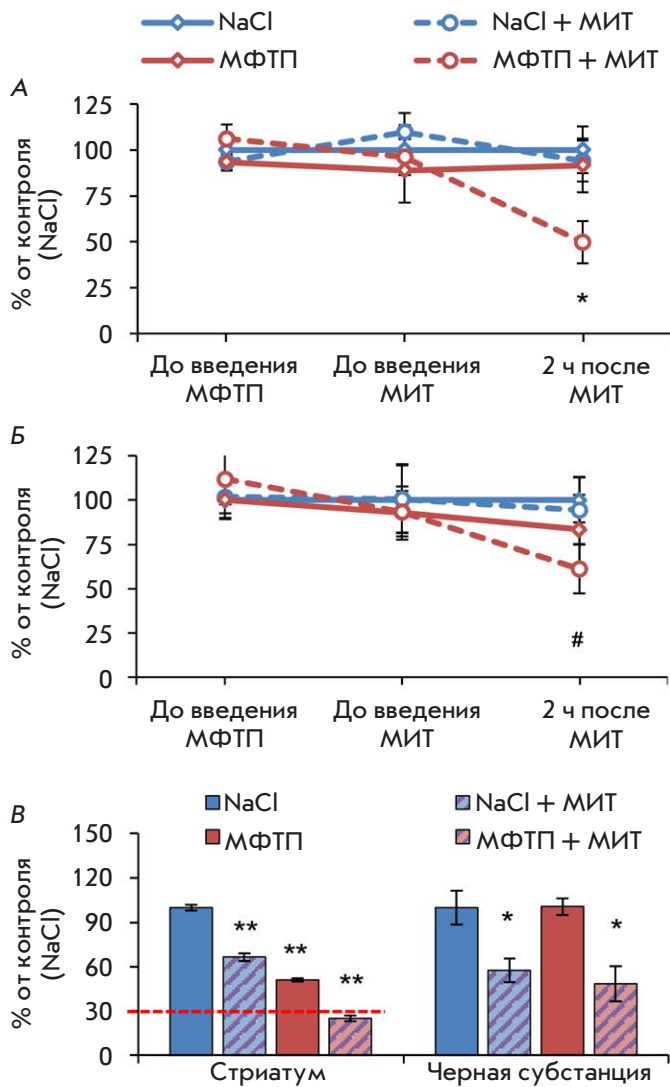


Рис. 3. Пройденный путь (А) и число вертикальных стоек (Б) в тесте «открытое поле» и уровень дофамина в стриатуме и черной субстанции (В) мышей, получавших МФТП или физраствор (NaCl), через 2 ч после введения 100 мг/кг МИТ. * $p < 0.05$ относительно контроля (NaCl); ** $p < 0.05$ относительно контроля и других групп; # $p < 0.15$ относительно контроля

на 75% от уровня в контроле (т.е. ниже порога возникновения моторных нарушений) только в стриатуме мышей на модели доклинической стадии БП (рис. 3В). Таким образом, введение МИТ в выбранной дозе спровоцировало проявление симптомов двигательных нарушений на модели доклинической стадии БП, т.е. у мышей со скрытой функциональной недостаточностью nigrostriatной системы.

Важно отметить, что применение системных ингибиторов ТГ относительно безопасно и давно используется в клинической практике. Другой такой ингибитор – α -метил-*n*-тирозин, применяется при лечении феохромоцитомы – доброкачественной опухоли надпочечников [4, 5]. Используемые при этом дозы препарата приводят к ингибированию синтеза дофамина на 35–80%, а длительность ежедневного приема варьирует от нескольких недель до нескольких лет [11], что указывает на отсутствие серьезных побочных эффектов даже при пролонгированном ингибировании ТГ. Тем не менее, опубликованы свидетельства потенциальной нейротоксичности МИТ [12], в связи с чем в дальнейшей работе необходимо уделить особое внимание анализу кратковременных и отдаленных последствий его действия на головной мозг и периферические органы.

Таким образом, на экспериментальной модели доклинической стадии БП у мышей показана эффективность провокационного теста с МИТ для выявления скрытой функциональной недостаточности nigrostriatной системы. В ходе работы подобраны оптимальные доза МИТ и время после его введения. Следующим этапом разработки метода ранней диагностики БП на основе провокационного теста с МИТ являются доклинические исследования фармакокинетики, токсикологических свойств и отдаленных последствий воздействия препарата. ●

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ № 20-75-00034.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Bernheimer H., Birkmayer W., Hornykiewicz O., Jellinger K., Seitelberger F. // J. Neurol. Sci. 1973. V. 20. P. 415–455.
- Bezard E., Gross C. // Prog. Neurobiol. 1998. V. 55. P. 93–116.
- Agid Y. // Lancet. 1991. V. 337. P. 1321–1324
- Ugrumov M. // CNS Neurosci. Ther. 2020. V. 26. P. 997–1009.
- Khakimova G.R., Kozina E.A., Kucheryanu V.G., Ugrumov M.V. // Mol. Neurobiol. 2017. V. 54. P. 3618–3632.
- Citterio C.E., Targovnik H.M., Arvan P. // Nat. Rev. Endocrinol. 2019. V. 15. P. 323–338.
- Tan S.A., Lewis J.E., Berk L.S., Wilcox R.B. // Clin. Physiol. Biochem. 1990. V. 8. P. 109–115.
- 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.
- Kim A.R., Nodel M.R., Pavlenko T.A., Chesnokova N.B., Yakhno N.N., Ugrumov M.V. // Acta Naturae. 2019. V. 11. № 4 (43). С. 99–103.
- Udenfriend S., Zaltzman-Nirenberg P., Nagatsu T. // Biochem. Pharmacol. 1965. V. 14. P. 837–845.
- Wachtel H., Kennedy E.H., Zaheer S., Bartlett E.K., Fishbein L., Roses R.E., Fraker D.L., Cohen D.L. // Ann. Surg. Oncol. 2015. V. 22. Suppl. 3. P. S646–654.
- Fernández-Espejo E., Bis-Humbert C. // Neurotoxicology. 2018. V. 67. P. 178–189.