

ВЫЯВЛЕНИЕ НАРУШЕНИЙ В ЭНТЕРАЛЬНОЙ НЕРВНОЙ СИСТЕМЕ МЫШЕЙ ПРИ МОДЕЛИРОВАНИИ РАННЕЙ СТАДИИ БОЛЕЗНИ ПАРКИНСОНА

Иванов М.В., Кутукова К.А., Воронков Д.Н., Ставровская А.В., Гущина А.С.

Научный центр неврологии, Москва

Введение. Разработка доклинической диагностики и превентивного лечения БП является важной задачей, поскольку начало терапии в клинической стадии остается недостаточно эффективным. Ключевым шагом в этом направлении является моделирование доклинической и ранней клинической стадии БП на животных, что позволит не только получить новые фундаментальные знания о патогенезе болезни, но и будет способствовать поиску новых терапевтических стратегий. Одной из наиболее часто используемых моделей БП является модель, индуцированная 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридином (МРТР). Этот токсин вводится системно, легко проникает через гематоэнцефалический барьер, что приводит к симметричному поражению дофаминергических структур и достаточно точно отражает патологическое состояние, которое наблюдается у пациентов с БП. Важно отметить, что степень такого поражения зависит от доз и режима введения МРТР [1, 5].

Целью данной работы было изучение реакций различных элементов нервной системы кишечника на системное введение малых доз МРТР мышам.

Материалы и методы. Для получения модели ранней стадии БП мышам линии C57BL/6 возрастом 6-8 недель (n=10) подкожно в дозе 2×10 мг/кг с интервалом в 2 часа вводили нейротоксин МРТР в физиологическом растворе. Контрольной группе мышей (n=10) вводили физиологический раствор. Тестирование двигательной активности в «открытом поле» проводили через 90 мин после последней инъекции МРТР.

Для морфологического исследования были взяты образцы мозга мышей из каждой экспериментальной группы: животные группы контроля (n=5) и крысы, получавшие МРТР (n=5). Мозг извлекали и фиксировали 4% раствором формалина. Образцы пропитывали средой О.С.Т. (TissueTek) и готовили серийные сагиттальные срезы толщиной 10 мкм на криостате Sakura. Для выявления тирозингидроксилазы (ТирГд) использовали поликлональные кроличьи антитела (Sigma, 1:500) и вторичные антитела козы против иммуноглобулинов кролика, меченые флуорохромом CF488 (Sigma, 1:150). С каждого мозга на уровне хвостатого ядра и черной субстанции исследовали 5-10 срезов, взятых на разных уровнях. Срезы изучали под флуоресцентным микроскопом Nikon Eclipse. В программе ImageJ и оценивали среднюю интенсивность флуоресценции (с коррекцией на фоновое окрашивание) ткани в стриатуме: исследуемые области выделяли вручную, не менее 5 полей зрения на срез, при увеличении объектива $\times 40$.

Для гистологического и иммунофлуоресцентного исследования у 5 животных из каждой группы брали участок тощей кишки на расстоянии 10-12 см от привратника желудка, фиксировали в 4% формалине на фосфатном буфере и раскладывали на срезы на криостоме TissueTek Cryo 3. Нейроны в ганглиях межмышечного сплетения выявляли на срезах, окрашенных толуидиновым синим. На срезах, окрашенных альциановым синим, определяли количество бокаловидных клеток на 100 мкм длины кишечной ворсинки. Для выявления дофаминовых нервных волокон использовали иммунофлуоресцентную реакцию на антитела к тирозингидроксилазе – ключевому ферменту синтеза дофамина.

Результаты. При тестировании двигательной активности мышей с моделью БП и контрольных мышей было показано, что введение МРТР привело к уменьшению величины пройденного в ОП пути ($14,78 \pm 0,98$ vs $12,22 \pm 0,71$, $p=0,0478$) и увеличению времени прохождения по «сужающейся дорожке» ($7,2 \pm 0,65$ vs $9,4 \pm 0,39$, $p=0,0046$). Сила хвата передними лапами за горизонтальный стержень у таких мышей была также хуже, чем у контрольных ($2,7 \pm 0,15$ vs $1,8 \pm 0,29$, $p=0,0134$).

При морфохимическом исследовании эффектов введения МРТР было выявлено значимое снижение плотности дофаминергических волокон в хвостатом ядре (рис. 1), визуально определялось также снижение количества дофаминовых нейронов в черной субстанции.

При исследовании энтеральной нервной системы было выявлено снижение количества бокаловидных клеток, содержащих слизь ($3,3 \pm 0,06$ в контроле и $2,6 \pm 0,06$ при введении МРТР, $p=0,001$). При этом большинство бокаловидных клеток были опустошены или содержали очень небольшое количество муцина (рис. 2Б и Б₁). Такое уменьшение количества бокаловидных клеток характерно для начальных этапов воспалительного процесса в тонком кишечнике [6].

Среднее количество нейронов в одном ганглии у мышей, получавших инъекции МРТР, не изменялось ($2,6 \pm 0,56$ в контроле и $2,4 \pm 0,5$ при введении МРТР, $p=0,1857$) (рис. 2А и А₁), а количество ТН-позитивных нервных волокон и варикозностей значительно уменьшалось ($2,1 \pm 0,1$ в контроле и $1,2 \pm 0,1$ при введении МРТР, $p=0,001$) (рис. 2В и В₁). Эти результаты свидетельствуют, что МРТР проявляет селективную токсичность для дофаминергических элементов энтеральной нервной системы тонкого кишечника. Аналогичные результаты были получены при исследовании влияния внутрибрюшинного введения МРТР на энтеральную нервную систему толстого кишечника у мышей [1].

Обсуждение. Одним из главных немоторных симптомов БП является нарушение функций желудочно-кишечного тракта, включающее дисфагию, тошноту, запоры, затрудненную дефекацию [3]. Основным патофизиологическим механизмом этих изменений является нарушение моторики кишечника, которое, в свою очередь,

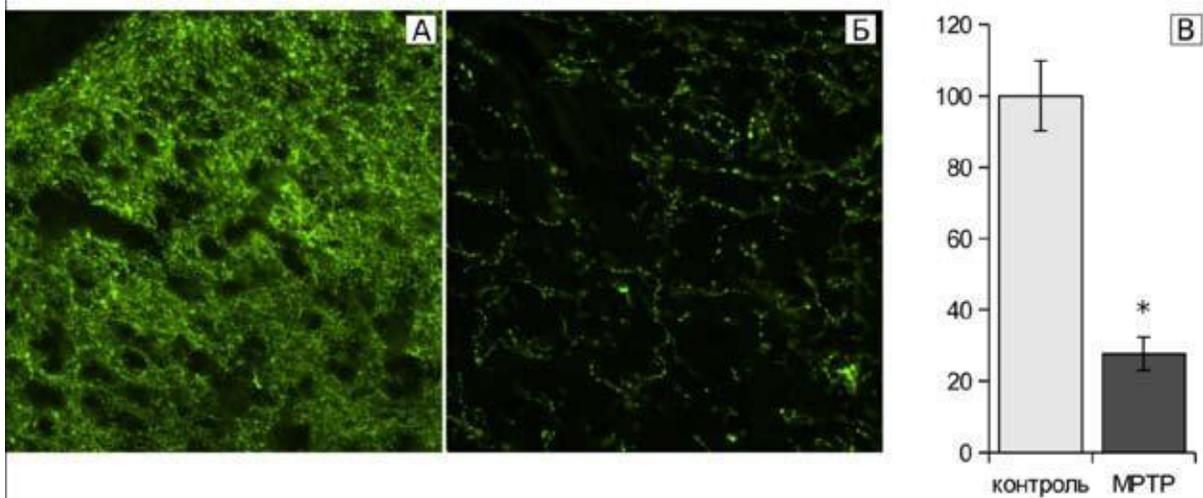


Рис. 1. Изменения в стриатуме мышей под действием МРТР.

А, Б – Снижение плотности тирозингидроксилаза-позитивных волокон мышей (А – группа контроля, Б – МРТР). Ув.об. $\times 40$. В – Изменения интенсивности окрашивания на тирозингидроксилазу % от контроля. * – $p < 0,05$, критерий Манна-Уитни.

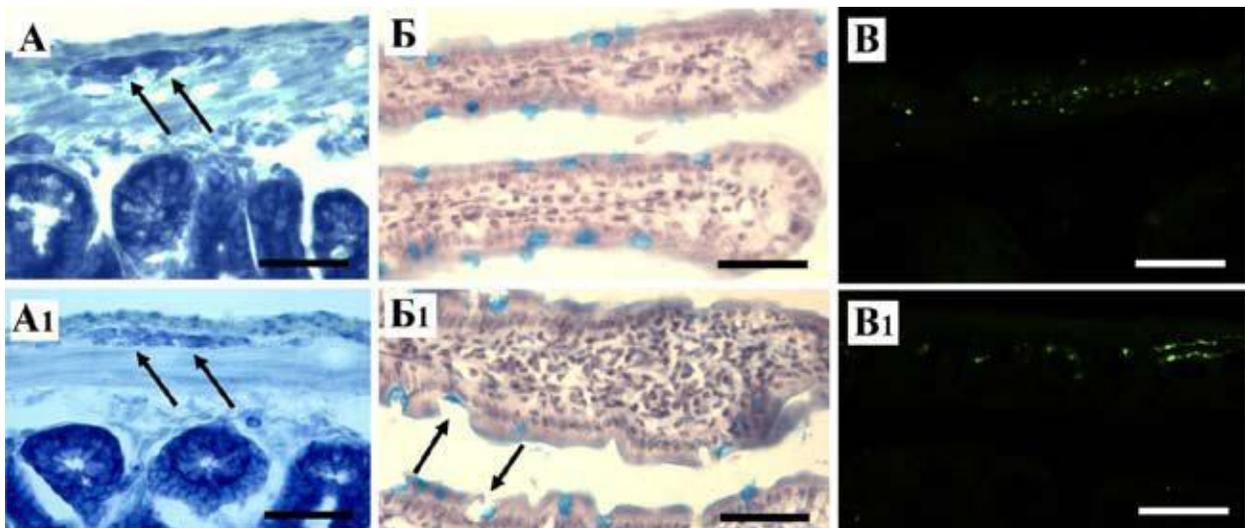


Рис.2. Изменения в нервной системе кишечника мышей под действием МРТР.

и А1 – нейроны межмышечного сплетения животного контрольной (А) и экспериментальной группе (А1), окраска толуидиновым синим. Б и Б1 – бокаловидные клетки на кишечных ворсинках контрольного и экспериментального животного, соответственно. Стрелками показаны опустошённые клетки у экспериментального животного. Окраска альциановым синим. В и В1 – тирозингидроксилаза-позитивные волокна и варикозности в межмышечном сплетении контрольного и экспериментального животного, соответственно. Иммунофлуоресценция.

На всех фотографиях масштаб 50 мкм.

является следствием дисфункции энтеральной нервной системы [3]. В соответствии с гипотезой Х. Браака, патогенез паркинсонизма начинается с поражения структур периферической нервной системы и, прежде всего, нейронов кишечника, откуда патология по симпатическим и парасимпатическим волокнам распространяется в ЦНС и в конечном итоге приводит к нейродегенерации в nigrostriatной системе [4]. Патоморфологические исследования показывают, что тельца и нейриты Леви у больных БП обнаруживаются в нейронах энтеральной нервной системы значительно раньше, чем в дофаминовых нейронах среднего мозга, и задолго до появления моторных симптомов паркинсонизма [2]. Поэтому особый интерес представляет изучение реакций различных элементов нервной системы кишечника на системное введение токсина при моделировании нейродегенеративного процесса на ранних стадиях паркинсонизма.

Заключение. Полученные результаты показали, что разработанная модель ранней клинической стадии паркинсонизма воспроизводит также нарушения в нервной системе кишечника, что характерно для патогенеза БП. Было продемонстрировано, что МРTP, давно использующийся как селективный токсин для дофаминергических нейронов головного мозга, проявляет сходную активность и в отношении периферических нервных структур. Это делает данную модель удобным инструментом для изучения начальных стадий нейродегенеративного процесса при БП на системном уровне.

Литература

- Anderson, G. Loss of enteric dopaminergic neurons and associated changes in colon motility in an MPTP mouse model of Parkinson's disease / G. Anderson, A.R. Noorian, G. Taylor, M. Anitha, D. Bernhard, S. Srinivasan, J.G. Greene // *Exp Neurol.* – 2007. – №207(1). – P. 4-12.
- Braak, H. Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease / H. Braak, K. Del Tredici, U. Rüb, R.A.I. de Vos, E.N.H.J. Steur, E. Braak // *Neurobiol Aging.* – 2003. – №24. – P.197–211.
- Cersosimo, M. G. Pathological correlates of gastrointestinal dysfunction in Parkinson's disease / M.G. Cersosimo, E.E. Benaroch // *Neurobiol Dis.* – 2012.- №46. – P.559–564.
- Del Tredici, K. Review: sporadic Parkinson's disease: development and distribution of α -synuclein pathology / K. Del Tredici, H. Braak // *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* – 2016. – №42. – P.33–50.
- Jackson-Lewis, V. Protocol for the MPTP mouse model of Parkinson's disease / Jackson-Lewis V., Przedborski S. // *Nat. Protoc.* – 2007. – №2. – P.141–151.
- Pereira, E. A histomorphometric classification system for normal and inflamed mouse duodenum – Quali-quantitative approach / Pereira E., Silva A., Soares J.R.A., Mattos E.B.A., Josetti C., Guimarras I.M., Campos S.M.N., Teixeira G.A.P.B. // *Int. J. Exp. Pathol.* – 2018. – №99(4). – P. 189-198.