

УДК 616.858.-008.6.001.57:612.826:612.67

DOI: 10.22141/2224-0713.16.3.2020.203444

Лабунец І.Ф., Утко Н.А., Савосько С.І., Пантелеймонова Т.Н., Бутенко Г.М.
ГУ «Институт генетической и регенеративной медицины НАМН Украины», г. Киев, Украина

Изменения структуры нейронов черной субстанции, показателей антиоксидантной защиты головного мозга и поведения у мышей разного возраста с МФТП моделью паркинсонизма

Резюме. Актуальность. При болезни Паркинсона массовая гибель дофаминергических нейронов черной субстанции головного мозга приводит к появлению характерных двигательных нарушений. Показано влияние возраста и оксидативного стресса на ее развитие. **Цель:** оценить влияние нейротоксина 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридина (МФТП) на изменения структуры нейронов черной субстанции, факторов оксидативного стресса и антиоксидантной защиты головного мозга, а также поведения у мышей разного возраста. **Материалы и методы.** Мышам линии FVB/N и 129/Sv в возрасте 6–7 мес. вводили МФТП в дозе 12 мг/кг 4 раза через 2 ч или 30 мг/кг 1 раз; мышам в возрасте 15–16 мес. нейротоксин вводили в дозе 30 мг/кг 1 раз. **Результаты.** У взрослых мышей обеих линий и обоих полов МФТП в дозе 12 мг/кг, 4 инъекции, повреждает структуру от 48 до 60 % нейронов компактной части черной субстанции, а после одной инъекции в дозе 30 мг/кг — от 71 до 98 % нейронов. Введение МФТП 1 раз в дозе 30 мг/кг стареющим мышам обеих линий и обоих полов повреждает структуру до 30 % нейронов компактной части черной субстанции. Под влиянием одинаковой дозы нейротоксина у взрослых мышей наблюдается нарушение двигательной и недвигательной активности, а у стареющих — преимущественно двигательной активности, оцененных в тестах «открытое поле», на ригидность и в ротарод-тесте. Содержание малонового диальдегида существенно повышается в головном мозге опытных взрослых и стареющих мышей, тогда как изменения активности супероксиддисмутазы, каталазы и глутатионредуктазы (снижение и повышение) зависят от возраста и линии животных. **Выводы.** Таким образом, существуют возрастные различия влияния МФТП на структуру нейронов черной субстанции, активность антиоксидантных ферментов головного мозга и поведение мышей. Результаты могут быть полезными при изучении патогенеза паркинсонизма и разработке индивидуализированных подходов к его терапии.

Ключевые слова: нейротоксин МФТП; паркинсонизм; нейроны черной субстанции; малоновый диальдегид и антиоксидантные ферменты головного мозга; поведенческие реакции

Введение

Болезнь Паркинсона (БП) — одно из наиболее распространенных хронических прогрессирующих нейродегенеративных заболеваний, при котором массовая гибель дофаминергических нейронов компактной части черной субстанции среднего мозга приводит к

дефициту дофамина в неостриатуме и развитию характерных двигательных нарушений [1, 2]. Известно влияние наследственности и пола на частоту и клиническое течение БП [2, 3]. О роли возраста в развитии этого заболевания свидетельствуют факты длительности до-симптомного периода от 10 до 20 лет, выявления пре-

имущественно у пожилых людей, а в ряде случаев — у пациентов моложе 40 лет [1].

В патогенезе БП важное значение имеет оксидативный стресс. Так, свободные радикалы и активные формы кислорода являются одними из основных повреждающих факторов дофаминергических нейронов черной субстанции [4]. При этом активность антиоксидантных ферментов в головном мозге снижается [5, 6]. Вместе с тем возрастной аспект изменений факторов оксидативного стресса и антиоксидантной защиты головного мозга при БП остается недостаточно исследованным.

Иучение механизма развития БП и разработка новых подходов к терапии недостаточно эффективны без применения адекватных экспериментальных моделей этой патологии [7, 8]. Так, у мышей нейротоксин 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридин (МФТП) селективно повреждает структуру дофаминергических нейронов черной субстанции, вызывает оксидативный стресс и двигательные нарушения, характерные для БП [4, 9]. Хотя показано значение возраста для темпов метаболизма нейротоксинов, влияния последних на морфофункциональные изменения нервной системы и активность антиоксидантных ферментов [10, 11], оценку нейротоксического эффекта МФТП авторы проводят преимущественно на молодых мышцах в возрасте 1,5–3 мес. [8, 9].

Цель: оценить влияние нейротоксина МФТП на изменения структуры нейронов черной субстанции, факторов оксидативного стресса и антиоксидантной защиты головного мозга, а также поведения у мышей разного возраста.

Материалы и методы

Животные. Исследования проводили на мышцах линии FVB/N (генотип Н-2^а) и 129/Sv (генотип Н-2^б) в возрасте 6–7 мес. (взрослые) и 15–16 мес. (старееющие) из питомника ГУ «Институт генетической и регенеративной медицины НАМН Украины». Для взрослых мышей этих линий характерны различия реакции нервных клеток на введение нейротоксинов, а также нейрохимического и нейроэндокринного баланса [10]. Животных содержали в стандартных условиях вивария при режиме освещения 12 : 12. Мышей декапитировали под эфирным наркозом для получения биологического материала (головной мозг). Все экспериментальные исследования проводили согласно закону Украины «О защите животных от жестокого обращения» и Европейской конвенции по защите позвоночных животных, которые используются с экспериментальной и другой научной целью (Страсбург, 1986).

Модели. Нейротоксин МФТП (Sigma, США) вводили мышам подкожно (в область шеи) по следующим схемам: в дозе 12 мг/кг 4 раза с интервалом 2 ч или в дозе 30 мг/кг 1 раз. По данным М. Ugrumov и соавт. [9], с помощью таких схем можно воспроизвести у молодых мышей раннюю или позднюю стадии паркинсонизма с разной степенью морфофункциональных изменений центральной нервной системы (ЦНС).

Экспериментальные группы. Мышей в возрасте 6–7 мес. обеих линий и обоих полов разделили на группы (в каждой по 10 животных): контрольные мыши, получавшие растворитель МФТП (0,9% раствор хлорида натрия); мыши, которым вводили МФТП в дозе 12 мг/кг 4 раза с интервалом 2 ч; мыши, которые получали МФТП в дозе 30 мг/кг 1 раз. Мышей обеих линий в возрасте 15–16 мес. разделили на группы (в каждой по 9 особей), которым вводили 1 раз МФТП в дозе 30 мг/к или растворитель. Исследования в группах проводили через 18 дней после инъекций МФТП или растворителя.

Морфологические исследования. Средний мозг выделяли из головного и фиксировали в 10% нейтральном формалине. Затем после стандартной проводки через спирты увеличивающихся концентраций готовили гистологические срезы компактной части черной субстанции толщиной 8–10 мкм, которые окрашивали толуидиновым синим по Ниссля. Компактную часть черной субстанции идентифицировали согласно атласу [12]. При морфометрии в 10 полях зрения гистологических препаратов черной субстанции подсчитывали долю структурно поврежденных нейронов (клетки с признаками цитолиза, гидропической дистрофии, кариолизиса, кариопикноза). При морфометрии также измеряли среднюю площадь (мкм²) цитоплазмы нейронов на поперечных срезах. Микрофотографии исследуемых участков компактной части черной субстанции получали на микроскопе Olympus VX 51 (Япония). Морфометрический анализ проводили с помощью программного обеспечения Carl Zeiss software (AxioVision SE64 Rel.4.9.1).

Функциональное состояние ЦНС исследовали по показателям поведения в тесте «открытое поле», на ригидность и в ротарод-тесте [13, 14]. Тест «открытое поле» позволяет оценить у животных активность не только горизонтальную (количество пересеченных квадратов) и вертикальную двигательную (количество вертикальных стоек), но также эмоциональную (число фекальных болюсов) и исследовательскую (количество заглядываний в норки — норковый рефлекс). Как известно, для БП характерны как моторные, так и немоторные симптомы [1]. Длительность исследования поведения в тесте «открытое поле» — 3 минуты. Ротарод-тест дает возможность оценить координацию, чувство равновесия и мышечный тонус мышей. Скорость оборотов барабана в установке изменяли последовательно с 10 оборотов в 1 мин (об/мин) (3,0 V, 300 mA) до 20 об/мин (5,0 V, 300 mA). Данные представляли в виде суммарного времени (секунда) удержания на валу при 10 и 20 об/мин. Ригидность у мышей изучали по изменению длины тела (миллиметр) и походки. В последнем случае стопы мышей обрабатывали нетоксическими растворами краски разного цвета и по отпечаткам измеряли длину шага, длину и ширину стопы (миллиметр). Длина шага является одним из показателей изменений ходьбы животных, и ее уменьшение свидетельствует о нарушении функции мышечной ткани.

Факторы оксидативного стресса и антиоксидантной защиты головного мозга. Содержание малонового диальдегида (МДА) в органе определяли по интенсивности цвета триметинового комплекса, который образуется между МДА и тиобарбитуровой кислотой [15]. Активность антиоксидантных ферментов измеряли в супернатанте гомогенатов головного мозга мышей спектрофотометрическим методом (спектрофотометр μ Quant, Bio-Tek, США) [5]. Для оценки активности супероксиддисмутазы (СОД) использовали метод, основанный на способности фермента угнетать реакцию аутоокисления адреналина (Fluka, Германия) в адренхром при pH 10,2; активность СОД выражали в условных единицах из расчета на 1 мг белка за 1 мин. Активность каталазы определяли по кинетике разрушения H_2O_2 (Riedel-deHaen, Германия) и выражали в микромолях утилизованной H_2O_2 на 1 мг белка за 1 мин. Активность глутатионпероксидазы и глутатионредуктазы измеряли по уменьшению никотинамидадениндинуклеотидфосфата (NADPH) в соединенной глутатионредуктазной реакции с добавлением в реактивную смесь соответствующих реагентов (Sigma, США) и выражали в наномолях окисленного NADPH на 1 мг белка за 1 мин. Содержание белка в головном мозге оценивали по методу Лоури.

Статистический анализ результатов проводили с помощью t-критерия Стьюдента. Различие между показателями считали статистически достоверным при значении $p < 0,05$. Для статистического анализа результатов использовали программу Statistica 7.0 (StatSoft Inc., США).

Таблица 1. Морфометрические показатели нейронов компактной части черной субстанции у взрослых мышей экспериментальных групп, $M \pm m$

Линия мышей	Экспериментальная группа				
	Контроль	МФТП 12 мг/кг \times 4, самки	МФТП 12 мг/кг \times 4, самцы	МФТП 30 мг/кг \times 1, самки	МФТП 30 мг/кг \times 1, самцы
Площадь перикариона, $\mu\text{м}^2$					
FVB/N	457,52 \pm 34,71	393,21 \pm 35,32	350,8 \pm 57,3	231,93 \pm 20,31 ^{*, **}	253,91 \pm 11,90 [*]
129/Sv	639,1 \pm 81,2 [#]	353,61 \pm 14,92 [*]	515,31 \pm 29,91 ^{*, &}	363,1 \pm 20,2 ^{*, #}	256,22 \pm 37,31 ^{*, **, &}
Количество поврежденных нейронов, %					
FVB/N	3,63 \pm 0,81	60,12 \pm 21,91 [*]	60,21 \pm 5,42 [*]	94,33 \pm 4,71 [*]	70,62 \pm 15,62 [*]
129/Sv	3,32 \pm 1,21	47,62 \pm 14,91 [*]	49,0 \pm 4,3 ^{*, #}	70,72 \pm 20,71 [*]	98,21 \pm 8,62 ^{*, **, &}

Примечания: контроль — объединенные значения показателей у самцов и самок; * — $p < 0,05$ по сравнению с контролем; ** — $p < 0,05$ по сравнению с дозой МФТП 12 мг/кг, 4 инъекции; # — $p < 0,05$ по сравнению с линией FVB/N; & — $p < 0,05$ по сравнению с самками.

Таблица 2. Морфометрические показатели нейронов компактной части черной субстанции у стареющих мышей после одной инъекции МФТП в дозе 30 мг/кг, $M \pm t$

Показатель	Мыши линии FVB/N		Мыши линии 129/Sv	
	Контроль	МФТП	Контроль	МФТП
Площадь перикариона, $\mu\text{м}^2$	511,50 \pm 34,61	349,12 \pm 32,80 [*]	450,21 \pm 40,21	350,02 \pm 60,78
Доля поврежденных нейронов, %	3,75 \pm 0,91	28,92 \pm 4,21 [*]	1,22 \pm 0,39	30,52 \pm 3,49 [*]

Примечание: * — $p < 0,05$ по сравнению с группой контроля.

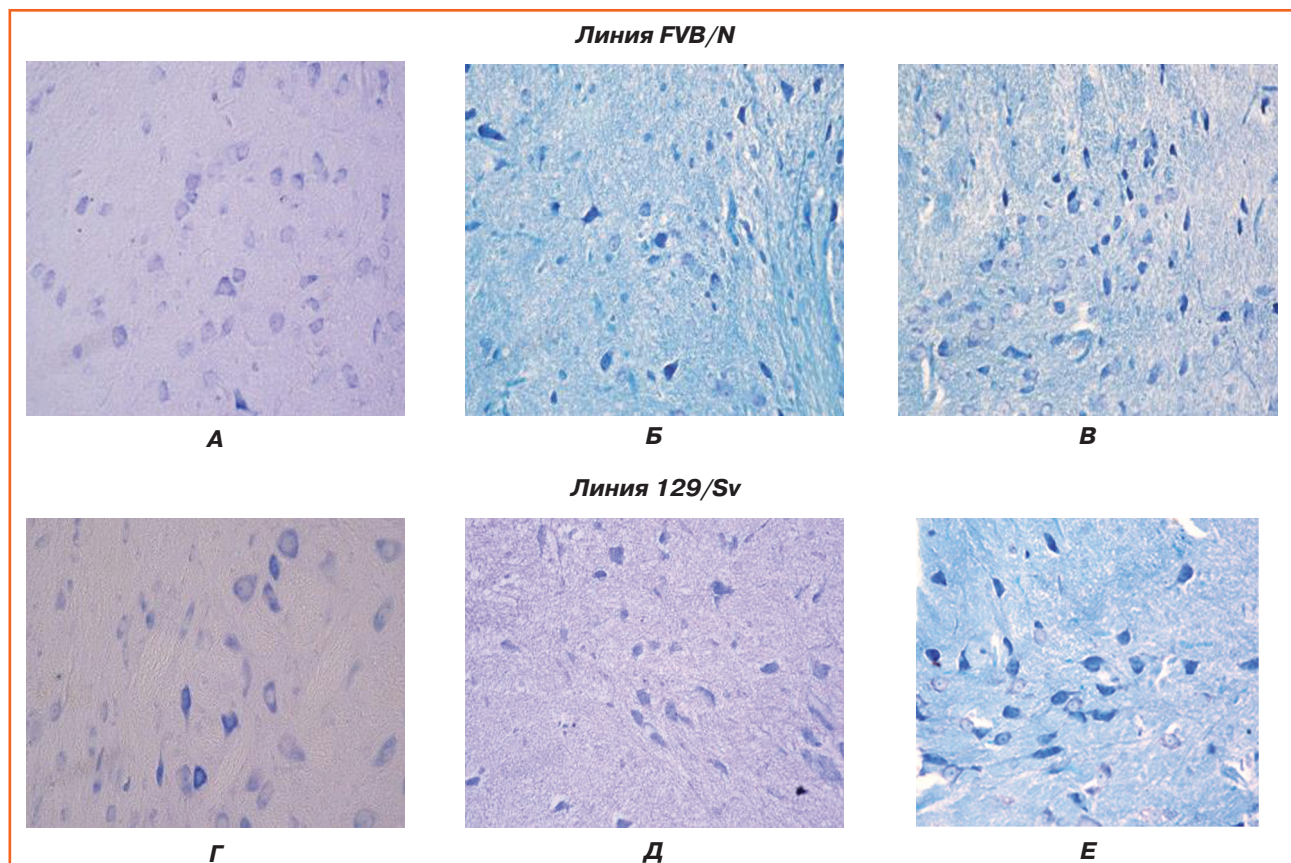


Рисунок 1. Структура нейронов компактной части черной субстанции у взрослых мышей экспериментальных групп: А, Г — контроль; Б, Д — МФТП в дозе 12 мг/кг 4 раза; В, Е — МФТП в дозе 30 мг/кг 1 раз. Окраска по Нисслю, $\times 400$

Итак, системное введение МФТП приводит к повреждению структуры нейронов компактной части черной субстанции мышей линии FVB/N и 129/Sv разного возраста, однако у стареющих мышей подобный эффект нейротоксина менее выраженный, чем у взрослых животных.

Влияние МФТП на показатели поведения у мышей. Ранее нами установлено, что у взрослых мышей линии FVB/N и 129/Sv после 4-кратного введения МФТП в дозе 12 мг/кг появляются двигательные нарушения, тогда как после однократной инъекции в дозе 30 мг/кг — не только моторные, но и немоторные симптомы [16]. В данной работе нами изучены возрастные особенности изменений поведения у мышей линии FVB/N и 129/Sv после однократного введения МФТП в дозе 30 мг/кг (табл. 3).

Установлено, что у взрослых мышей линии FVB/N после инъекции нейротоксина существенно увеличивается число квадратов, время удержания на валу, а также уменьшается число стоек, заглядываний в норки и длина стопы по сравнению с контрольной группой. У стареющих опытных мышей этой линии число квадратов повышается, тогда как длина тела и шага уменьшаются. У взрослых мышей линии 129/Sv под влиянием МФТП число стоек, заглядываний в норки и длина шага снижаются, а число болюсов увеличива-

ется. Число квадратов, стоек, заглядываний в норки и длина шага у стареющих опытных мышей были меньше, чем в контроле.

Итак, однократное введение МФТП в дозе 30 мг/кг приводит к изменениям поведения у взрослых и стареющих мышей линии FVB/N и 129/Sv. При этом эффект нейротоксина у взрослых мышей проявляется в моторных и немоторных нарушениях поведения, а у стареющих — в преимущественном изменении двигательной активности. Кроме того, у стареющих мышей некоторые показатели двигательной функции изменяются значительно, чем у взрослых.

Влияние МФТП на показатели оксидативного стресса и антиоксидантной защиты головного мозга мышей. Установлено, что содержание МДА в головном мозге мышей линии FVB/N и 129/Sv обеих возрастных групп повышается после введения МФТП (табл. 4). У взрослых опытных мышей линии FVB/N активность каталазы и ГР в головном мозге снижается, тогда как у стареющих мышей — повышается (табл. 4). У взрослых мышей линии 129/Sv активность СОД и ГР повышается после инъекции МФТП, а у стареющих мышей наблюдается снижение активности каталазы и рост активности ГР (табл. 4).

Следовательно, под влиянием МФТП в головном мозге мышей линии FVB/N и 129/Sv обеих возрастных групп изменяется баланс между содержанием МДА и

активностью некоторых антиоксидантных ферментов, направленность изменений которой зависит от возраста мышей.

Обсуждение

Влияние МФТП на морфофункциональные изменения нервной системы, факторов оксидативного стресса и антиоксидантной защиты у взрослых мышей. Исследованиями М. Ugrumov и соавт. [9] показано, что в черной субстанции мышей-самцов в возрасте 1,5–3 мес. после 4-кратного введения МФТП в дозе 12 мг/кг с интервалом 2 ч или одноразового в дозе 30 мг/кг повреждается соответственно до 43 % или более чем 72 % нейронов. Нами для экспериментов были использованы мыши в возрасте 6–7 мес., которые представляют адекватный возрастной объект для моделирования паркинсонизма. После введения МФТП в двух схемах взрослым самцам и самкам мышей линии FVB/N и 129/Sv нами также выявлены повреждения

структуры нейронов компактной части черной субстанции, на выраженность которых влияла схема введения нейротоксина. Эти данные морфологических исследований согласуются с полученными ранее данными оценки поведения у таких мышей [16].

В настоящей работе мы подтвердили факт значительного снижения двигательной функции у взрослых мышей линии FVB/N и 129/Sv после однократного введения МФТП в дозе 30 мг/кг, что наблюдается на фоне существенного повреждения структуры нейронов черной субстанции. Усиление же горизонтальной локомоторной активности у опытных мышей-самок линии FVB/N может быть связано с временным повышением содержания внеклеточного дофамина в среднем мозге [17]. Обнаруженные нами изменения эмоциональной и исследовательской активности после введения МФТП мышам разных линий, скорее всего, развиваются в результате влияния нейротоксина на

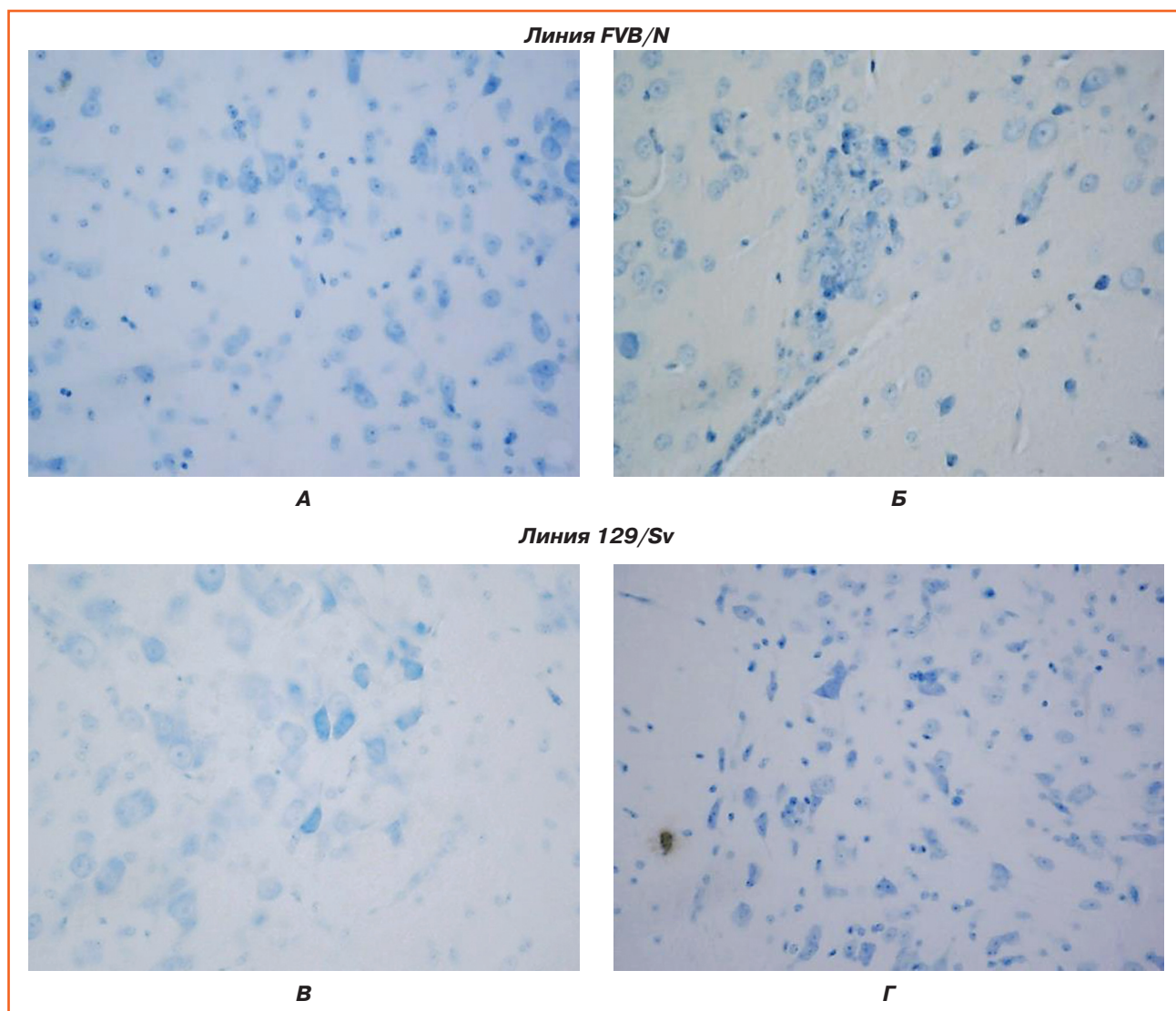


Рисунок 2. Структура нейронов компактной части черной субстанции у стареющих мышей экспериментальных групп: А, В – контроль; Б, Г – МФТП в дозе 30 мг/кг, 1 раз. Окраска по Нисслю, × 400

структуры головного мозга, их регулирующие [4, 18]. Вызывает интерес установленный факт линейных и гендерных особенностей изменений некоторых показателей поведения после инъекций МФТП взрослым мышам. Подобные различия в поведении можно объяснить разной чувствительностью таких мышей к действию нейротоксина, что обусловлено особенностями активности моноаминоксидазы В головного

мозга, кинетики переносчика дофамина и толерантности к оксидативному стрессу [19].

Известно, что одним из факторов оксидативного стресса, который повреждает нейроны черной субстанции как у пациентов с БП, так и у мышей с МФТП моделью паркинсонизма, является МДА [4, 6]. Он образуется в результате пероксидации полиненасыщенных жирных кислот и способен вступать в реакцию с

Таблица 3. Показатели поведения у мышей разного возраста и линий после введения МФТП в дозе 30 мг/кг 1 раз, $M \pm m$

Показатель	Мыши линии FVB/N				Мыши линии 129/Sv			
	Взрослые		Стареющие		Взрослые		Стареющие	
	К	МФТП	К	МФТП	К	МФТП	К	МФТП
Число квадратов	109,02 ± 11,40	152,00 ± 15,41*	89,19 ± 5,00	138,29 ± 5,30*	43,19 ± 4,30	42,60 ± 3,49	56,01 ± 14,00	13,50 ± 5,31*.*
Число стоек	28,80 ± 4,78	14,40 ± 4,61*	12,30 ± 1,89#	17,20 ± 2,09	1,78 ± 0,60	0,10 ± 0,01*	1,51 ± 0,30	0,10 ± 0,01*
Число заглядываний в норки	7,21 ± 0,99	4,80 ± 0,39*	5,01 ± 0,99#	7,01 ± 1,19	0,80 ± 0,19	0,10 ± 0,01*	1,50 ± 0,39	0,10 ± 0,01*
Число болюсов	0,40 ± 0,19	0,10 ± 0,01	0,10 ± 0,01	0,10 ± 0,01	0,2 ± 0,1	1,8 ± 0,6*	1,5 ± 0,4#	1,01 ± 0,29
Длина тела, мм	73,01 ± 1,49	76,00 ± 3,01	97,01 ± 2,00#	91,00 ± 2,00*.*	77,21 ± 1,19	75,80 ± 3,01	99,02 ± 3,00#	101,01 ± 1,00#
Длина шага, мм	46,40 ± 2,31	44,51 ± 2,09	41,79 ± 2,30	34,11 ± 2,90*.*	51,2 ± 5,0	37,20 ± 1,39*	43,81 ± 4,89	24,70 ± 3,21*.*
Длина стопы, мм	13,00 ± 0,29	11,21 ± 0,59*	12,28 ± 0,70	11,80 ± 0,69	13,72 ± 0,39	13,21 ± 0,60	13,50 ± 0,69	14,00 ± 0,42
Ширина стопы, мм	8,3 ± 0,2	8,12 ± 0,21	8,78 ± 0,30	8,92 ± 0,10	7,20 ± 0,41	6,92 ± 0,30	8,02 ± 0,28	8,8 ± 0,3#
Удержание на валу, с	572,21 ± 74,18	780,10 ± 70,09*	1058,8 ± 94,9#	1190,0 ± 9,3#	139,40 ± 36,19	171,20 ± 31,18	393,00 ± 62,51#	338,01 ± 134,71

Примечания: здесь и в табл. 4: К – контроль; * – $p < 0,05$ по сравнению с группой контроля; # – $p < 0,05$ по сравнению со взрослыми мышами.

Таблица 4. Показатели оксидативного стресса и антиоксидантной защиты головного мозга у мышей разного возраста и линий после одной инъекции МФТП в дозе 30 мг/кг, $M \pm m$

Показатель	Мыши линии FVB/N				Мыши линии 129/Sv			
	Взрослые		Стареющие		Взрослые		Стареющие	
	К	МФТП	К	МФТП	К	МФТП	К	МФТП
Малоновый диальдегид, нмоль/мг	0,42 ± 0,10	0,74 ± 0,10*	1,07 ± 0,19#	2,01 ± 0,20*.*	0,66 ± 0,09	0,53 ± 0,10	0,35 ± 0,11#	0,69 ± 0,13*.*
Супероксид-дисмутаза, ед/мг × мин	13,11 ± 2,10	13,2 ± 2,2	14,61 ± 2,49	14,81 ± 2,60	13,1 ± 0,5	15,0 ± 0,9*	12,02 ± 2,50	13,03 ± 2,70
Каталаза, мкмоль/мг × мин	1,34 ± 0,11	1,05 ± 0,10*	0,95 ± 0,09#	1,44 ± 0,18*	0,66 ± 0,10	0,73 ± 0,12	1,49 ± 0,30#	0,91 ± 0,09*
Глутатионпероксидаза, нмоль/мг × мин	7,01 ± 1,78	7,21 ± 1,99	8,61 ± 2,10	9,03 ± 2,50	7,80 ± 1,89	8,81 ± 2,50	8,42 ± 2,50	9,33 ± 1,90
Глутатион-редуктаза, нмоль/мг × мин	24,31 ± 3,30	17,10 ± 1,21*	17,61 ± 1,06	21,33 ± 0,76*.*	31,00 ± 1,59	35,91 ± 1,79*	26,92 ± 1,59	32,8 ± 1,9*

нуклеиновими кислотами, фосфолипідами і амінокислотами. По нашим даним, під впливом МФТП содержание МДА в головном мозге взрослых мышей линии FVB/N повышается, что сочетается со снижением активности каталазы и ГР. В то же время увеличение активности СОД и ГР в головном мозге опытных взрослых мышей линии 129/Sv наблюдается на фоне отсутствия изменений содержания МДА. Линейные различия в изменении активности антиоксидантных ферментов у мышей после введения МФТП могут отражать особенности состояния антиоксидантной защиты головного мозга. Так, по нашим данным, для взрослых мышей линии 129/Sv характерна более высокая, чем у мышей линии FVB/N, активность некоторых антиоксидантных ферментов головного мозга, что способствует снижению содержания МДА еще в ранние сроки действия нейротоксинов [10, 16]. Кроме факторов оксидативного стресса, токсическое влияние МФТП на нейроны черной субстанции мышей может быть опосредовано синтезируемыми активированной микроглией провоспалительными цитокинами (TNF- α , IL-1 β , IFN- γ), а также продуктами инфильтрирующих головной мозг Т-лимфоцитов [19].

Влияние МФТП на морфофункциональные изменения нервной системы, факторов оксидативного стресса и антиоксидантной защиты у стареющих мышей. Нами установлено, что токсический эффект МФТП на нейроны черной субстанции и поведение стареющих мышей линии FVB/N и 129/Sv менее значительный, чем у взрослых животных. Результаты согласуются с исследованиями D. Huang и соавт. [20], которые обнаружили у стареющих мышей после введения МФТП менее выраженное снижение концентрации дофамина в стриатуме по сравнению с молодыми животными. Возрастные различия чувствительности клеток головного мозга мышей исследованных нами линий к действию нейротоксина могут быть результатом развития в органе при старении оксидативного стресса, усиления продукции провоспалительных цитокинов, инфильтрации Т-лимфоцитами и макрофагами [10, 21, 22]. Имеет также значение изменение с возрастом темпов метаболизма нейротоксических веществ в организме животных [11].

Обращает на себя внимание факт значительных изменений двигательной функции у стареющих мышей линии FVB/N и 129/Sv после введения МФТП, что наблюдается на фоне повреждения нейронов черной субстанции только до 30 %. Из литературы известно, что при старении изменяются пути влияния на ЦНС не только регуляторных, но и токсических веществ [11, 21, 22]. Поэтому не исключено, что в развитие нарушений двигательной активности у стареющих мышей, получавших МФТП, могут вовлекаться такие структуры головного мозга, как моторная кора, мозжечок, двигательный отдел таламуса и т.д. [23, 24]. Показано также, что в условиях действия нейротоксинов пролонгированная активация клеток микроглии и макроглии головного мозга стареющего организма имеет значение для развития повреждений нервных клеток

[22]. Кроме того, фактором, повреждающим не только клетки черной субстанции, но и другие структуры головного мозга, может быть МДА, содержание которого, по нашим данным, значительно повышается у стареющих мышей после инъекции МФТП. При этом усиление активности некоторых антиоксидантных ферментов в головном мозге опытных стареющих мышей может отражать возрастные изменения их реакции на действие оксидативного стресса в условиях влияния МФТП. Подобный характер отсроченной активации антиоксидантных ферментов головного мозга мы наблюдали у стареющих мышей в ответ на прием нейротоксина купризонна [10].

Таким образом, у мышей линии FVB/N и 129/Sv обнаружены возрастные различия влияния МФТП на структуру нейронов компактной части черной субстанции, показатели поведения и состояние антиоксидантной защиты головного мозга. Изучение эффектов МФТП на мышах разного возраста, линий и пола дает возможность глубже понять механизмы развития БП/паркинсонизма и обосновать подходы к индивидуализированной терапии этой патологии с учетом ее возрастного и гендерного аспектов.

Выводы

1. У взрослых мышей линии FVB/N и 129/Sv под влиянием МФТП уменьшается площадь перикариона и нарушается структура нейронов компактной части черной субстанции головного мозга. Выраженность повреждающего эффекта нейротоксина на черную субстанцию в значительной степени зависит от схемы его введения, пола и линии мышей.

2. У стареющих мышей линии FVB/N и 129/Sv количество поврежденных МФТП нейронов в компактной части черной субстанции существенно меньше, чем у взрослых животных.

3. После введения МФТП у взрослых мышей линии FVB/N и 129/Sv наблюдаются двигательные и недвигательные изменения поведения, тогда как у стареющих — преимущественно двигательные нарушения поведения.

4. В головном мозге взрослых и стареющих мышей обеих линий содержание МДА существенно повышается после инъекции МФТП. У таких мышей направленность изменений активности некоторых антиоксидантных ферментов (повышение и снижение) зависит от их возраста и линии.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии какого-либо конфликта интересов при подготовке данной статьи.

Информация о финансировании. Исследования выполнены по бюджетной теме № 0119U000087 при финансовой поддержке НАМНУ.

Список литературы

1. Karaban I.N., Karaban N.V., Karasevych N.V. The ways of neuroprotection in Parkinson's disease *International neurological journal*. 2011. № 6(44). P. 95-99.

2. Sulzев D., Surmeiter D.J. Neuronal vulnerability, pathogenesis and Parkinson's disease. *Mov. Disord.* 2013. Vol. 28. P. 715-724. doi: 10.1002/mds.25095.
3. Zagni E., Simoni L., Colombo D. Sex and gender differences in central nervous system-related disorders. *NeuroSci J.* 2016. Article ID 2827090. 13 p. <http://dx.doi.org/10.1155/2016/2827090>.
4. Guo J.-D., Zhao X., Li Y., Li G.-R., Liu X.-L. Damage to dopaminergic neurons by oxidative stress in Parkinson's disease (Review). *Int. J. of molecular medicine.* 2018. Vol. 41. P. 1817-1825. doi: 10.3892/ijmm.2018.3406.
5. Labunets I.F., Talanov S.A., Vasilyev R.G., Rodnichenko A.E., Utko N.A., Kyzminova I.A. et al. Thymic hormones, antioxidant enzymes and neurogenesis in bulbus olfactorius of rats with hemiparkinsonism: effect of melatonin. *Int. J. Phys. Pathophys.* 2016. Vol. 7. № 4. P. 285-298. DOI: 10.1615/IntJPhysPathophys.v7.i4.10.
6. Hwang O. Role of oxidative stress in Parkinson's disease. *Exp. Neurobiol.* 2013. Vol. 22. № 1. P. 11-17. doi: 10.5607/en.2013.22.1.11.
7. Gonchar O., Mankovska I., Rozova K., Bratus L., Karaban I. Novel approaches to correction of mitochondrial dysfunction and oxidative disorders in Parkinson's disease. *Fiziol. Zh.* 2019. Vol. 65. № 3. P. 61-72. <https://doi.org/10.15407/12.65.03.06>.
8. Zeng X.S., Geng W.Sh., Jia J.J. Neurotoxin-induced animal models of Parkinson disease: pathogenic mechanism and assessment. *ASN Neuro.* 2018. Vol. 10. P. 1-15. doi: 10.1177/175909/41877438.
9. Ugrumov M.V., Khaindrava V.G., Kozina E.A., Kkucheryanu V.G., Bocharov E.V., Kryzhanovsky G.N. et al. Modeling of preclinical and clinical stages of Parkinson's disease in mice. *Neuroscience.* 2011. Vol. 181. P. 175-188. doi: 10.1016/j.neuroscience.2011.03.007.
10. Labunets I.F. Possibilities and prospects of the application of the in vivo and in vitro toxic cuprizone model for demyelination in experimental and clinical neurology (literature review and own research results). *Ukrain's'kiy nevrologichnyi zhurnal. Ukrainian Neurological Journal.* 2018. № 2. P. 63-68. <https://doi.org/10.30978/UNZ2018263>.
11. Jackson-Lewis V., Przedborski S. Protocol for the MPTP mouse model of Parkinson's disease. *Nature Protocols.* 2007. Vol. 2. № 1. P. 141-151. doi: 10.1038/nprot.2006.342.
12. Franklin K. *The mouse brain in stereotaxic coordinates.* Gulf Professional Publishing. 2004. 101 p.
13. Amikishieva A.V. Behavioral phenotyping: up-to date methods and equipment. *Vestnik VOGiS.* 2009. Vol. 13. № 3. P. 529-542.
14. Fernagut P.O., Diguett E., Labattu B., Tison F. A simple method to measure stride length as an index of nigrostriatal dysfunction in mice. *J. Neurosci. Methods.* 2002. Vol. 113. № 2. P. 123-130. DOI: 10.1016/s0165-0270(01)00485-x.
15. Uchiyama M., Mihara M. Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. *Anal. Biochem.* 1978. Vol. 86. № 1. P. 271-278. DOI: 10.1016/0003-2697(78)90342-1.
16. Labunets I.F. Behavioral features in the mice of various strains and sex with model of parkinsonism. *Fiziol. Zh.* 2020. Vol. 66. № 1. P. 18-24. ISSN 0201-8489. DOI: <https://doi.org/10.15407/fz>. ISSN 0201-8489.
17. Torres E.R., Akinyeke T., Stagaman K., Duvoisin R.M., Meshul Ch.K., Sharpton Th.J. et al. Effects of sub-chronic MPTP exposure on behavioral and cognitive performance and the microbiome of wild-type and mGlu8 knockout female and male mice. *Front. Behav. Neurosci.* 2018. Vol. 12. Article 140. 15 p. doi: 10.3389/fnbeh.2018.00140. eCollection 2018.
18. Mathai A., Ma Y., Pare J.-F., Villalba R.M., Wichmann Th., Smith Y. Reduced cortical innervation of the subthalamic nucleus in MPTP-treated parkinsonian monkeys. *Brain.* 2015. Vol. 138. P. 946-952. doi: 10.1093/brain/awv018.
19. Meredith G.E., Rademacher D.J. MPTP mouse models of Parkinson's disease: an update. *J. Parkinsons Dis.* 2011. Vol. 1. № 1. P. 19-33. doi: 10.3233/JPD-2011-11023.
20. Huang D., Xu J., Wang J., Tong J., Bai X, Li H. et al. Dynamic changes in the nigrostriatal pathway in the MPTP mouse model of Parkinson's disease. *Parkinson disease.* 2017. Article ID 9349487. 7 p. <https://doi.org/10.1155/2017/9349487>.
21. Labunets I.F. Changes of thymic endocrine function, brain macrophages and T-lymphocytes in mice of different ages after administration of neurotoxin cuprizone and cytokine. *International Neurological Journal.* 2018. № 4(98). P. 114-120. DOI: 10.22141/2224-0713.4.98.2018.139434.
22. Freitas H.R., Ferreira G.D.C., Trevenzoli I.H., Oliveira K.J., de Melo Reis R.A. Fatty acids, antioxidants and physical activity in brain aging. *Nutrients.* 2017. Vol. 9. № 11. P. E1263. doi: 10.3390/nu9111263.
23. Guo L., Xiong H., Kim J.-I., Wu Y.-W., Laichandani R.R., Cui Y. et al. Dynamic re-wiring of neural circuits in the motor cortex in mouse models of Parkinson's disease. *Nat. Neurosci.* 2015. Vol. 18. № 9. P. 1299-1309. doi: 10.1038/nn.4082.
24. Mathai A., Ma Y., Pare J.-F., Villalba R.M., Wichmann Th., Smith Y. Reduced cortical innervation of the subthalamic nucleus in MPTP-treated parkinsonian monkeys. *Brain.* 2015. Vol. 138. P. 946-962. doi: 10.1093/brain/awv018.

Получено/Received 11.02.2020

Рецензировано/Revised 21.02.2020

Принято в печать/Accepted 26.02.2020 ■

Лабунець І.Ф., Утко Н.О., Савосько С.І., Пантелеймонова Т.М., Бутенко Г.М.
 ДУ «Інститут генетичної та регенеративної медицини НАМН України», м. Київ, Україна

Зміни структури нейронів чорної субстанції, показників антиоксидантного захисту головного мозку й поведінки в мишей різного віку з МФТП моделлю паркінсонізму

Резюме. Актуальність. При хворобі Паркінсона масова загибель дофамінергічних нейронів чорної субстанції головного мозку призводить до появи характерних рухових порушень. Показано вплив віку й оксидативного стресу на її розвиток. **Мета:** оцінити вплив нейротоксину 1-метил-4-феніл-1,2,3,6-тетрагідропіридину (МФТП) на зміни структури нейронів чорної субстанції, факторів оксидатив-

ного стресу й антиоксидантного захисту головного мозку, а також поведінки в мишей різного віку. **Матеріали та методи.** Мишам лінії FVB/N і 129/Sv віком 6–7 міс. вводили МФТП у дозі 12 мг/кг 4 рази через 2 год або 30 мг/кг 1 раз; мишам віком 15–16 міс. нейротоксин вводили в дозі 30 мг/кг 1 раз. **Результати.** У дорослих мишей обох ліній і статей МФТП у дозі 12 мг/кг, 4 ін'єкції, ушкоджує струк-

туру від 48 до 60 % нейронів компактної частини чорної субстанції, а після однієї ін'єкції в дозі 30 мг/кг — від 71 до 98 % нейронів. Введення МФТП 1 раз у дозі 30 мг/кг старіючим мишам обох ліній і статей ушкоджує структуру до 30 % нейронів компактної частини чорної субстанції. Під впливом однакової дози нейротоксину у дорослих мишей спостерігається порушення моторної та немоторної активності, а у старіючих — переважно рухової активності, які оцінювались у тестах «відкрите поле», на ригідність та у ротарод-тесті. Вміст малонового діальдегіду суттєво зростає у головному мозку підслідних дорослих і старіючих мишей,

тоді як зміни активності супероксиддисмутизи, каталази і глутатіонредуктази (зменшення та зростання) залежать від віку та лінії тварин. **Висновки.** Таким чином, існують вікові особливості впливу МФТП на структуру нейронів чорної субстанції, активність антиоксидантних ферментів головного мозку й поведінку мишей. Результати можуть бути корисними при вивченні патогенезу паркінсонізму й розробці індивідуалізованих підходів до його терапії.

Ключові слова: нейротоксин МФТП; паркінсонізм; нейрони чорної субстанції; малоновий діальдегід та антиоксидантні ферменти головного мозку; поведінкові реакції

I.F. Labunets, N.A. Ut'ko, S.I. Savosko, T.N. Panteleymonova, G.M. Butenko

SI "Institute of Genetic and Regenerative Medicine of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine", Kyiv, Ukraine

Changes in nigral neuronal structure, indices of antioxidant protection of the brain and behavior in mice of different age with MPTP parkinsonism model

Abstract. Background. Mass death of the nigral dopaminergic neurons of the brain at Parkinson's disease leads to the appearance of typical motor disorders. The effect of age and oxidative stress in its development is shown. This study aimed at the assessment of the effects of neurotoxin 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) on changes in the structure of nigral neurons, oxidative stress and antioxidant protection of the brain, as well as the behavior of the mice of various age. **Materials and methods.** FVB/N and 129/Sv male and female mice aged 6–7 months were injected with MPTP at the dose of 12 mg/kg 4 times every two hours or at the dose of 30 mg/kg once per day. Mice aged 15–16 months were injected once with neurotoxin at a dose of 30 mg/kg. **Results.** Four injections (12 mg/kg) and one injection (30 mg/kg) of MPTP resulted in the damage to the structure in 48–60 % and 71–98 % of neurons of the compact part of substantia nigra in adult mice of both strains and sex, respectively. A single injection of MPTP at the dose of 30 mg/kg to aging mice damaged to

the structure of about 30 % of the neurons in the compact part of substantia nigra. The results of open field tests, rigidity and the rotarod tests showed that the same dose of neurotoxin resulted in the impairment of motor and non-motor activities and mainly in the motor activity in adult and aging mice, respectively. The content of malondialdehyde significantly increases in the brain of experimental adults and aging mice, while changes in the activity of superoxide dismutase, catalase and glutathione reductase (decrease and increase) depend on the age and strain. **Conclusions.** There are age-related differences in the effect of MPTP on the structure of nigral neurons, on the activity of antioxidant enzymes in the brain and on the behavior of mice. The results may be useful in studying parkinsonism pathogenesis and developing individualized approaches to its therapy.

Keywords: neurotoxin MPTP; parkinsonism; nigral neurons; malondialdehyde and antioxidant enzymes of the brain; behavioral reactions