

УДК 616.831:615.099-05

*В.А. Пятикоп, М.А. Мсаллам, А.В. Цыганков, И.А. Кутовой, В.М. Шеверева**

Харьковский национальный медицинский университет

**Харьковский национальный университет имени В.Н. Каразина*

ВЛИЯНИЕ ВВЕДЕНИЙ 6-ГИДРОКСИДОФАМИНА В ЧЕРНУЮ СУБСТАНЦИЮ НА ПОВЕДЕНИЕ КРЫС

Показано, что билатеральная деструкция SN (инъекции 6-гидроксидамина в черную субстанцию) приводит к нарушению поведения крыс, которое проявляется двигательными нарушениями в виде монотонных движений головой (по типу «да-да», «нет-нет»), «горбоподобного» изгиба туловища, вертикально поднятого хвоста. Отмечено снижение уровня дофамина в крови и во фронтальной коре. На 7, 14, 24, 34 и 44-й день в зоне локализации SN происходит практически полное исчезновение нейронов с крупными телами на фоне увеличения количества глиальных элементов и разреженности нейропиля, а на 54-й день – увеличение количества нейронов в зоне SN. Возникающие морфологические изменения в SN сохраняются в течение всего периода наблюдения.

Ключевые слова: 6-гидроксидамин, черная субстанция, поведение крыс, морфологические изменения, уровень дофамина.

Впервые симптомы болезни Паркинсона (БП) как самостоятельного заболевания были описаны Джеймсом Паркинсоном в 1817 году. Название «болезнь Паркинсона» предложил в 80-х годах XIX столетия французский невролог Пьер Мари Шарко [1, 2].

БП – одна из самых частых форм первичных хронических нейродегенеративных заболеваний, поражающих главным образом людей пожилого и старческого возраста [2]. В связи с увеличением доли этой возрастной группы в популяции влияние БП на показатели здоровья населения и социально-экономические потери возрастает.

Патогенез БП, как и других нейродегенеративных заболеваний, обусловлен комплексом патологических процессов, включающих митохондриальную дисфункцию, оксидативный и протеолитический стрессы, локальное воспаление, апоптоз и др. Эти процессы могут быть обусловлены различными генетическими, внешнесредовыми, а также возрастными инволютивными факторами и их взаимодействием [3].

Патоморфологически для идиопатического паркинсонизма характерно побледнение пигментированных ядер нейронов ствола, черной субстанции (SN) и голубого пятна головного мозга. Гистопатологические признаки БП заключаются в утрате пигментированных дофаминергических нейронов SN и нейронов ствола головного мозга. Патологоанатомические находки наряду с общими для всех форм БП характерными изменениями (снижение численности нейронов в области компактной части SN, вентральной области покрышки моста) имеют и некоторые особенности. При дрожательной форме отмечается преимущественная дегенерация медиальной части SN, ретро-рубальных волокон с низкой степенью глиоза, при акинетико-ригидной – дегенерация латеральной части SN [4].

Основная причина дегенерации – разрушение клеточной мембраны пигментных клеток свободными радикалами. Анализ тканей мозга больных паркинсонизмом свидетельствует о повышенном образовании

© В.А. Пятикоп, М.А. Мсаллам, А.В. Цыганков и др., 2014

свободных радикалов при одновременном снижении активности систем, отвечающих за их нейтрализацию [5, 6].

Новый успешный подход к лечению этой патологии был продемонстрирован экспериментами на грызунах с моделью БП с использованием трансплантации фетальной нервной ткани, которая служит субстратом заместительной клеточной терапии. Большинство работ по нейротрансплантации проведено именно на крысах, которые имеют высокую репродуктивность при относительно коротком периоде беременности, большие компенсаторно-восстановительные возможности, а содержание их не требует значительных материальных затрат [5–9]. Используемая модель основана на введении в структуры головного мозга грызунов нейротоксина 6-гидроксидофамина (6-OHDA), блокирующего синтез дофамина в эндогенных дофаминергических нейронах, что приводило к развитию характерной для БП симптоматики. Данная модель является простой в использовании и маловариабельной, что позволяет ей до сих пор занимать важнейшее место в арсенале экспериментальной неврологии [10].

В недавнем прошлом при моделировании паркинсонизма на взрослых крысах было показано, что в результате трансплантации фетальной дофаминергической ткани исчезают паркинсоноподобные симптомы (ПС) [11].

Цель исследования – оценить влияние введений 6-OHDA в SN на основе анализа морфофункциональных и биохимических показателей.

Материал и методы. Эксперименты были проведены на 34 крысах-самцах линии Вистар–Альбино Глаксо массой от 200 до 250 г в возрасте от 3 до 4 месяцев. Животных содержали в стандартных условиях вивария (12-часовой световой день, свободный доступ к воде и пище, температура 23–25 °С).

Животные были разделены на следующие группы: I – интактная (n=7); II – с моделированием ПС путем двусторонней стереотаксической деструкции SN введением 6-OHDA (n=27).

Моделирование ПС осуществляли следующим образом. В условиях тиопенталового (50 мг/кг) наркоза голову животного фиксировали в стереотаксическом аппарате на столе

для препарирования в положении на животе. Скелетотопическими ориентирами на черепе крысы служили венечный и стреловидный швы, брегма (точка пересечения указанных швов), а также ламбда (точка пересечения сагиттального и сигмовидного швов). Фиксировали голову за верхние резцы и наружные слуховые проходы так, чтобы брегма находилась на 1 мм выше ламбды, а сагиттальная плоскость проходила строго через верхние резцы и стреловидный шов. Разрез кожи длиной до 1,5 см и обнажение костного операционного поля производили в области проекции сагиттального шва на 0,5 см казади от линии, проведенной через верхние края орбит. Кость скелетировали для достаточной визуализации брегмы и стреловидного шва.

Основной стереотаксической мишенью была SN, которая является у животного основным звеном в нейрорегуляции экстрапирамидных функций. Стереотаксические координаты SN определяли по атласу Fifikova and Mařala (1967). Использовали следующие координаты: AP=4,0 мм; Л=1,5 мм; Г=8,2 мм – на 4 мм каудальнее от фронтальной нулевой плоскости, на 1,5 мм латеральнее сагиттальной нулевой плоскости и на глубине 8,2 мм от поверхности кости. С двух сторон симметрично сверлили отверстия для введения разрушающих веществ (6-OHDA). На глубину 8,2 мм вводили 6-OHDA (8 мкг/кг).

Трепанационное отверстие закрывали стерильным расплавленным воском. Рану ушивали узловыми швами и засыпали стрептоцидом.

После пробуждения животное помещали в отдельную клетку для наблюдения, а уже на следующий день – в общий виварий. Все оперированные животные выжили, однако у 2 крыс отмечалось осложнение в виде глубокого угнетения функции внешнего дыхания вследствие длительности операции и наркоза. В этих случаях проводили ИВЛ аппаратом РО-2 до восстановления дыхательной функции.

Проводили лабораторные и патоморфологические исследования.

Двигательные нарушения у крыс с моделью ПС оценивали по их виду и степени выраженности (табл. 1), предложенной нами [12].

Также оценивали степень выраженности двигательных расстройств в зависимости от

Таблиця 1. Оцінка двигательних расстройств у крыс с моделью ПС

Вид двигательних расстройств	Степень выраженности двигательних расстройств
Тремор мышц Ригидность мышц «Манежный» бег	1 балл – легкие проявления или их отсутствие
Монотонные движения головой «Вертикальный» хвост	2 балла – умеренные проявления
«Горбоподобный» изгиб туловища Малоподвижность	3 балла – пик проявления

времени наблюдения за животным с моделью ПС после введения в эксперимент.

После моделирования ПС исследовали уровень дофамина в основной и контрольной группах экспериментальных животных в разные сроки. Исследование дофамина в структурах головного мозга и крови проводили флуориметрическим методом. Уровень дофамина в крови и фронтальной коре изучали на 7, 14, 24, 34, 44 и 54-е сутки.

Результаты и их обсуждение. Билатеральная деструкция SN вызывала у крыс грубые двигательные нарушения в виде монотонных движений головой (по типу «да-да», «нет-нет»), «горбоподобного» изгиба туловища, у некоторых животных были неестественно вытянуты конечности и вертикально поднят хвост, потеря массы. Описанные двигательные расстройства возникали у всех животных на 1-е сутки после деструкции и сохранялись в течение всего периода наблюдений (до 54 суток) после деструкции SN.

Степень выраженности
двигательных расстройств, баллы

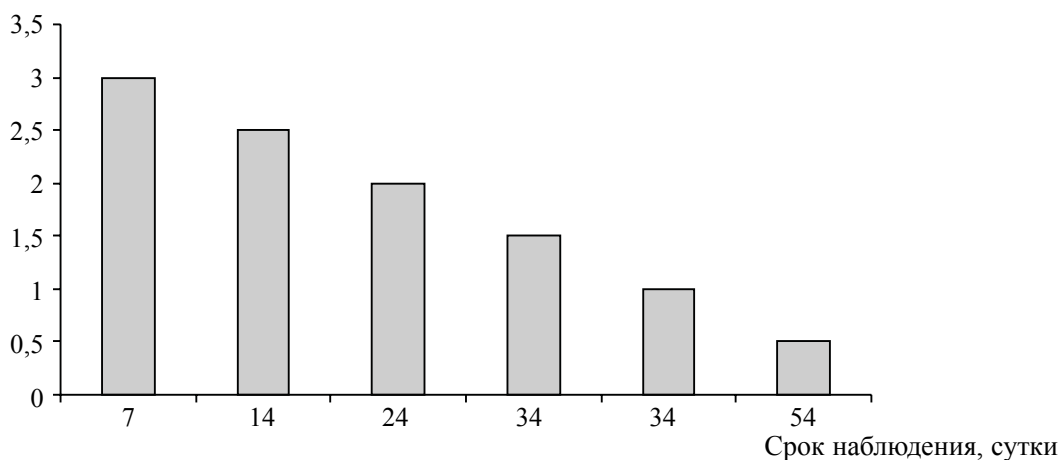


Рис. 1. Зависимость степени выраженности двигательных расстройств от времени наблюдения за животным с моделью ПС

По данным динамики двигательных расстройств у крыс с ПС можно отметить, что степень выраженности этих расстройств к 7-м суткам достигает максимума (3 балла). Монотонные движения головой, «вертикальный» хвост, «горбоподобный» изгиб туловища, малоподвижность развиваются до пика выраженности этих расстройств в сроки 7–15 суток и сохраняются практически без изменений весь период наблюдений.

В ходе исследования установлено, что степень выраженности двигательных расстройств зависит от времени наблюдения за крысами с моделью ПС после введения в эксперимент (рис. 1).

При исследовании уровня дофамина у крыс с моделью ПС установлено следующее. В группе II сразу после разрушения SN происходит резкое снижение уровня дофамина в крови и в тканях фронтальной коры головного мозга, затем постепенный подъем уровня дофамина до нормализации на 54-й день (табл. 2).

Таблиця 2. Уровень дофамина в крови и во фронтальной доле мозга

Группа	Срок исследования, сутки	Дофамин	
		в крови, Нг/мг	во фронтальной доле мозга, Нм/л ткани
I группа		0,85±0,06	1,09±0,09
II группа	7-е	0,53±0,02	0,85±0,02
	14-е	0,66±0,02	0,90±0,02
	24-е	0,64±0,02	0,94±0,02
	34-е	0,70±0,02	0,97±0,02
	44-е	0,76±0,02	1,05±0,02
	54-е	0,89±0,02	1,15±0,02

Результаты патоморфологических исследований следующие. В I группе весь комплекс клеток SN имеет форму, напоминающую треугольник. Нейроны средней величины, угловатой и продолговатой формы, что указывает на наличие отростков, формирующих конусы в месте отхождения от тела нейрона. Цитоплазма базофильна, обычно в нейронах с гиперхромным, т. е. темным ядром. Наличие таких клеток можно трактовать как формирование в SN здорового интактного животного части нейронов, являющихся в данный момент запасными, т. е. нефункционирующими. Нейропил на территории SN и вокруг нее мелкоячеистый, что свойственно нервной ткани с высокой степенью сохранности отростков нейронов (рис. 2).

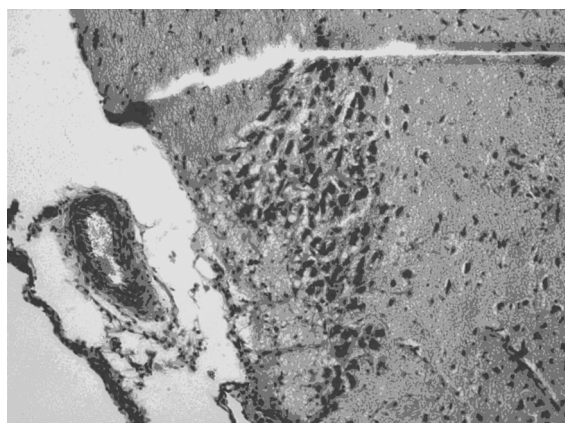


Рис. 2. Фронтальный срез головного мозга интактной крысы в участке SN. Окраска гематоксилин-эозином, × 100

Во II группе через 7 дней после оперативного двустороннего разрушения SN в местах локализации нейронов отмечается полное или почти полное исчезновение их с крупными телами на фоне увеличения количества глиальных элементов и разреженности нейропиля (рис. 3).

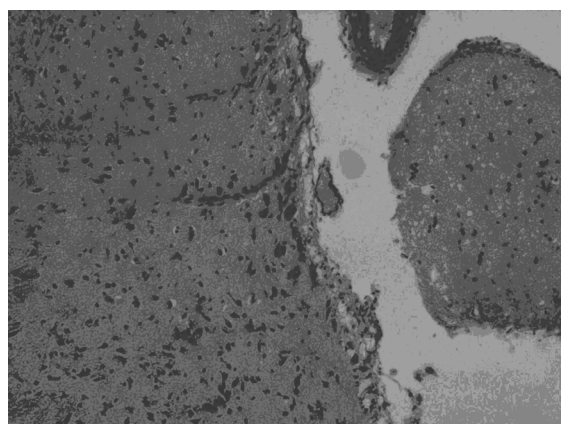


Рис. 3. Фронтальный срез головного мозга крысы в участке SN через 7 дней после введения 6-ОНДА в SN. Окраска гематоксилин-эозином, × 100

Через 14 дней плотность нейропиля в зоне оперированной области SN восстановилась, т. е. он выглядит более плотным, чем в сроке 7 дней после операции. Возможно, это обусловлено гиперплазией отростков сохранившихся нейронов, которых значительно меньше, чем у интактных животных. Располагаются нейроны SN в виде длинной узкой полосы вдоль нижней поверхности мозга (рис. 4).

Через 24 дня происходит нормализация морфофункционального состояния области SN, микроглиальные элементы исчезают, что говорит о завершении процесса утилизации некротических масс и завершения воспалительного процесса. Нейроны в SN располагаются в виде длинной цепи в несколько рядов, а не в один ряд, как в сроке 14 дней. Может быть, это связано с увеличением количества нейронов в SN за счет миграции и созревания незрелых нейронов (рис. 5).

Через 34 и 44 дня количество нейронов продолжает увеличиваться по сравнению с показателями в более ранние сроки. Ядро

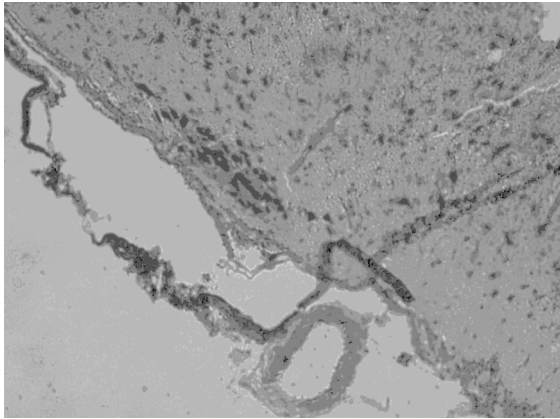


Рис. 4. Фронтальный срез головного мозга крысы в участке SN через 14 дней после введения 6-OHDA в SN. Окраска по Нисслю, $\times 100$

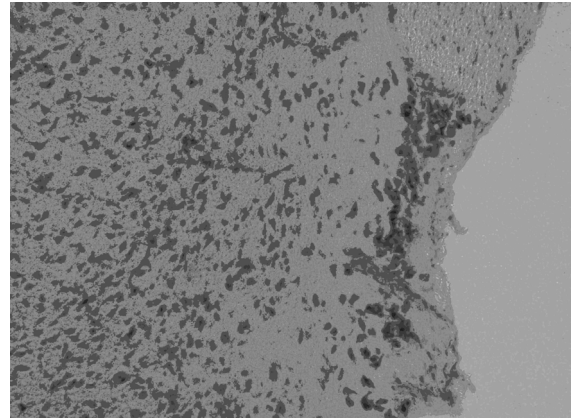


Рис. 6. Фронтальный срез головного мозга крысы в участке SN через 34 дня после введения 6-OHDA в SN. Окраска по Нисслю, $\times 100$

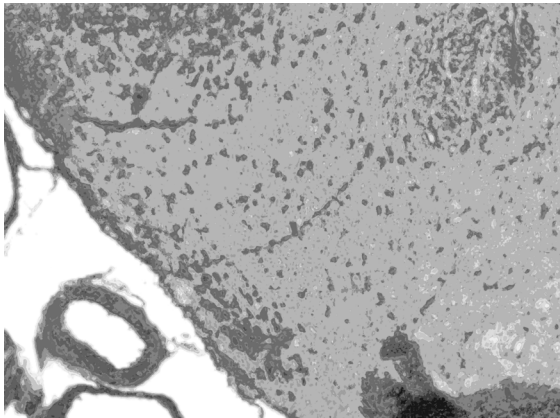


Рис. 5. Фронтальный срез головного мозга крысы в участке SN через 24 дня после введения 6-OHDA в SN. Окраска гематоксилин-эозином, $\times 100$

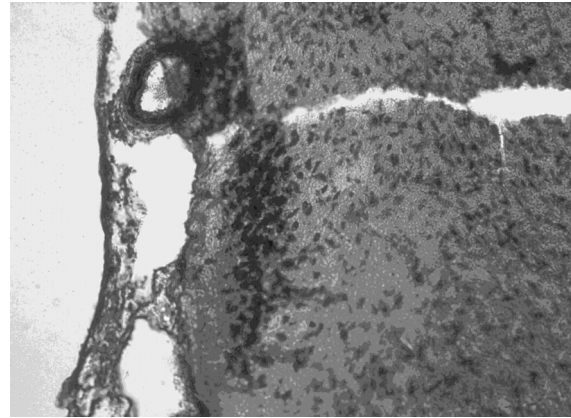


Рис. 7. Фронтальный срез головного мозга крысы в участке SN через 54 дня после введения 6-OHDA в SN. Окраска по Нисслю, $\times 100$

многих нейронов области SN светлое, форма клеток овальная, цитоплазма резко базофильна, – такие клетки являются морфофункционально активными, а базофильность цитоплазмы, очевидно, обусловлена большим количеством рибосом в ней, т. е. высокоактивным прохождением белоксинтетических процессов (рис. 6).

Через 54 дня количество нейронов в зоне SN продолжает увеличиваться, при этом нейропил уплотняется, что можно трактовать как результат гиперплазии отростков, а форма тела нейрона становится угловатой, что также свидетельствует о формировании большего количества отростков, отходящих от тела нейрона, т. е. о гиперплазии отростков (рис. 7).

Таким образом, во II группе билатеральные инъекции 6-OHDA вызывали у крыс

грубые двигательные нарушения в виде монотонных движений головой (по типу «да-да», «нет-нет»), появление «горбоподобного» изгиба туловища, вертикально поднятого хвоста. Описанные двигательные расстройства возникали у всех животных на 1-е сутки после деструкции и сохранялись в течение всего периода наблюдений (до 54 суток).

Динамика двигательных расстройств у крыс с моделью ПС свидетельствует о том, что степень выраженности этих расстройств к 7-м суткам достигает максимума. Монотонные движения головой, «вертикальный» хвост, «горбоподобный» изгиб туловища, малоподвижность развиваются до пика выраженности этих расстройств в сроки 7–15 суток и сохраняются практически без изменений весь период наблюдения.

Во II групі тварин одразу після розрушення SN помічено різке зниження рівня дофаміну в крові і в тканин фронтальної кори головного мозку, потім поступове збільшення рівня дофаміну до нормалізації на 54-й день. На 7, 14, 24, 34 і 44-й день в зоні локалізації SN відбуваються наступні морфологічні зміни: практично повне зникнення нейронів з великими тілами на фоні збільшення кількості гліальних елементів і разреженості нейро-

піля, а на 54-й день помічено збільшення кількості нейронів в зоні SN.

Висновки

Білатеральні ін'єкції 6-ОНДА в чорну субстанцію призводять до порушення поведінки щурів, проявляючись в рухових порушеннях, морфологічних змінах в SN, зниженні рівня дофаміну в крові і тканин мозку у експериментальних тварин.

Список літератури

1. П'ятикоп В. О. Нейрохірургічна корекція рухових порушень при паркінсонізмі (експериментальне та клінічне дослідження) : автореф. дис. на здобуття наук. ступеня д-ра мед. наук : спец. 14.01.05 «Нейрохірургія» / В. О. П'ятикоп. – К., 2009. – 36 с.
2. Литвиненко І. В. Блезнь Паркінсона і синдром паркінсонізму / І. В. Литвиненко, М. М. Одинак, А. Г. Труфанов. – СПб. : ЕЛБИ-СПб, 2012. – 80 с.
3. Иллариошкин С. Н. Блезнь Паркінсона і розлад рухів / С. Н. Иллариошкин, О. С. Левин. – М. : МЦН РАМН, 2011. – 413 с.
4. Неврология. Национальное руководство / [Гусев Е. И., Коновалов А. Н., Скворцова В. И., Гехт А. Б.]. – М. : ГЭОТАР-Медиа, 2010. – 1040 с.
5. Parkinson's disease induced pluripotent stem cells with triplication of the α -synuclein locus / M. J. Devine, M. Ryten, P. Vodicka [et al.] // Nat. Commun. – 2011. – № 2. – P. 440.
6. Generation of isogenic pluripotent stem cells differing exclusively at two early onset Parkinson point mutations / F. Soldner, J. Laganière, A. W. Cheng [et al.] // Cell. – 2011. – № 2. – P. 318–331.
7. MEF2C enhances dopaminergic neuron differentiation of human embryonic stem cells in a parkinsonian rat model / E. G. Cho, J. D. Zaremba, S. R. McKercher [et al.] // PLoS One. – 2011. – № 8. – P. 24–27.
8. Dopamine cell transplantation in Parkinson's disease: challenge and perspective / Y. Ma, S. Peng, V. Dhawan, D. Eidelberg // Br. Med. Bull. – 2011. – № 100. – P. 173–189.
9. Direct generation of functional dopaminergic neurons from mouse and human fibroblasts / M. Caiazzo, M. T. Dell'Anno, E. Dvoretzkova [et al.] // Nature. – 2011. – № 476. – P. 224–227.
10. Анисимов С. В. Клеточная терапия блезни Паркінсона: I. Трансплантация эмбриональной и взрослой ткани / С. В. Анисимов // Успехи геронтологии. – 2008. – № 4. – С. 575–592.
11. Protein-based human iPS cells efficiently generate functional dopamine neurons and can treat a rat model of Parkinson disease / Y. H. Rhee, J. Y. Ko, M. Y. Chang [et al.] // J. Clin. Invest. – 2011. – № 6. – P. 2326–2335.
12. П'ятикоп В. А. Сравнительная характеристика динамики двигательных нарушений и их сопоставления с морфофункциональными особенностями при экспериментальном паркінсонизме после введения криоконсервированных эмбриональных нервных клеток и нейроиндуцированных in vitro стромальных клеток / В. А. П'ятикоп, И. А. Григорова // Укр. вісник психоневрології. – 2007. – Т. 15, вип. 1. – С. 51–53.

В.О. П'ятикоп, М.А. Мсаллам, О.В. Циганков, І.О. Кутовий, В.М. Шеверьова

ВПЛИВ УВЕДЕННЯ 6-ГІДРОКСИДОФАМІНУ В ЧОРНУ СУБСТАНЦІЮ НА ПОВЕДІНКУ ЩУРІВ

Показано, що білатеральна деструкція SN (ін'єкції 6-гідроксидофаміну в чорну субстанцію) призводить до порушення поведінки щурів, яке проявляється руховими порушеннями у вигляді монотонних рухів головою (за типом «так-так», «ні-ні»), «горбоподібного» вигину тулуба, вертикально піднятого хвоста. Відмічено зниження рівня дофаміну в крові і у фронтальній корі. На 7, 14, 24, 34 та 44-й день у зоні локалізації SN відбувається практично повне зникнення нейронів

з великими тілами на тлі збільшення кількості гліальних елементів і розрідженості нейропіля, а на 54-й день – збільшення кількості нейронів у зоні SN. Виникаючі морфологічні зміни в SN зберігаються протягом усього періоду спостереження.

Ключові слова: 6-гідроксидофамін, чорна субстанція, поведінка щурів, морфологічні зміни, рівень дофаміну.

V.A. Pyatikov, M.A. Msallam, A.V. Tsegankov, I.A. Kutovoy, V.M. Shevereva

**EFFECT OF 6-HYDROXYDOPAMINE INTRODUCTION IN THE SUBSTANTIA NIGRA
ON THE BEHAVIORAL RATS**

It is shown, that the bilateral destruction SN injections of 6-OHDA in the substantia nigra caused in rats motor impairment in the form of head movements (like «yes-yes», «no-no»), «hump like» bending the body, vertically raised tail and downs dopamine level in the blood and in the frontal lobe of the brain of rats, morphological changes in the SN, which is maintained throughout the observation period.

Key words: 6-hydroxidopamine, substantia nigra, the behavior of rats, morphological changes, dopamine level.

Поступила 18.02.14