

ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО НАУЧНЫХ ОРГАНИЗАЦИЙ
ФГБУН ИНСТИТУТ БИОЛОГИИ РАЗВИТИЯ ИМ. Н.К. КОЛЬЦОВА РАН

УДК 612.43.

№ ИС ГЗ 0108-2015-0064



УТВЕРЖДАЮ
Директор ИБР РАН
Член-корреспондент РАН
А.В. Васильев

«27» января 2017 г.

ОТЧЕТ

О НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЙ РАБОТЕ

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ РАЗРАБОТКА НОВОЙ ТЕХНОЛОГИИ ДИАГНОСТИКИ
БОЛЕЗНИ ПАРКИНСОНА НА ДОКЛИНИЧЕСКОЙ (ДОСИМПТОМНОЙ) СТАДИИ С
ПОМОЩЬЮ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОГО ПРОВОКАЦИОННОГО ТЕСТА

Программы Президиума РАН П.1П «Фундаментальные исследования для разработки
медицинских технологий»

(отчет за 2016 г.)


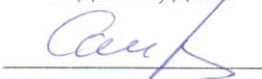



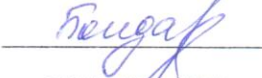

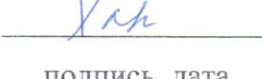

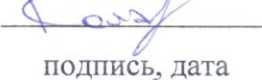
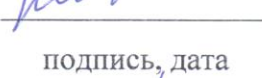
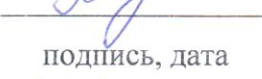
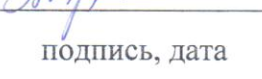
Руководитель темы, акад., зав. лаб.

М.В. Угрюмов

подпись, дата

Москва, 2017

СПИСОК ИСПОЛНИТЕЛЕЙ

Руководитель, академик РАН, д-р биологических наук	 _____	М.В. Угрюмов
	подпись, дата	
Исполнители:	 _____	А.Я. Сапронова
Кандидат биол. наук	подпись, дата	
Кандидат биол. наук	 _____	Т.С. Пронина
	подпись, дата	
Кандидат биол. наук	 _____	Е.В. Волина
	подпись, дата	
Кандидат биол. наук	 _____	Е.А. Козина
	подпись, дата	
Кандидат биол. наук	 _____	Н.С. Бондаренко
	подпись, дата	
Кандидат биол. наук	 _____	Л.К. Дульмухаметова
	подпись, дата	
Кандидат биол. наук	 _____	Г.Р. Хакимова
	подпись, дата	
Младший научный сотрудник	 _____	Ю.О. Никишина
	подпись, дата	
Младший научный сотрудник	 _____	А.А. Колачева
	подпись, дата	
Младший научный сотрудник	 _____	А.Р. Ким
	подпись, дата	
Младший научный сотрудник	 _____	А.Ю. Курина
	подпись, дата	
Младший научный сотрудник	 _____	Э.Р. Мингазов
	подпись, дата	

СОДЕРЖАНИЕ

Реферат	4
Введение	5
Обозначения и сокращения	6
Результат	7
Публикации по теме	11

Реферат

Отчет 10 с, 1 ч., 5 рис., 1 источник (публикация)

Ключевые слова: болезнь Паркинсона, диагностика, провокационный тест, α -метил-п-тирозин (α МПТ), досимптомная стадия БП, ингибитор тирозингидроксилазы, ДА-ергические нейроны

Цель проекта - экспериментальная (доклиническая) разработка новой технологии диагностики паркинсонизма на досимптомной стадии с помощью фармакологического провокационного теста.

Задачи проекта на 2016 год:

Получение доказательств отсутствия отдаленных негативных последствий временного ингибирования синтеза ДА при использовании α МПТ на функциональную активность сохранившихся (выживших после действия нейротоксина) нигростриатных ДА-ергических нейронов.

Получение доказательств того, что кратковременное использование α МПТ не приводит к развитию хронических патологических процессов ни в центральной, ни в периферической нервной системах, а в конечном счете не приводит к нарушению регуляции и функционирования нейроэндокринной и сердечно-сосудистой висцеральных систем.

Введение

В последние годы показано, что одно из самых распространенных нейродегенеративных заболеваний – болезнь Паркинсона (БП), является полигенным, системным и долгое время развивается без проявления специфических симптомов за счет высокой нейропластичности. Из современных представлений о патогенезе БП следует, что характерные нарушения моторной функции появляются только после почти полной гибели ключевых регуляторных нейронов и «истощения» компенсаторных резервов мозга. Пороговой для появления симптомов является потеря 50-60% тел нейронов в черной субстанции и 65-75% аксонов в стриатуме, а также снижение содержания дофамина (ДА) в стриатуме на 65-75%. Это означает, что лечение больного начинается на той стадии заболевания, когда уже практически отсутствуют мишени для фармакотерапии. Неудивительно, что на этом фоне все попытки лечения не приводят к излечиванию больных. Отсюда следует необходимость создания досимптомной диагностики – задолго до появления клинических симптомов, и разработки нейропротекторной терапии, направленной на остановку или хотя бы на значительное замедление гибели нейронов.

Была предложена гипотеза о возможности использования для досимптомной диагностики БП так называемого провокационного теста, основанного на кратковременном усугублении функциональной недостаточности деградирующей нигростриатной ДА-ергической системы. Для этого можно использовать α -метил-п-тирозин (α МПТ) – специфический обратимый ингибитор тирозингидроксилазы, ключевого фермента синтеза ДА. При введении определенных доз α МПТ у людей с досимптомной формой БП должно происходить снижение содержания ДА до порогового уровня, при котором временно должны проявиться нарушения двигательной функции. Такое же воздействие на нормального человека не должно приводить к нарушению двигательной функции.

Ранее на экспериментальных моделях досимптомной стадии БП, которые были разработаны в последние годы в нашей лаборатории, была подобрана доза α МПТ, вызывающая моторные нарушения у мышей на модели продвинутой досимптомной стадии БП, но не у здоровых мышей. Также были показаны обратимость действия α МПТ и отсутствие у него побочных эффектов на катехоламинергические нейроны и контролируемые ими функции через 24 часа и 7 дней после введения ингибитора.

Обозначения и сокращения:

БП – болезнь Паркинсона

ВЭЖХ-ЭД - высокоэффективная жидкостная хроматография с электрохимической детекцией

5-ГИУК - 5-гидроксииндолуксусная кислота

ДА – дофамин

ДОФУК - диоксифенилуксусная кислота

α МПТ - α -метил-п-тирозин

МФТП - -метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридин (нейротоксин)

Результаты

Для проверки того что α МПП в дозе 50 мг/кг не оказывает отдаленного влияния на функциональную активность сохранившихся nigrostriatalных DA-ергических нейронов, была проведена оценка моторной активности и уровня DA и его метаболитов в стриатуме мышей на моделях ранней и продвинутой досимптомной стадии БП через 7 дней после введения ингибитора.

Для моделирования БП использовали самцов мышей линии C57Bl/6 в возрасте 2-2,5 месяца и массой 22-25 г. Животным делали подкожные инъекции 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридина (МФТП) – пронеуротоксина, вызывающего специфическую гибель DA-ергических нейронов. Модели ранней досимптомной и продвинутой досимптомной стадий БП воспроизводили, соответственно, однократным и двукратным введением МФТП в разовой дозе 12 мг/кг с двухчасовым интервалом между инъекциями. Животные контрольной группы получали 0.9% NaCl по аналогичной схеме.

Через 14 дней после введения МФТП половине экспериментальных животных и половине контрольных вводили подкожно α МПП в дозе 50 мг/кг, второй половине экспериментальных и контрольных животных – 0.9% NaCl.

Далее, через 7 дней после введения α МПП оценивали моторную активность животных в тесте «Открытое поле» по величине пройденного пути с использованием автоматизированной поведенческой установки "ActiMot2" ("TSE Systems", Германия), после чего животных декапитировали, выделяли стриатум и оценивали уровень DA и метаболитов в нем с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии с электрохимической детекцией (ВЭЖХ-ЭД).

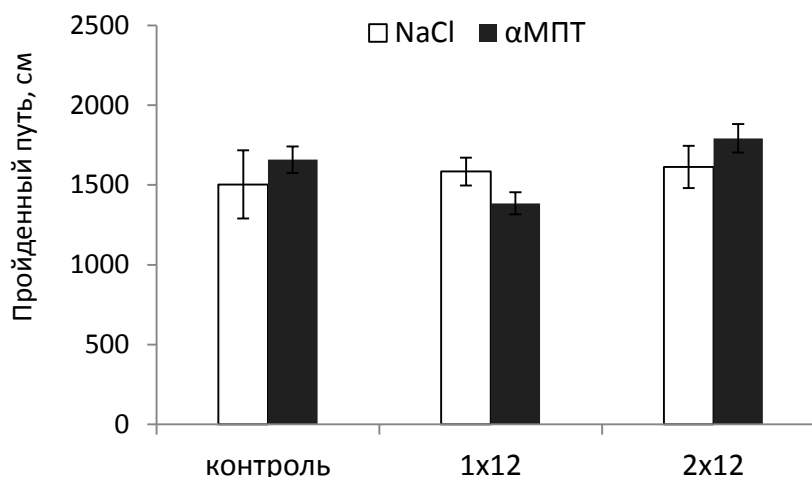


Рис. 1. Двигательная активность мышей, оцениваемая в тесте «Открытое поле» по пройденному пути в контроле и на моделях ранней (1x12) и продвинутой (2x12) доклинической стадий болезни Паркинсона через 7 суток после однократного подкожного введения α МПП в дозе 50 мг/кг или физраствора (NaCl). Здесь и далее данные представлены в виде среднего \pm стандартная ошибка среднего.

Ни у контрольных животных, ни на моделях ранней и продвинутой досимптомной стадий БП α МППТ не вызвал изменений моторного поведения через 7 суток после введения по сравнению с животными, получавшими NaCl вместо α МППТ (Рис. 1).

Также не было обнаружено влияние α МППТ на уровень ДА и его метаболита, диоксифенилуксусной кислоты (ДОФУК), в стриатуме (Рис. 2А, Б)

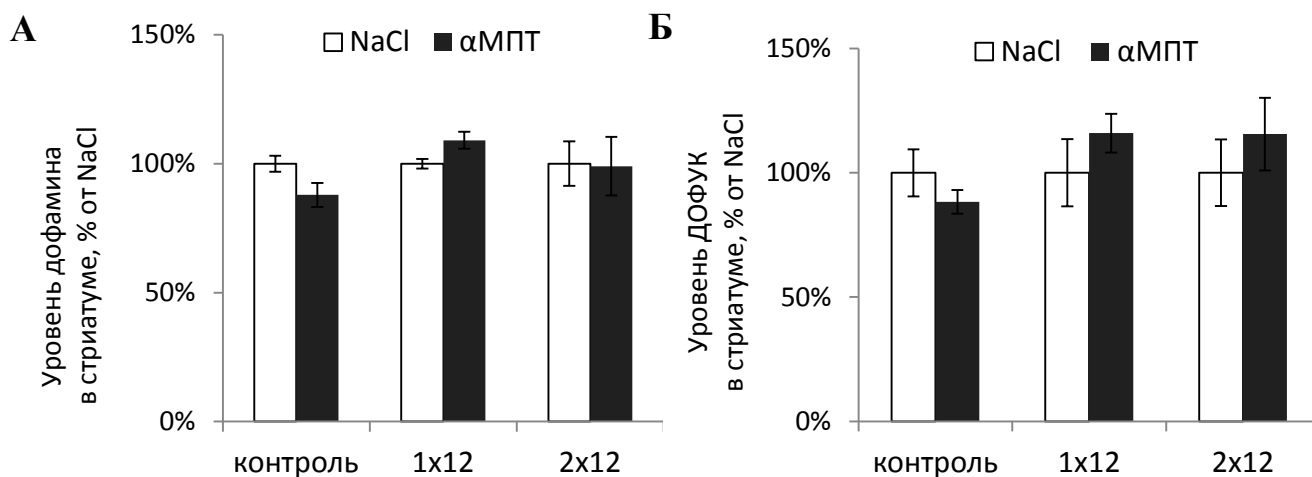


Рис. 2. Концентрация дофамина (А) и его метаболита – диоксифенилуксусной кислоты (ДОФУК) (Б) в стриатуме в контроле и на моделях ранней (1x12) и продвинутой (2x12) доклинической стадий болезни Паркинсона через 7 суток после однократного подкожного введения α МППТ в дозе 50 мг/кг или физраствора (NaCl). Значения в группах, получавших NaCl вместо α МППТ приняты за 100%.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что α МППТ в дозе 50 мг/кг, не имеет отдаленных негативных последствий на функциональную активность сохранившихся nigrostriatalных ДА-ергических нейронов.

Для решения второй задачи проводилась оценка влияния α МППТ в дозе 50 мг/кг через 7 дней после введения на уровень серотонина и его метаболитов в стриатуме, характеризующий состояние серотонинергической системы мозга, а также на уровень катехоламинов и серотонина в надпочечниках и желудочках сердца, в контроле и на экспериментальных моделях ранней и продвинутой досимптомной стадий БП у мышей.

Концентрацию серотонина, катехоламинов и метаболитов оценивали с помощью высокоэффективной хроматографии с электрохимической детекцией.

Согласно полученным данным, α МППТ в дозе 50 мг/кг через 7 дней после введения не вызывает изменений в уровне серотонина и его метаболита – 5-гидроксииндолуксусной кислоты (5-ГИУК) в стриатуме контрольных животных и животных с экспериментальными моделями БП (Рис. 3А, Б).

Это свидетельствует о том, что кратковременное использование α МППТ не приводит к развитию хронических патологических процессов в серотонинергической системе мозга.

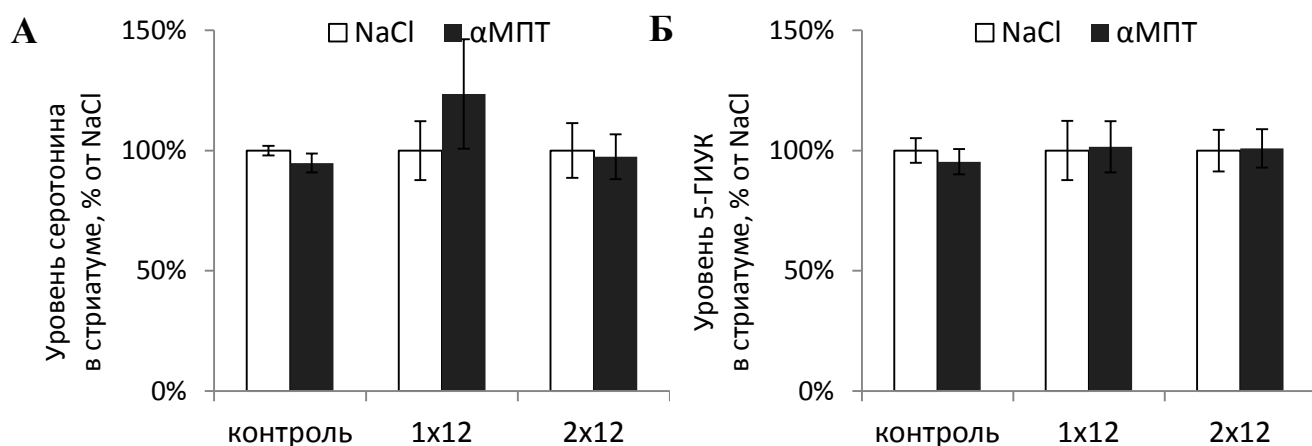


Рис. 3. Концентрация серотонина (А) и его метаболита – 5-гидроксииндолуксусной кислоты (5-ГИУК) (Б) в стриатуме в контроле и на моделях ранней (1x12) и продвинутой (2x12) доклинической стадий болезни Паркинсона через 7 суток после однократного подкожного введения α МППТ в дозе 50 мг/кг или физраствора (NaCl). Значения в группах, получавших NaCl вместо α МППТ приняты за 100%.

Также не было обнаружено влияние α МППТ на уровень катехоламинов в надпочечниках (Рис. 4А, Б) и норадреналина и серотонина в сердце (Рис. 5А, Б), что указывает на то, что α МППТ не приводит к возникновению отдаленных нарушений регуляции и функционирования нейроэндокринной и сердечно-сосудистой висцеральных систем ни у контрольных животных, ни у животных с моделями ранней и продвинутой досимптомной стадий БП.

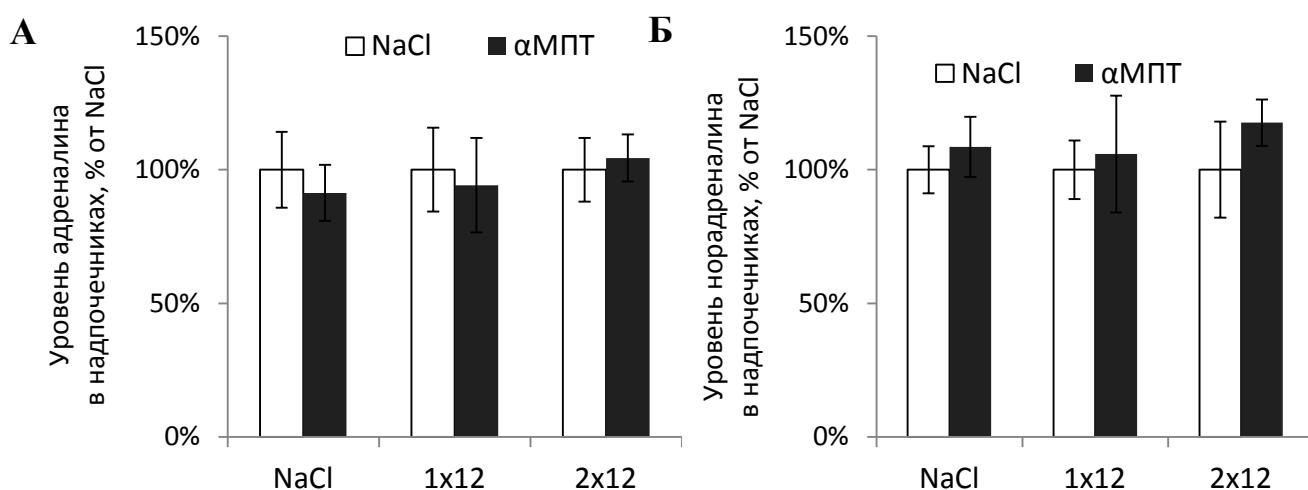


Рис. 4. Концентрация адреналина (А) и норадреналина (Б) в надпочечниках в контроле и на моделях ранней (1x12) и продвинутой (2x12) доклинической стадий болезни Паркинсона через 7 суток после однократного подкожного введения α МППТ в дозе 50 мг/кг или физраствора (NaCl). Значения в группах, получавших NaCl вместо α МППТ приняты за 100%.

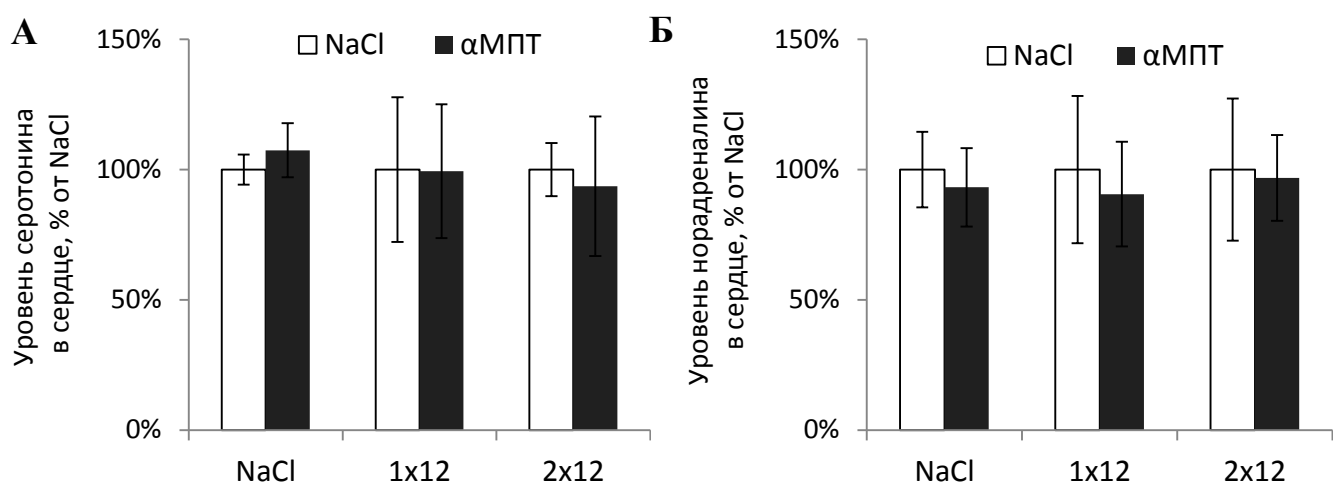


Рис. 5. Концентрация серотонина (А) и норадреналина (Б) в желудочках сердца в контроле и на моделях ранней (1x12) и продвинутой (2x12) доклинической стадий болезни Паркинсона через 7 суток после однократного подкожного введения αМПТ в дозе 50 мг/кг или физраствора (NaCl). Значения в группах, получавших NaCl вместо αМПТ приняты за 100%.

Таким образом, в ходе выполнения проекта в 2016 году были представлены доказательства отсутствия отдаленных негативных последствий временного ингибирования синтеза ДА при введении α-метил-п-тирозина в дозе 50 мг/кг на функциональную активность сохранившихся нигростриатных ДА-ергических нейронов и на регуляцию и функционирование периферических нейроэндокринной и сердечно-сосудистой систем.

Публикации по теме:

Научные публикации в журналах, индексируемых в международной информационно-аналитической системе научного цитирования **Web of Science**

1. **Khakimova G., Kozina E., Kucheryanu V., Ugrumov M.** Reversible pharmacological induction of motor symptoms in MPTP-treated mice at the presymptomatic stage of parkinsonism: potential use for early diagnosis of Parkinson's disease // *Molecular Neurobiology*. 2016. **DOI:** 10.1007/s12035-016-9936-9.

Запланированный в ГЗ на 2016 год показатель, характеризующий объем работ, выполнен

Принята к печати

Kozina EA, Kim AR, Kurina AY, Ugrumov MV. Cooperative synthesis of dopamine by non-dopaminergic neurons as a compensatory mechanism in the striatum of mice with MPTP-induced parkinsonism // *Neurobiology of Disease*.

Отчет по Программе Президиума РАН утвержден решением Ученого совета ИБР РАН «27»
декабря 2016 г., протокол № 14