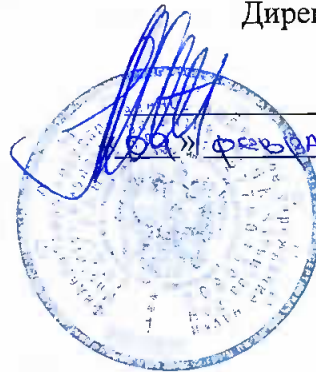


ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО НАУЧНЫХ ОРГАНИЗАЦИЙ
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
ИНСТИТУТ БИОЛОГИИ РАЗВИТИЯ ИМ. Н.К. КОЛЬЦОВА РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ
НАУК (ИБР РАН)

№ госрегистрации 114120370038
УДК 616.858
Инв. № 408-2016/2

УТВЕРЖДАЮ
Директор ИБР РАН
чл.-корр. РАН
А.В. Васильев
«09» февраля 2017 г.



ОТЧЕТ
О ПРИКЛАДНЫХ НАУЧНЫХ ИССЛЕДОВАНИЯХ

«Экспериментальное моделирование и разработка ранней диагностики болезни Паркинсона»

по теме:
ОБОЩЕНИЕ И ОЦЕНКА РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЙ


(заключительный)

Этапы 5

ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2014 - 2020 годы»

Соглашение о предоставлении субсидии № 14.604.21.0073 от 27 июня 2014 г.

Руководитель работ
зав. лабораторией,
д.б.н., академик РАН


М.В. Угрюмов
подпись, дата
09-02-2017

Москва 2017

СПИСОК ИСПОЛНИТЕЛЕЙ

Руководитель проекта		
зав. лаб., академик, д.б.н.	 (подпись, дата) 10.01.2017	Угрюмов М.В. (общее руководство, Введение)
Исполнители проекта:		
в.н.с., к.б.н.	 (подпись, дата) 10.01.2017	Сапронова А.Я. (раздел 4, Приложение А)
с.н.с., д.б.н.	 (подпись, дата) 10.01.17	Иванов Д.Е. (раздел 2, Приложение Б)
с.н.с., к.б.н.	 (подпись, дата) 10.01.2017	Волина Е.В. (раздел 6, нормоконтролер)
с.н.с., к.б.н.	 (подпись, дата) 10.01.2017	Пронина Т.С. (раздел 3, Приложение В)
н.с., к.б.н.	 (подпись, дата) 10.01.2017	Бондаренко Н.С. (раздел 1)
м.н.с., к.б.н.	 (подпись, дата) 10.01.2017	Дильмухаметова Л.К. (раздел 2)
м.н.с., к.б.н.	 (подпись, дата) 10.01.17	Колачева А.А. (раздел 4 и 6)
м.н.с.	 (подпись, дата) 10.01.17	Курина А.Ю. (раздел 5)
м.н.с.	 (подпись, дата) 10.01.17	Мингазов Э.Р. (раздел 1)
м.н.с.	 (подпись, дата) 10.01.2017	Ким А.Р. (раздел 5)
аспирант, м.н.с.	 (подпись, дата) 10.01.17	Сафандеев В.В. (раздел 3)
аспирант, м.н.с.	 (подпись, дата) 10.01.17	Муртазина А.Р. (раздел 3)
аспирант	 (подпись, дата) 10.01.17	Чибирева М.Д. (разделы список литературы, обозначения и сокращения)

Индустриальный партнер:	
Общество с ограниченной ответственностью «Центр ранней диагностики нейродегенеративных заболеваний (НДЗ)» (ООО «Центр ранней диагностики НДЗ»)	
Руководитель работ	
д.б.н., профессор	Нигматуллина Р.Р.
Исполнитель работ	Кузьмина О.И.
Инвестор: Общество с ограниченной ответственностью "Неоген"	

РЕФЕРАТ

Отчет 58 с., 1 ч., 5 рис., 0 табл., 24 источника, 3 прил.

МОЗГ, ДОФАМИНЕРГИЧЕСКАЯ СИСТЕМА, НЕЙРОДЕГЕНЕРАТИВНЫЕ ЗАБОЛЕВАНИЯ, БОЛЕЗНЬ ПАРКИНСОНА, МОДЕЛИРОВАНИЕ, БИОМАРКЕРЫ, РАННЯЯ ДИАГНОСТИКА, ПРОВОКАЦИОННЫЙ ТЕСТ.

Объектом исследования являются экспериментальные модели болезни Паркинсона и методы ранней диагностики заболевания.

Цель работы – создание хронических моделей доклинической и ранней клинической стадий болезни Паркинсона и разработка на моделях методов комплексной ранней (доклинической) диагностики заболевания.

В процессе работы проводились:

Оценка кинетики действия и побочных эффектов α -МППТ при использовании фармакологического провокационного теста на хронической модели доклинической стадии болезни Паркинсона у мышей:

а) оценка количества дофаминергических нейронов в черной субстанции и терминалей аксонов в стриатуме на отдаленных сроках после введения α -МППТ;

б) оценка содержания тирозингидроксилазы в телах нейронов в черной субстанции и терминалях аксонов в стриатуме на отдаленных сроках после введения α -МППТ.

Оценка и обобщение полученных результатов по разработке хронических экспериментальных моделей болезни Паркинсона, их характеристики, использования для поиска биомаркеров в плазме крови и разработки фармакологического провокационного теста для выявления скрытой функциональной недостаточности нигростриатной дофаминергической системы.

Разработка научно-технических рекомендаций по использованию результатов ПНИ: биомаркеры крови и фармакологический провокационный тест для дальнейшей разработки комплексной диагностики болезни Паркинсона на доклинической стадии у больных и внедрения в реальный сектор экономики – фармацевтическую индустрию и здравоохранение (неврология).

Проведение работ по достижению показателей результативности проекта.

Завершена обработка экспериментальных материалов по кинетике действия и побочных эффектов α -МППТ при использовании фармакологического провокационного теста: оценка количественных или качественных изменений состава плазмы крови на отдаленных сроках после введения α -МППТ при разработке фармакологического провокационного теста (работы, выполненные за счет внебюджетных средств).

Проведены работы по обобщению и оценке полученных клинических результатов (работы, выполненные за счет внебюджетных средств).

Степень внедрения – выполнены работы по популяризации как среди ученых (участие в научных конференциях), так и у широкой общественности (выступления на телевидении). Разработка и апробация фармакологического провокационного теста для выявления скрытой функциональной недостаточности nigростриатной дофаминергической системы на модели доклинической стадии болезни Паркинсона позволит предложить инновационный, не имеющих аналогов, способ ранней диагностики заболевания на доклинической стадии, что при наличии нейропротекторной терапии позволит замедлить или даже остановить развитие болезни Паркинсона.

Рекомендации по внедрению – дальнейшие маркетинговые работы по продвижению результата ПНИ:

- участие в инновационных ярмарках, выставках;
- участие в конференциях, симпозиумах;
- научные публикации в отечественных и международных журналах;
- пропаганда в СМИ и в профильных журналах.

Область применения – разработанный фармакологический провокационный тест для выявления скрытой функциональной недостаточности nigростриатной дофаминергической системы на доклинической стадии болезни Паркинсона может быть использован:

- в неврологии для разработки комплексной диагностики болезни Паркинсона на доклинической стадии;
- как новый подход в фундаментальных исследованиях комплексной оценки процессов пластичности мозга.

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	8
1. Оценка кинетики действия и побочных эффектов α -МПП при использовании фармакологического провокационного теста на хронической модели доклинической стадии болезни Паркинсона у мышей.....	13
1.1 Оценка количества дофаминергических нейронов в черной субстанции и терминалей аксонов в стриатуме на отдаленных сроках после введения α -МПП	13
1.2 Оценка содержания тирозингидроксилазы в телах нейронов в черной субстанции и терминалях аксонов в стриатуме на отдаленных сроках после введения α -МПП	16
2. Окончание обработки экспериментальных материалов по кинетике действия и побочных эффектов α -МПП при использовании фармакологического провокационного теста: оценка количественных или качественных изменений состава плазмы крови на отдаленных сроках после введения α -МПП при разработке фармакологического провокационного теста	18
3. Оценка и обобщение полученных результатов по разработке хронических экспериментальных моделей болезни Паркинсона, их характеристики, использования для поиска биомаркеров в плазме крови и разработки фармакологического провокационного теста для выявления скрытой функциональной недостаточности нигростриатной дофаминергической системы	20
4. Разработка научно-технических рекомендаций по использованию результатов ПНИ: биомаркеры крови и фармакологический провокационный тест для дальнейшей разработки комплексной диагностики болезни Паркинсона на доклинической стадии у больных и внедрения в реальный сектор экономики – фармацевтическую индустрию и здравоохранение (неврология).....	27
5. Разработка проекта медицинской технологии «Фармакологический провокационный тест для выявления скрытой функциональной недостаточности дофаминергической нигростриатной системы – болезни Паркинсона на доклинической стадии.....	29
6. Обобщение и оценка полученных клинических результатов	30
7. Проведение работ по достижению показателей результативности проекта	35
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	36
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ	38
ПРИЛОЖЕНИЕ А	40
ПРИЛОЖЕНИЕ Б	47
ПРИЛОЖЕНИЕ В.....	51

ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ

В настоящем отчете о ПНИ применяются следующие термины с соответствующими обозначениями и сокращениями.

α -МПТ –	α -метил-пара-тирозин
3-МТ –	3-метокситирамин
ГВК –	гомованилиновая кислота
ГНФ –	глиальный нейротрофический фактор
L-ДОФА –	L-диоксифенилаланин
ДОФУК –	диоксифенилуксусная кислота
МФТП –	1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридин
МФП+ –	1-метил-4-фенилпиридиний
НФМ –	нейротрофический фактор мозга
ЭЭГ –	электроэнцефалография
ЭМГ –	электромиография

ВВЕДЕНИЕ

Болезнь Паркинсона относится к группе хронических неизлечимых социально значимых нейродегенеративных заболеваний, в которую также входят болезнь Альцгеймера, хорea Гентингтона, гиперпролактинемия и ряд других неврологических и психических патологий. Со временем число больных, страдающих нейродегенеративными заболеваниями и болезни Паркинсона в частности, быстро увеличивается, что, как считается, обусловлено увеличением продолжительности жизни населения в развитых странах, повышением загрязнения окружающей среды и, по непонятным причинам, «омоложением» заболеваний [1]. Так, если в настоящее время болезнью Паркинсона в мире страдают 16 млн. человек, причем 5 млн. из них приходится на Европейские страны и Россию, то к 2040 году, по данным Всемирной Организации Здравоохранения, число больных удвоится (<http://www.who.int>). В России доля больных, страдающих болезнью Паркинсона, достигает 200 человек на 100 тысяч населения [2].

При болезни Паркинсона нарушается двигательная функция, в первую очередь произвольные движения конечностей, за счет проявления непроизвольных движений - тремора (дрожания) и/или ригидности (скованности). Лечение и реабилитация больных ложатся тяжелым морально-психологическим и финансовым бременем не только на самих больных, но и на их ближайшее окружение и общество в целом. Так, в США только прямые затраты на лечение и реабилитацию больных, страдающих от болезни Паркинсона, достигают 25 тыс. долларов в год на одного больного, а ежегодные затраты на всех больных превышают 60 млрд. долларов [3]. Несмотря на огромные инвестиции в лечение и реабилитацию больных, болезнь Паркинсона, как и другие нейродегенеративные заболевания, остаются неизлечимыми.

Залогом успеха лечения любого заболевания является понимание причин, которые приводят к его возникновению, а также клеточных и молекулярных механизмов патологических и компенсаторных процессов, обуславливающих развитие заболевания (патогенез). Только на основе этих фундаментальных знаний, полученных при исследовании больных и, в еще большей степени, экспериментальных моделей, могут быть разработаны эффективные технологии диагностики и лечения. Что касается болезни Паркинсона, то в основе ее патогенеза лежит дегенерация дофаминергических нейронов, тела которых расположены в черной субстанции, а аксоны проецируются в стриатум [4]. Характерными особенностями патогенеза болезни Паркинсона являются: (1) развитие заболевания в течение многих лет или даже десятков лет бессимптомно, т.е. без проявления нарушений

двигательной функции, благодаря включению компенсаторных процессов; (2) гибель дофаминергических нейронов nigrostriатной системы мозга и возникновение при этом дефицита дофамина (ДА), приводящего к нарушению двигательной функции; (3) появление первых симптомов нарушения двигательной (моторной) функции только после гибели большей части nigrostriатных дофаминергических нейронов и истощения компенсаторных резервов мозга; (4) системный характер заболевания, т.е. распространение нейродегенеративного процесса на многие отделы мозга и периферическую нервную систему, что сопровождается нарушением функций внутренних органов и появлением соответствующей периферической симптоматики [5, 6, 7, 8, 9]. Важно отметить, что нарушения двигательной функции у человека наступают при строго определенном – пороговом уровне дегенерации nigrostriатных дофаминергических нейронов – потере более 50% тел нейронов в черной субстанции и 70-80% аксонов и содержащегося в них ДА в стриатуме.

Из выше изложенного следует, что болезнь Паркинсона диагностируется только через много лет после начала патологического процесса – после гибели большей части nigrostriатных дофаминергических нейронов и истощения компенсаторных резервов мозга, т.е. на фоне почти полного отсутствия мишеней к фармакотерапии. Этим и объясняют низкую эффективность существующего лечения. Поэтому в последние годы внимание ученых и клиницистов как в России, так и в других развитых странах сосредоточено на разработке диагностики болезни Паркинсона и других нейродегенеративных заболеваний задолго до появления первых характерных симптомов - на так называемой доклинической или асимптомной стадии. Успешная разработка доклинической диагностики болезни Паркинсона, как и других нейродегенеративных заболеваний, позволит начать лечение больных с помощью нейропротекторов на ранней стадии заболевания, что должно привести либо к остановке гибели специфических нейронов и к излечиванию больных, либо к замедлению процесса гибели нейронов и продлению доклинической (бессимптомной) стадии до конца жизни больного.

Согласно общепринятой методологии, существуют два подхода к разработке технологии диагностики всех хронических заболеваний на доклинической стадии - поиск биомаркеров с помощью неинвазивных или малоинвазивных методов, например в гуморальных средах [8, 10, 11], или использование провокационных или нагрузочных тестов, выявляющих скрытую функциональную недостаточность того или иного органа или системы органов [12, 13, 14].

Существуют пока единичные зарубежные работы, выполненные на единичных больных, показывающие, что болезнь Паркинсона можно диагностировать на доклинической стадии с помощью неинвазивного нейровизуализационного метода – позитронно-эмиссионной

томографии, например, по снижению скорости синтеза ДА в стриатуме [15]. Однако этот метод обследования невозможно использовать для массовой диспансеризации здорового населения даже в наиболее развитых странах из-за его сложности и высокой стоимости.

Идея поиска легко доступных для анализа периферических биомаркеров развития болезни Паркинсона и большинства других нейродегенеративных заболеваний на доклинической стадии и их использования для создания доклинической диагностики основана на знаниях о системном характере этих заболеваний [16, 17, 18, 19]. Действительно, при болезни Паркинсона, помимо дофаминергических нейронов нигростриатной системы мозга, погибают нейроны и в других отделах мозга, а также за пределами мозга – в периферической нервной системе, что сопровождается нарушением немоторных функций. Более того, считается, что нарушение немоторных функций мозга, а также функций периферической нервной системы и внутренних органов, предшествуют пороговой деградации нигростриатной дофаминергической нервной системы, при которой возникают нарушения двигательной функции. Более того, считается, что нарушение немоторных функций отражается в виде изменения состава ликвора и плазмы крови, а также экспрессии генов и фенотипа клеток крови [8, 20].

Исходя из выше изложенных предпосылок, в России и в ряде развитых стран разрабатывается доклиническая диагностика болезни Паркинсона, преимущественно на основе идентификации клинических предвестников и периферических биомаркеров, главным образом в виде изменений состава ликвора и плазмы крови, а также в виде изменений экспрессии генов и фенотипа клеток крови. Полученные к настоящему моменту данные свидетельствуют о том, что периферические биомаркеры являются не абсолютно специфичными, а относительно специфичными для болезни Паркинсона, т.е. они могут проявляться не только при данном заболевании, но и при некоторых других заболеваниях. Это означает, что достоверность диагноза болезни Паркинсона на доклинической стадии должна быть тем выше, чем больше биомаркеров будет использовано. Другими словами, только при обнаружении у человека, проходящего диспансеризацию, совокупности биомаркеров доклинической стадии болезни Паркинсона, его можно включить в группу риска, а затем, при необходимости, поставить окончательный диагноз с помощью позитронно-эмиссионной томографии.

Поиск биомаркеров осуществляют сразу же после появления моторных симптомов и до начала лечения. При этом авторы работ «по умолчанию» исходят из предположения о том, что, по крайней мере, часть биомаркеров, выявленных на ранней клинической стадии, также присуща и больным на доклинической стадии. Однако пока подтвердить это предположение не удалось. Именно поэтому особое значение приобретают работы по поиску биомаркеров на

экспериментальных моделях доклинической стадии болезни Паркинсона. Клинические исследования по поиску биомаркеров болезни Паркинсона в соответствии с описанной методологией проводятся Индустриальным партнером данного проекта ООО «Центр ранней диагностики нейродегенеративных заболеваний (НДЗ)». К недостаткам и трудностям использования описанного клинического подхода относятся: (а) отсутствие специфичных маркеров, а поэтому необходимость использования многочисленных, лишь относительно специфичных маркеров, (б) невозможность поиска маркеров у больных на доклинической стадии, а поэтому поиск их у больных на ранней клинической стадии – до начала лечения, (в) трудности в подборе нелеченых больных на ранней клинической стадии, (г) трудности в подборе людей для контрольной группы, которые по существующим требованиям в пожилом возрасте не страдали бы от неврологической и нейроэндокринной патологии, (д) этические ограничения на пути получения ликвора у людей при отсутствии прямых клинических показаний, (д) высокая затратность проводимых исследований. Несмотря на проведение работ по поиску биомаркеров болезни Паркинсона на доклинической стадии и ранней клинической стадии и уже имеющиеся определенные успехи в этом направлении, до сих пор отсутствует апробированная технология доклинической диагностики болезни Паркинсона, прошедшая клинические испытания и рекомендованная для широкого использования в клинике.

В рамках данного проекта описанная выше методология была расширена: впервые была поставлена задача поиска периферических биомаркеров на экспериментальной хронической модели доклинической стадии болезни Паркинсона. Эта модель была разработана в рамках проекта, причем она отвечает четырем важнейшим требованиям: (1) допороговому уровню деградации nigrostriатной дофаминергической системы, т.е. потере менее 50% тел нейронов в черной субстанции и менее 70% аксонов и ДА в стриатуме; (2) отсутствию нарушений моторного поведения; (3) системному характеру нейродегенерации, в первую очередь норадренергических нейронов; (4) длительному периоду постепенной дегенерации нейронов. Помимо моделирования доклинической стадии болезни Паркинсона в рамках данного проекта была создана модель ранней клинической стадии, что позволило оценить, в какой степени перекрываются спектры биомаркеров на обеих стадиях. Более того, эти данные могут быть косвенным показателем корректности методологии, допускающей, что биомаркеры, обнаруженные у больных на ранней клинической стадии болезни Паркинсона, присущи и больным на доклинической стадии.

Если поиск периферических биомаркеров на ранней клинической стадии болезни Паркинсона у больных осуществляется в России и в мире широким фронтом, то, в отличие от большинства областей медицины – эндокринологии, пульмонологии, кардиологии и др.

[12, 13, 14], в неврологии и психиатрии до сих пор вообще не используются фармакологические провокационные или нагрузочные тесты для диагностики заболеваний мозга на доклинической стадии, включая болезнь Паркинсона. Поэтому в рамках данного этапа предполагается разработать на экспериментальной модели доклинической стадии болезни Паркинсона принципиально новый для неврологии подход к диагностике заболевания на доклинической стадии – с помощью фармакологического провокационного теста. Этот тест позволит на модели доклинической стадии болезни Паркинсона на короткое время усилить функциональную недостаточность nigростриатной дофаминергической системы с помощью фармакологических антагонистов дофамина обратимого действия до порогового уровня, что должно будет проявиться в виде кратковременного нарушения моторного поведения у животных. Сочетание двух подходов – поиска периферических биомаркеров и использование провокационного теста, должно привести к качественному повышению достоверности диагностики болезни Паркинсона на доклинической стадии. Не исключено, что в этом случае можно будет отказаться от дополнительного использования позитронно-эмиссионной томографии (ПЭТ), что сделает диагностику доступной для диспансеризации здорового населения на уровне районных больниц.

В рамках выполнения проекта по Соглашению о предоставлении субсидии от 27 июня 2014 г. № 14.604.21.0073 были подготовлены следующие промежуточные отчеты:

1. «Выбор направления исследований и моделирование хронической доклинической стадии болезни Паркинсона» 408-2014/1;
2. «Моделирование ранней клинической стадии болезни Паркинсона и анализ, созданных экспериментальных моделей болезни Паркинсона» 408-2015/1;
3. «Поиск биомаркеров в плазме крови на экспериментальных моделях болезни Паркинсона и у нелеченых больных» 408-2015/2;
4. «Разработка фармакологического провокационного теста на экспериментальной модели доклинической стадии болезни Паркинсона и поиск биомаркеров в плазме крови у нелеченых больных» 408-2016/1.

1. Оценка кинетики действия и побочных эффектов α -МПП при использовании фармакологического провокационного теста на хронической модели доклинической стадии болезни Паркинсона у мышей

1.1 Оценка количества дофаминергических нейронов в черной субстанции и терминалей аксонов в стриатуме на отдаленных сроках после введения α -МПП

Перед началом эксперимента по оценке кинетики действия и побочных эффектов α -МПП у мышей линии C57BL/6 (в возрасте 2-2,5 месяца) проводили регистрацию двигательной активности в тесте «открытое поле» (n=40). На основе полученных результатов были сформированы две группы животных с равнозначными средними значениями. Для воспроизведения хронической модели доклинической стадии одной группе мышей подкожно вводили МФТП в течение 5 недель (n=20), контрольная группа получала 0.9% NaCl по аналогичной схеме (n=20). На шестую неделю после начала эксперимента (через неделю после последней инъекции МФТП) проводили повторную регистрацию двигательной активности животных. После прокола МФТП или 0.9% NaCl значения пройденного пути (показатель двигательной активности) составляли: 1914.5 ± 190 и 1316 ± 126 соответственно.

Аналогично разработке фармакологического провокационного теста на хронической модели доклинической стадии болезни Паркинсона для оценки кинетики действия и побочных эффектов α -МПП каждая их групп (контрольная и опытная) были рассажены на две подгруппы с одинаковыми между собой значениями пройденного пути (в каждой подгруппе n=10):

- 1) 0.9% NaCl¹;
- 2) 0.9% NaCl²;
- 3) МФТП¹;
- 4) МФТП².

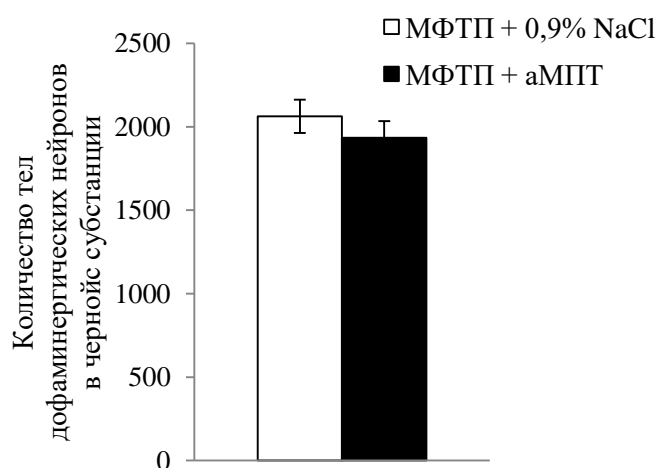
На следующий день животным из каждой группы вкололи 0,9% NaCl или α -МПП:

- 1) 0.9% NaCl¹ → 0.9% NaCl;
- 2) 0.9% NaCl² → α -МПП;
- 3) МФТП¹ → 0.9% NaCl;
- 4) МФТП² → α -МПП.

Повторная оценка двигательной активности (по оценке пройденного пути) была проведена через 7 дней после введения 0.9% NaCl или α -МПП с дальнейшим сбором материала и анализом, что позволило оценить кинетику действия и возможные побочные

эффекты ингибитора синтеза дофамина на количество дофаминергических нейронов nigrostriatной системы. Подсчет количества тел дофаминергических нейронов в черной субстанции и их отростков в стриатуме проводили после их выявления методом иммуногистохимии на тирозингидроксилазу (см. Приложение А). Полученные данные обрабатывали статистически с помощью теста Стьюдента.

При разработке хронической модели доклинической стадии болезни Паркинсона на мышах с помощью МФТП не было показано изменений в количестве тел дофаминергических нейронов в nigrostriatной системе по сравнению с контрольной группой. Учитывая это, исследование отдаленных эффектов α -МПТ на количество тел дофаминергических нейронов было проведено только на хронической модели доклинической стадии болезни Паркинсона (мыши получали МФТП в течение 5 недель), т.е. без использования контрольной группы (получавшей на протяжении 5 недель 0.9% NaCl). Было показано, что количество тел дофаминергических нейронов не изменялось через 7 дней после введения α -МПТ (2063 ± 36) по сравнению с группой, которая получала 0.9% NaCl (1934 ± 32 ; $p = 0.35$) (рис. 1).



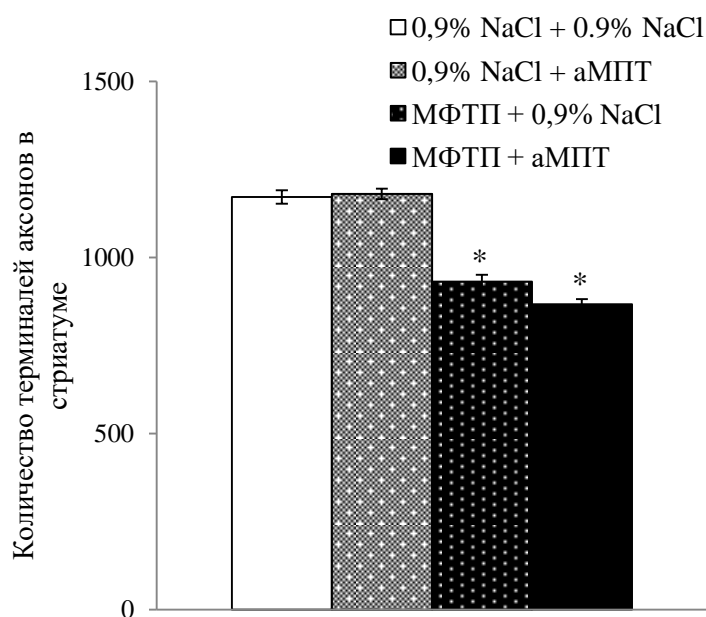
α МПТ – альфа-метил-пара-тирозин, МФТП – 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридин
($n = 5$ в каждой группе).

Рисунок 1 – Количество тел дофаминергических нейронов в черной субстанции через 7 дней после введения α -МПТ на хронической модели доклинической стадии болезни Паркинсона

В последние десятилетия общепринято, что гибель нейронов при развитии нейродегенеративных заболеваний начинается с терминалей аксонов и ретроградно распространяется к телам нейронов. Учитывая более высокую восприимчивость к токсическим факторам, в том числе и к действию МФТП, с помощью которого были разработаны хронические модели болезни Паркинсона, для исследования отдаленных

эффектов α -МПТ выбрали все 4 группы ($n = 5$ для каждой группы), использованные для создания фармакологического провокационного теста, а именно: 0.9% NaCl¹ и 0.9% NaCl (контрольная группа); 0.9% NaCl² \rightarrow α -МПТ; МФТП¹ \rightarrow 0.9% NaCl; МФТП² \rightarrow α -МПТ. Подсчет количества терминалей аксонов проводился в 4 областях с каждого среза (20 срезов с одного животного) дорсального стриатума с дальнейшим усреднением. Согласно полученным данным, их количество снижалось в группе МФТП¹ (МФТП¹ \rightarrow 0.9% NaCl) при сравнении с контрольной группой, что свидетельствует о воспроизведении хронической модели доклинической стадии болезни Паркинсона. Так, в контроле количество терминалей аксонов в дорсальном стриатуме составляло 1172 ± 19 , а в группе, получавшей МФТП с дальнейшим 0.9% NaCl – 932 ± 19 ($p = 0.01$).

Количество терминалей аксонов не изменялось через 7 дней после введения α -МПТ ни в контрольной группе 0.9% NaCl² \rightarrow α -МПТ (1180 ± 15 , $p = 0.72$ при сравнении с группой контроля 0.9% NaCl¹ и 0.9% NaCl), ни в опытной группе МФТП² \rightarrow α -МПТ (867 ± 15 , $p = 0.01$ при сравнении с группой контроля 0.9% NaCl¹ и 0.9% NaCl и $p = 0.06$ при сравнении с группой получавшей МФТП (МФТП¹ \rightarrow 0.9% NaCl))(рис. 2).



α МПТ – альфа-метил-пара-тирозин, МФТП – 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридин.

* $p < 0,05$ по сравнению с контрольной группой (0,9% NaCl + 0,9% NaCl). ($n = 5$ в каждой группе).

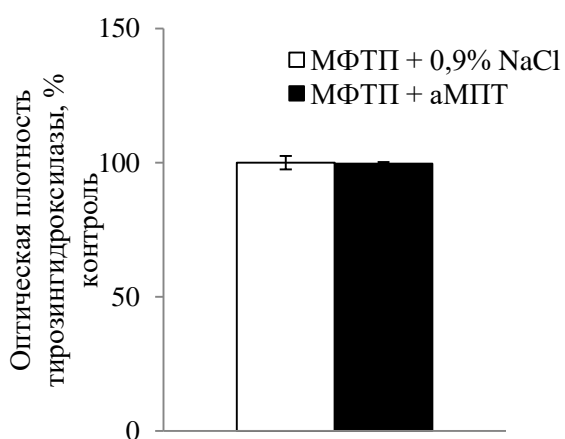
Рисунок 2 – Количество терминалей дофаминергических аксонов в стриатуме через 7 дней после введения α -МПТ на хронической модели доклинической стадии болезни Паркинсона

Таким образом, было показано отсутствие отдаленных эффектов α -МПП на морфологическое состояние дофаминергических нейронов, как на уровне тел нейронов, так и на уровне терминалей аксонов nigростриатной системы на хронической модели доклинической стадии болезни Паркинсона.

1.2 Оценка содержания тирозингидроксилазы в телах нейронов в черной субстанции и терминалях аксонов в стриатуме на отдаленных сроках после введения α -МПП

Содержание тирозингидроксилазы в телах дофаминергических нейронах было определено методом денситометрии. Учитывая, что определение оптической плотности является полуколичественным методом, то результаты представлены в процентах от контроля ($0.9\% \text{ NaCl}^1 \rightarrow 0.9\% \text{ NaCl}$). Было проанализировано 7 срезов от каждого животного (каждый десятый срез черной субстанции). На каждом срезе были обведены области цитоплазмы без ядра каждого иммунореактивного дофаминергического нейрона и определена оптическая плотность, коррелирующая с внутриклеточным содержанием тирозингидроксилазы. Было проанализировано 5 пар ($n = 5$ для каждой группы), для определения наличия статистически значимых различий между группами был использован тест Стьюдента.

Внутриклеточное содержание тирозингидроксилазы в телах нейронов было на уровне контроля через 7 дней после введения α -МПП на хронической модели доклинической стадии болезни Паркинсона ($p = 0.87$) (рис. 3).



α МПП – альфа-метил-пара-тирозин, МФТП – 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридин. ($n = 5$ для каждой группы).

Рисунок 3 – Оптическая плотность тирозингидроксилазы в телах дофаминергических нейронов в черной субстанции через 7 дней после введения α -МПП на хронической модели

доклинической стадии болезни Паркинсона

Содержание тирозингидроксилазы в терминалях дофаминергических аксонов определяли методом денситометрии на каждом срезе стриатума. Было проанализировано 5 пар ($n = 5$ для каждой группы), для определения наличия статистически значимых различий между группами был использован тест Стьюдента.

Согласно полученным данным ее содержание не изменилось через 7 дней после введения α -МППТ по сравнению с контролем на хронической модели доклинической стадии болезни Паркинсона ($p = 0.07$) (рис. 4).

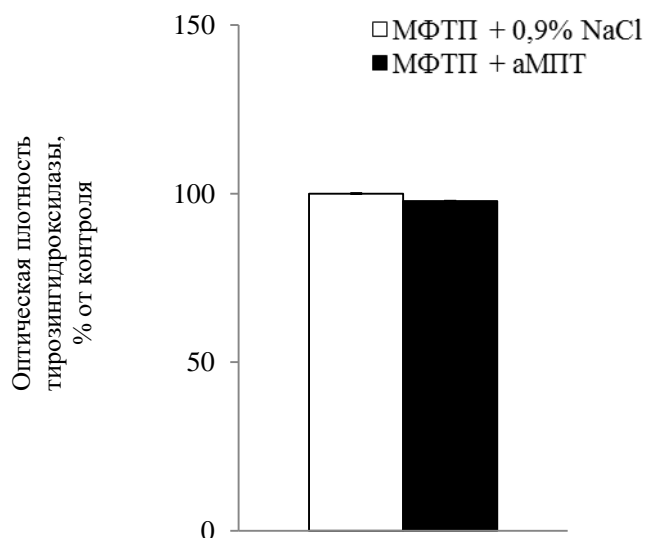
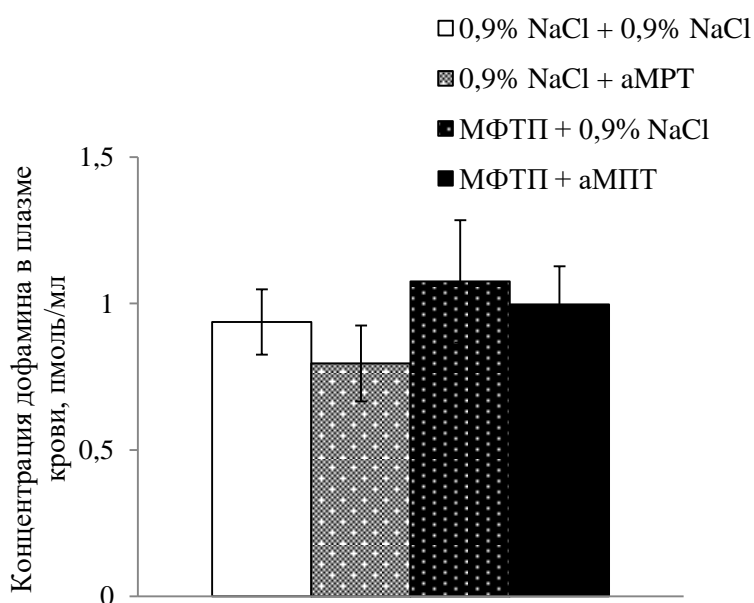


Рисунок 4 – Оптическая плотность тирозингидроксилазы в терминалях дофаминергических аксонов в стриатуме через 7 дней после введения α -МППТ на хронической модели доклинической стадии болезни Паркинсона

Таким образом, показано отсутствие отдаленных эффектов α -МППТ на функциональное состояние nigrostriatalной системы, как на уровне тел дофаминергических нейронов в черной субстанции, так и на уровне терминалей их аксонов в стриатуме.

2. Окончание обработки экспериментальных материалов по кинетике действия и побочных эффектов α -МПП при использовании фармакологического провокационного теста: оценка количественных или качественных изменений состава плазмы крови на отдаленных сроках после введения α -МПП при разработке фармакологического провокационного теста

Концентрацию дофамина в плазме крови определяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с электрохимической детекцией (рис. 5) ($n = 10$ для каждой группы). Для выявления статически значимых различий использовали тест Стьюдента при сравнении с контрольной группой ($0.9\% \text{ NaCl}^1 \rightarrow 0.9\% \text{ NaCl}$). Согласно полученным данным уровень дофамина в плазме крови в контрольной группе составлял 0.94 ± 0.11 пмоль/мл, а на модели доклинической стадии – 1.08 ± 0.21 пмоль/мл ($p=0.57$). Введение α -МПП не привело к изменению концентрации дофамина ни в контрольной группе (0.8 ± 0.13 пмоль/мл ($p=0.45$)), ни в опытной группе (1.0 ± 0.13 пмоль/мл ($p=0.73$)).



α -МПП – альфа-метил-пара-тирозин, МФТП – 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропирдин.

Рисунок 5 – Концентрация дофамина в плазме крови у мышей на досимптомной стадии паркинсонизма через 7 дней после подкожного введения α -МПП в дозе 50 мг/кг; в контроле вводили 0.9% NaCl

Таким образом, был разработан фармакологический провокационный тест для выявления скрытой функциональной недостаточности nigrostriатной дофаминергической системы с помощью обратимого ингибитора синтеза дофамина – α -МПП. Показано

отсутствие системных проявлений и побочных эффектов α -МППТ на морфо-функциональное состояние nigростриатной системы на хронической модели доклинической стадии.

3. Оценка и обобщение полученных результатов по разработке хронических экспериментальных моделей болезни Паркинсона, их характеристики, использования для поиска биомаркеров в плазме крови и разработки фармакологического провокационного теста для выявления скрытой функциональной недостаточности nigrostriатной дофаминергической системы

Хроническая модель доклинической стадии болезни Паркинсона была создана при подкожном введении МФТП в течение 5 недель в дозе 12 мг/кг и охарактеризована по основным параметрам, характеризующим nigrostriатную дофаминергическую систему при развитии болезни Паркинсона. Такими критериями для доклинической стадии являются: допороговый уровень деградации nigrostriатной дофаминергической системы, т.е. потеря менее 70% аксонов и дофамина в стриатуме; отсутствие нарушений моторного поведения; системный характер нейродегенерации; длительный период (не менее 5 недель) постепенной дегенерации нейронов; изменение метаболизма моноаминов в выбранных для анализа центрах мозга и периферических органах не менее чем на 25%; изменение содержания биомаркеров в плазме крови не менее чем на 20%; хорошая воспроизводимость результатов. Согласно полученным данным, количество тел дофаминергических нейронов в черной субстанции не менялось на разработанной модели, при этом количество терминалей их аксонов в стриатуме (место проекций) снизилось на 47%. Уровень дофамина в стриатуме был снижен вдвое по сравнению с контролем, что не сопровождалось нарушениями двигательной функции животных. Оценка механизмов пластичности nigrostriатной системы мозга показала, что на разработанной хронической модели доклинической стадии болезни Паркинсона скорость трансляции скорость-лимитирующего фермента синтеза дофамина – тирозингидроксилазы в телах нейронов возрастает. При этом в терминалях аксонов обнаружено снижение содержания тирозингидроксилазы, что свидетельствует о нарушении anterograde аксонального транспорта в дофаминергических нейронах nigrostriатной системы.

Болезнь Паркинсона является системным заболеванием, которое затрагивает не только nigrostriатную систему, но и другие отделы мозга и даже периферические органы. Более того, патологический процесс в них может начинаться раньше, чем в дофаминергических нейронах, что приводит к снижению обоняния, запорами и прочим неспецифичным симптомам до появления специфичных – нарушению двигательной функции. Была проведена оценка функционального состояния серотонинергических нейронов ядра шва и норадренергических нейронов голубого пятна мозга на разработанной хронической модели

доклинической стадии болезни Паркинсона по уровню моноаминов в стриатуме, куда идут проекции этих систем. Показано, что уровень норадреналина был снижен на 43%, в то время как серотонин сохранялся на уровне контроля.

Учитывая то, что патологический процесс при болезни Паркинсона не ограничивается мозгом, а распространяется и на периферические органы, важным являлось изучение функционального состояния периферических органов, синтезирующих катехоламины. Эти органы могут служить для компенсаторного поддержания физиологически активной концентрации катехоламинов в крови на ранних стадиях заболеваний, что в свою очередь может «скрыть» биомаркеры катехоламиновой природы в плазме крови. Было показано отсутствие изменений в содержании катехоламинов (адреналин, норадреналин и дофамин) в надпочечниках на разработанной модели доклинической стадии болезни Паркинсона. С одной стороны, это свидетельствует об отсутствии нейродегенеративных процессов в хромаффинных клетках мозгового вещества надпочечников, вероятно, из-за отсутствия у них транспортера катехоламинов и следовательно неспособности специфически захватывать МФП+ - нейротоксин-производное МФТП). С другой стороны, контрольный уровень катехоламинов на модели свидетельствует об отсутствии активации компенсаторных процессов, направленных на восстановление адреналина, норадреналина и/или дофамина в плазме крови, что открывает перспективы их использования в качестве биомаркеров на ранней - доклинической стадии, развития заболевания.

Хроническая модель ранней клинической стадии болезни Паркинсона была создана при подкожном введении МФТП в течение 10 недель с дополнительным усилением действия пронеуротоксина. Разработанная модель полностью соответствовала требованиям к моделям ранней клинической стадии болезни Паркинсона: пороговый уровень деградации нигростриатной дофаминергической системы - потеря более 80% аксонов и дофамина в стриатуме и более 50% тел нейронов в черной субстанции; изменение метаболизма моноаминов в выбранных для анализа центрах мозга и периферических органах не менее чем на 25%; изменение содержания биомаркеров в плазме крови не менее чем на 20%; нарушение моторного поведения; системный характер нейродегенерации; длительный период (не менее 8 недель) постепенной дегенерации нейронов и хорошая воспроизводимость результатов.

Согласно полученным результатам морфологического исследования деградация нигростриатной системы на разработанной хронической модели ранней клинической стадии болезни Паркинсона достигала порогового уровня, т.е. количество тел дофаминергических нейронов было снижено вдвое при практически полном отсутствии иннервации стриатума их аксонами. Концентрация дофамина в стриатуме также была на уровне порога – 20%, что и

явилось причиной появления нарушений двигательной функции у мышей после введения МФТП по разработанной схеме. Оценка механизмов пластичности nigrostriатной системы мозга на хронической модели ранней клинической стадии болезни Паркинсона показала аналогичные, но в меньшей степени выраженные, изменения, чем обнаруженные на модели доклинической стадии: уровень трансляции тирозингидроксилазы в телах дофаминергических нейронах растет по сравнению с контролем. Также было показано увеличение уровня мРНК скорость-лимитирующего фермента синтеза дофамина в стриатуме, что свидетельствует об активации компенсаторного механизма – кооперативного синтеза дофамина недофаминергическими нейронами. С учетом отсутствия таких изменений в стриатуме на хронической модели доклинической стадии, вероятно, для активации кооперативного синтеза дофамина «требуется» практически полная деградация терминалей дофаминергических аксонов nigrostriатной системы, что и показано на модели ранней клинической стадии болезни Паркинсона.

Комплексная оценка других моноаминергических систем мозга на хронической модели ранней клинической стадии болезни Паркинсона показала значительные изменения в концентрации норадреналина и серотонина в стриатуме как показателей функциональной активности соответственно норадренергической системы голубого пятна и серотонинергической системы ядра шва. При этом было отмечено снижение уровня серотонина на разработанной модели ранней клинической стадии по сравнению с моделью доклинической стадии, а уровень норадреналина наоборот возрастал, что, возможно, свидетельствует об активации другого механизма нейропластичности мозга – возможной замене дофамина в качестве нейротрансмиттера на норадреналин.

Для проверки предположения о системном характере патологического процесса на хронической модели ранней клинической стадии была проведена оценка концентрации катехоламинов в надпочечниках. Согласно полученным данным уровень норадреналина, адреналина и дофамина имел тенденцию к увеличению, что вероятно, свидетельствуют о развитии компенсаторных механизмов, направленных на восстановление / поддержание физиологически активной концентрации катехоламинов в плазме крови на ранней клинической стадии заболевания.

Для выявления потенциальных биомаркеров в плазме крови на разработанных хронических моделях доклинической и ранней клинической стадиях болезни Паркинсона был проведен анализ содержания катехоламинов (норадреналин, адреналин и дофамин, а также метаболитов дофамина), ростовых факторов (глиальный нейротрофический фактор-ГНФ, и нейротрофический фактор мозга - НФМ), патологических белков (альфа-синуклеина) и гормонов (тестостерон и эстрадиол).

На обеих моделях было показано отсутствие изменений в плазме крови уровне норадреналина, адреналина и дофамина (но тенденция к снижению на модели ранней клинической стадии), в то время как концентрация метаболитов дофамина - L-ДОФА и ДОФУК, были снижены. Следует отметить, что у нелеченых больных на ранней клинической стадии были обнаружены аналогичные изменения уровней L-ДОФА и ДОФУК, что указывает на эти биомаркеры как наиболее подходящие для разработки ранней, доклинической, диагностики заболевания.

Одним из основных признаков патогенеза болезни Паркинсона является агрегация фибрилл альфа-синуклеина с образованием телец Леви. При этом агрегация белка не ограничивается только мозгом, но и распространяется на периферические органы, что позволяет рассматривать увеличение содержания альфа-синуклеина в тканях и биологических жидкостях в качестве потенциального биомаркера нейродегенеративного процесса. Учитывая высокое фенотипическое сходство лимфоцитов крови с дофаминергическими нейронами, можно было ожидать, что в них будут обнаружены изменения в содержании альфа-синуклеина на доклинической стадии, когда nigrostriatalная система только начинает деградировать. Согласно полученным данным, содержание альфа-синуклеина было снижено в лимфоцитах на 42% на хронической модели доклинической стадии болезни Паркинсона и на 67% на хронической модели ранней клинической стадии. Это свидетельствует о том, что по мере прогрессирования заболевания происходит снижение свободной формы белка альфа-синуклеина в лимфоцитах, что может служить не только диагностическим биомаркером доклинической стадии болезни Паркинсона, но и показателем скорости прогрессирования заболевания.

Развитие болезни Паркинсона как и других нейродегенеративных заболеваний, характеризуется снижением нейротрофических факторов в деградируемой nigrostriatalной системе. Учитывая системный характер этого заболевания, снижение уровня нейротрофических факторов также можно было ожидать в плазме крови. Однако показать эти различия на разработанных нами моделях с помощью иммуноферментного анализа не удалось из-за низкой концентрации ГНФ и НФМ – ниже порога чувствительности метода. Поэтому в рамках дальнейшей реализации проекта было определено их содержание в nigrostriatalной системе на хронических моделях доклинической и ранней клинической стадиях болезни Паркинсона. На хронической модели доклинической стадии болезни Паркинсона не было обнаружено изменений концентрации обоих нейротрофических факторов ни на уровне тел нейронов в черной субстанции, ни на уровне их отростков в стриатуме. Однако на модели ранней клинической стадии было обнаружено снижение НФМ в стриатуме на 30%, а ГНФ в черной субстанции на 50%, что, вероятно, связано с

уменьшением числа клеток мишеней – дофаминергических нейронов. Полученные данные свидетельствуют о невозможности использования изменения концентрации нейротрофических факторов в плазме крови в качестве потенциальных биомаркеров заболевания.

В качестве потенциальных биомаркеров болезни Паркинсона также рассматривались половые стероиды тестостерон и эстрадиол. Тестостерон синтезируется у самцов в клетках Лейдига семенников и в коре надпочечников, а эстрадиол у самок в основном в яичниках и в небольшом количестве в коре надпочечников. Также в небольшом количестве эстрадиол синтезируется и у самцов из тестостерона в яичках с помощью фермента – ароматазы. В данной работе концентрация тестостерона не изменялась на обеих хронических моделях доклинической и ранней клинической стадий болезни Паркинсона. В то время как концентрация эстрадиола на модели доклинической стадии была повышена на 70%. На модели ранней клинической стадии была выявлена ранее никем не отмечавшаяся закономерность – разделение самцов мышей в контрольной группе по уровню содержанию тестостерона: животные с низким содержанием ($0,63 \pm 0,09$ нг/мл) и с высоким содержанием ($8,83 \pm 2,86$ нг/мл) тестостерона. Концентрация эстрадиола в опытной группе с высоким уровнем тестостероном не изменялась по сравнению с контролем, а в группах с низким уровнем тестостероном достоверно снижалась на 42%. Из полученных данных следует, что изменение уровня тестостерона в плазме крови не может быть использовано в качестве биомаркера, а для использования эстрадиола с этой целью нужны дополнительные исследования причин разделения с возрастом животных на две группы. Однако использование половых стероидов все же является перспективным для использования в качестве биомаркеров, но требующим дополнительных исследований.

Таким образом, на экспериментальных моделях постадийного развития болезни Паркинсона было обнаружено, что изменения уровня метаболитов дофамина, альфа-синуклеина в свободной форме и гормонов могут служить биомаркерами доклинической стадии болезни Паркинсон. Более того, их сочетание может позволить оценить степень прогрессирования заболевания.

Поиск биомаркеров, характерных и для пациентов на ранней клинической стадии болезни Паркинсона, и для моделей доклинической и ранней клинической стадий является перспективным для разработки доклинической диагностики болезни Паркинсона, однако эта диагностика всегда будет оставаться неспецифичной за счет возможных аналогичных метаболических изменений при других системных заболеваниях. Однако при использовании батареи биомаркеров возможно будет создавать группы риска среди здорового населения (без нарушения двигательной функции) при профилактическом осмотре. Окончательный

диагноз болезни Паркинсона на доклинической стадии может быть поставлен у людей из группы риска с помощью позитронно-эмиссионной томографии – технически сложного и дорогостоящего метода исследования. Поэтому в рамках реализации проекта был впервые экспериментально разработан принципиально новый – специфичный, подход к диагностике болезни Паркинсона на доклинической стадии - фармакологический провокационный тест, который не требует больших финансовых затрат, Следует отметить, что провокационные тесты давно и широко применяются для диагностики хронических заболеваний в латентной фазе таких систем как: сердечно-сосудистая, дыхательная, эндокринная и др., однако никогда не применялись с этой целью в неврологии и психиатрии.

Суть разработанного фармакологического теста заключается во временном усугублении деградации nigrostriatной системы с помощью ингибитора синтеза дофамина в дозе, приводящей к снижению функциональной активности дофаминергических нейронов до порога и появлению нарушений двигательной функции, причем только на модели доклинической стадии болезни Паркинсона, но не в контроле. Используемый ингибитор – альфа-метил-п-тирозин (альфа-МПТ), является обратимым, а восстановление уровня дофамина в стриатуме и нормализация моторного поведения происходит меньше, чем через сутки после его введения.

Для разработки фармакологического провокационного теста использовали охарактеризованную выше хроническую модель доклинической стадии болезни Паркинсона. Согласно данным полученным ранее, на этой модели уровень дофамина не достигает порогового уровня, и нарушения двигательной активности у мышей не наблюдалось. Через 4 часа после введения альфа-МПТ через неделю после последней инъекции МФТП в дозе 50 мг/кг у контрольных животных происходит снижение уровня дофамина на 15%, а у мышей с паркинсонизмом были зафиксированы нарушения двигательной активности, и концентрация дофамина составляла 20% от контроля, т.е. достигала порогового значения. Важно подчеркнуть, что снижение уровня дофамина при разработке фармакологического провокационного теста не связано ни с гибелью дофаминергических нейронов nigrostriatной системы (количество терминалей аксонов в стриатуме и тел нейронов в черной субстанции не меняется), ни с изменением содержания тирозингидроксилазы в дофаминергических нейронах после введения альфа-МПТ по сравнению с контролем.

Единственным, но существенным недостатком использования альфа-МПТ для доклинической диагностики болезни Паркинсона при системном введении является возможное побочное действие на симпатoadреналовую систему, а опосредованно на висцеральные органы. Для того чтобы оценить влияние альфа-МПТ в дозе 50 мг/кг при системном введении на симпатoadреналовую систему был проведен анализ уровня дофамина

в плазме крови у мышей при разработке фармакологического провокационного теста. Показано, что концентрация дофамина не изменялась ни у животных на досимптомной стадии паркинсонизма, ни в контроле после введения альфа-МПП. Эти данные позволяют предположить, что системное введение альфа-МПП не должно вызывать серьезные побочные эффекты.

Для того чтобы оценить возможный отдаленный эффект альфа-МПП на хронической модели доклинической стадии было проведено морфофункциональное исследование nigростриатной системы через 7 дней после введения ингибитора. Согласно полученным данным, количество ни тел, ни терминалей аксонов дофаминергических нейронов не изменилось по сравнению с контролем. Более того, содержание тирозингидроксилазы, который является мишенью альфа-МПП и соответственно более чувствительным показателем, также сохранялось на контрольном уровне. Системных изменений, а именно концентрации дофамина в плазме крови, через 7 дней также не было обнаружено.

Таким образом, был разработан фармакологический провокационный тест с использованием ингибитора синтеза дофамина, который полностью отвечает требованиям Технического задания: использование ингибитора синтеза дофамина (альфа-МПП) в дозе, способной снизить кратковременно, в течение не более 5 часов, уровень дофамина в стриатуме не более чем на 70%, и вызвать при этом нарушение моторного поведения; использование ингибитора синтеза дофамина (альфа-МПП) в дозе, не вызывающей нарушения моторного поведения у животных в контроле; отсутствие побочных эффектов на отдаленных сроках после введения альфа-МПП. Подобранный доза альфа-МПП позволяет выявлять скрытую функциональную недостаточность nigростриатной системы, на доклинической стадии болезни Паркинсона, т.е. провокационный тест может быть рекомендован для проведения доклинических и клинических исследований.

4. Разработка научно-технических рекомендаций по использованию результатов ПНИ: биомаркеры крови и фармакологический провокационный тест для дальнейшей разработки комплексной диагностики болезни Паркинсона на доклинической стадии у больных и внедрения в реальный сектор экономики – фармацевтическую индустрию и здравоохранение (неврология)

В ходе выполнения ПНИ были получены следующие ключевые результаты: на разработанных хронических моделях доклинической и ранней клинической стадий болезни Паркинсона обнаружены периферические биомаркеры нейроденегерации, а также создан фармакологический провокационный тест для диагностики заболевания на доклинической стадии. На основе этих результатов были разработаны научно-технические рекомендации по их дальнейшему использованию для разработки комплексной диагностики болезни Паркинсона на доклинической стадии у больных и внедрения в реальный сектор экономики – фармацевтическую индустрию и здравоохранение. Проект разработанных рекомендаций представлен в Приложении Б заключительного отчета.

При разработке рекомендаций руководствовались следующими основными принципами:

- болезнь Паркинсона – это хроническое нейродегенеративное заболевание, в патогенез которого вовлечена не только nigrostriatная система мозга, но и периферическая нервная система;
- заболевание протекает бессимптомно в течение длительного время (20-30 лет), а диагностика заболевания в настоящее время осуществляется только после появления симптомов нарушения двигательной функции;
- разрабатываемая диагностика болезни Паркинсона на доклинической стадии должна быть легкодоступной методически, финансово и не требовать больших временных затрат;
- при использовании периферических биомаркеров для разработки ранней диагностики заболевания существует риск, что биомаркеры, обнаруженные у людей на ранней клинической стадии не обязательно будут проявляться у людей на доклинической стадии заболевания;
- из предыдущего пункта следует, что при использовании периферических биомаркеров для разработки ранней диагностики заболевания, необходимо проводить сравнительный анализ данных, полученных на моделях доклинической и клинической стадий болезни Паркинсона и у нелеченых больных на ранней клинической стадии;

- разработанный в ходе выполнения проекта фармакологический провокационный тест является более специфическим диагностическим методом чем биомаркеры, поэтому для комплексной диагностики болезни Паркинсона на доклинической стадии у больных разумно последовательно сочетать оба метода, для все большего и большего сужения группы риска при массовых обследованиях;

- подтверждение эффективности разрабатываемой комплексной диагностики должно проводиться с помощью позитронно-эмиссионной томографии, поскольку на данный момент только с помощью этого метода можно поставить диагноз болезни Паркинсона на доклинической стадии.

5. Разработка проекта медицинской технологии «Фармакологический провокационный тест для выявления скрытой функциональной недостаточности дофаминергической nigростриатной системы – болезни Паркинсона на доклинической стадии

Согласно пункту 2.6 Технического задания по Соглашению о предоставлении субсидии № 14.604.21.0073 от 27 июня 2014 г. в рамках реализации проекта должен был быть разработан «Проект медицинской технологии «Фармакологический провокационный тест для выявления скрытой функциональной недостаточности дофаминергической nigростриатной системы – болезни Паркинсона на доклинической стадии»».

Разработанный проект медицинской технологии представлен в Приложении В заключительного отчета.

При разработке проекта медицинской технологии руководствовались следующими основными принципами:

- до сих пор не существует общедоступной диагностики болезни Паркинсона на доклинической стадии, когда еще мишени – дофаминергические нейроны nigростриатной системы, не погибли;

- в настоящее время диагностика болезни Паркинсона на доклинической стадии возможна только с помощью позитронно-эмиссионного томографа, который является финансово затратным методом.

При разработке проекта медицинской технологии было необходимо объединить и сформулировать требования к процедурам и последовательности действия при использовании фармакологического провокационного теста для подтверждения диагноза – болезни Паркинсона.

Практическая значимость проекта медицинской технологии должна заключаться в быстром, эффективном и высокоспецифичном способе диагностики болезни Паркинсона на доклинической стадии, который не имеет аналогов на территории РФ и в мире.

6. Обобщение и оценка полученных клинических результатов

Болезнь Паркинсона – одно из тяжелейших социально значимых нейродегенеративных заболеваний - в течение многих лет развивается без проявления клинических моторных симптомов, а поэтому ее лечение начинается слишком поздно - после деградации большей части специфических нейронов, что объясняет его низкую эффективность. Поэтому целью данного проекта являлась разработка ранней диагностики болезни Паркинсона путем поиска немоторных биомаркеров у больных сразу же после диагностирования заболевания, но до начала специфического лечения, т.е. на ранней клинической стадии. Для этого проведены мультидисциплинарные исследования с участием ведущих специалистов в области неврологии, физиологии, нейрофизиологии, молекулярной биологии, генетики. При этом были оценены: история развития заболевания (анамнез), проведен анализ электрофизиологической активности мозга и мышц с использованием специальных математических подходов для расшифровки сигналов, нарушения висцеральных функций (сердечно-сосудистой системы), содержание физиологически активных веществ (гормоны, моноамины) в плазме крови, экспрессия специфических генов в клетках крови. Обследовано 169 человек, из них 60 пациентов с дрожательной формой болезни Паркинсона, 15 пациентов с ригидной формой и 94 человека группы контроля. Среди пациентов с ригидной формой мужчин было в 2 раза больше, средний возраст $57,3 \pm 1,6$ лет; средний возраст дебюта заболевания $57,1 \pm 1,5$ лет; средний балл по шкале UPDRS $17 \pm 2,9$. 2 пациента было с ранним началом БП (43 и 45 лет). У 3 пациентов семейный анамнез был отягощен по болезни Паркинсона и у 3 по дрожанию. Было обследовано 94 испытуемых из группы контроля, из которых 20 мужчин и 74 женщины, средний возраст составил $57,3 \pm 1,1$ лет. Следовательно, испытуемые из группы контроля сопоставимы по возрасту с пациентами с ригидной формой болезни Паркинсона. Немоторные симптомы, такие как гипосмия, чувство неполного опорожнения кишечника после посещения туалета, императивные позывы на мочеиспускание, чувство грусти, уныния, страха и беспокойства, дневная сонливость, синдром беспокойных ног, изменение веса неясной причины встречаются одинаково часто у пациентов с дрожательной и ригидной формами болезни Паркинсона по сравнению с испытуемыми из группы контроля. Гиперсаливация и парасомнические расстройства встречаются чаще у пациентов с ригидной формой, чем у пациентов с дрожательной формой и испытуемых из группы контроля.

Проведенные исследования свидетельствуют о том, что у пациентов с болезнью Паркинсона показатели частоты сердцебиений статистически значимо выше по сравнению с

контролем. В то же время показатели ударного объема крови статистически значимо ниже у пациентов с дрожательной формой, а при ригидной форме заболевания не отличаются от контроля. Минутный объем кровообращения существенно снижен при дрожательной форме болезни Паркинсона, а при ригидной он значительно выше по сравнению с контролем. Сравнивая между собой величины сердечного выброса крови в процентах от контроля, было выявлено, что у пациентов с ригидной формой болезнью Паркинсона показатели частоты сердцебиений и минутного объема крови существенно больше, чем при дрожательной форме. При выполнении ортостатической пробы выявлено увеличение частоты сердцебиений, которое наступает рефлекторно при снижении артериального давления. Однако реакция частоты сердцебиений у пациентов с ригидной формой болезнью Паркинсона составляет только 30% от реакции в контрольной группе. Такая реакция отражает дисфункцию симпатической регуляции деятельности сердца, т.к. в норме при ортостатической пробе происходит увеличение данного показателя. У 35-40% пациентов на ранней стадии болезни Паркинсона при выполнении ортостатической пробы происходит снижение систолического артериального давления крови, т.е. наблюдается ортостатическая гипотензия. Выявленные изменения свидетельствуют о нарушении в работе сердечно-сосудистой системы и ее адренергической регуляции (которая в норме активируется при ортостатической пробе) у пациентов на ранней клинической стадии болезни Паркинсона. Выявленные изменения в сердечно-сосудистой системе коррелируют с формой заболевания, а также с возрастом и полом пациентов с болезнью Паркинсона. Полученные результаты свидетельствуют о том, что простой в проведении тест на ортостатическую устойчивость может быть рекомендован для выявления пациентов на досимптомной стадии заболевания. Верификация данного теста должна быть проверена с помощью позитронно-эмиссионным томографа.

С помощью разработанных методов и программ исследованы признаки болезнью Паркинсона в ранней стадии: межполушарная асимметрия частотно-временных характеристик ЭЭГ особенно в центральных отведениях (С3, С4); возникновение ритма в частотном диапазоне 4-6 Гц и его частотная синхронизация с электромиографической активностью и механическим тремором конечностей; дезорганизация доминирующего ритма ЭЭГ, соответствующая общим представлениям о дезорганизации различных систем при болезни Паркинсона. Получены количественные оценки дезорганизации доминирующего ритма в центральных отведениях, которые позволяют различать группы практически здоровых людей от пациентов с болезнью Паркинсона на 1-й стадии и пациентов на 1-й стадии от пациентов на 2-й стадии. Сравнение распознавания болезни Паркинсона с помощью количественных признаков ЭЭГ с клиническими диагнозами показало более чем

80% совпадение для контрольной группы и группы пациентов на 1-й стадии болезни Паркинсона. Надежность количественной диагностики начальной стадии болезни Паркинсона существенно повышается при использовании для распознавания результаты одновременных измерений ЭЭГ и тремора.

Таким образом, с помощью вейвлет преобразования и его дальнейшего количественного анализа в работе был обнаружен ряд специфических особенностей частотно-временной организации ЭЭГ 1-й стадии заболевания. Предложенные в данной работе подходы и разработки оказались адекватными для исследования различных этапов развития болезни Паркинсона, в том числе ранних. Гистограммы экстремумов вейвлет преобразований ЭЭГ более четко по сравнению со спектрами Фурье подчеркивают признаки болезни Паркинсона и позволяют изучать их динамику. Полученные данные намечают дальнейшие пути поиска специфических маркеров ЭЭГ самых ранних, в том числе доклинических стадий заболевания.

На основании проведенных исследований, к потенциальным эндогенным периферическим маркерам болезни Паркинсона можно отнести тропные гормоны гипофиза – пролактин и кортизол. Концентрация этих гормонов изменяется в зависимости от формы болезни Паркинсона, ее стадии и зависит от пола пациента. Первичным показателем может служить изменение концентрации пролактина и кортизола в 8 часов утра. Следует отметить, что в течение суток показатели концентрации гормонов в крови изменяются. Поэтому при наличии отклонений в концентрации гормонов в 8 утра, следует проводить более детальную проверку пациента с суточным мониторингом изменения концентрации пролактина и кортизола в 4, 8 и 12 часов.

Проведенные исследования свидетельствуют о том, что при дрожательной и ригидной формах болезни Паркинсона происходит существенное снижение концентрации ДОФА и норадреналина в крови. Вместе с тем снижение концентрации адреналина выявлено только при ригидной форме заболевания. Концентрация дофамина и ДОФУК существенно не изменяются при дрожательной форме болезни Паркинсона, однако, при ригидной форме заболевания их концентрации существенно снижены по сравнению с показателями группы контроля. Полученные данные свидетельствуют о том, что изменения в концентрации норадреналина, дофамина, ДОФА и ДОФУК происходят уже на ранней клинической стадии болезни Паркинсона и зависят от формы заболевания – дрожательная или ригидная. Эти результаты позволяют предложить определение норадреналина, дофамина, ДОФА и ДОФУК в качестве возможных маркеров доклинической стадии болезни Паркинсона. Наряду с изменением состава плазмы, изменяется и уровень экспрессии специфических генов в клетках крови. Было показано достоверное снижение уровня транскрипции генов рецепторов

к дофамину (рецептора DRD3) в крови пациентов на ранних клинических стадиях болезни Паркинсона. Несмотря на успех первичных исследований, использование данных маркеров для широкомасштабной диагностики пациентов не представляется возможным, т.к. экспрессия генов, кодирующих рецепторы к дофамину, в периферических тканях происходит на чрезвычайно низком уровне, который ограничивается несколькими копиями кодирующих РНК на клетку. Измерения таких незначительных молекулярных изменений характеризуется высокой технической сложностью. Такие измерения могут быть с высокой достоверностью произведены в лабораторных условиях высококвалифицированным персоналом, с использованием приборов для амплификации ДНК в реальном времени. Использование подобной методики измерения в клинической практике не представляется оправданным из-за технической сложности, определяющей практическую невозможность валидации метода. Обнаруженные проблемы с детекцией транскрипции нейрональных генов в клетках крови привели к изменению стратегии поиска ранних маркеров болезни Паркинсона. Нами исследуется хроматин- ремоделирующий мультибелковый комплекс WI/SNF. Данный комплекс является объектом исследования многих ученых мира, т.к. играет важную роль в развитии мозга и в регуляции работы генов центральной нервной системы. Экспрессию двух мРНК гена RNF10 (RNF-P и RNF-S форм), изучали в периферических лимфоцитах крови больных и здоровых людей. Изменение уровня экспрессии сравнивали с изменениями экспрессии гена rkm2, который, как было показано другими авторами, меняется у больных с паркинсонизмом. Оказалось, что уровень сплайс-варианта гена rkm2 действительно изменяется у пациентов с болезнью Паркинсона, а уровень транскрипта данного гена значительно снизился в выборке больных по сравнению с выборкой здоровых людей.

Было показано, что изменения экспрессии трех генов ZNF746, PARK7, ATP13A2 могут играть важную роль в развитии патологического нейродегенеративного процесса при болезни Паркинсона на ранней клинической стадии развития заболевания. Наблюдается выраженный рост относительных уровней мРНК генов ZNF746 в периферической крови больных с паркинсонизмом по сравнению со здоровыми добровольцами. Для двух генов PARK7 и ATP13A2 эти различия являются статистически значимыми как для пациентов, не подвергавшихся лечению, так и для леченых больных. Подобные эффекты в группе больных с различными неврологическими заболеваниями отсутствуют, в связи с этим наблюдаемые изменения в периферической крови больных с паркинсонизмом, по всей видимости, являются специфическими и отражают те процессы, которые протекают в клетках головного мозга на ранней клинической стадии заболевания. Кроме того обнаруженные специфические для болезни Паркинсона изменения в экспрессии генов ZNF746, PARK7, ATP13A2 позволяют включить их в панель биомаркеров, которая в дальнейшем будет использована

для разработки метода комплексного тестирования при массовом скрининге для выявления лиц с доклинической стадией болезни Паркинсона.

Таким образом, разработан комплексный подход к диагностике болезни Паркинсона на ранней клинической стадии (от 1 до 1,5 по Хен и Яр), основанный на выявлении легкодоступных для анализа биомаркеров нарушений функций мозга и периферических органов.

7. Проведение работ по достижению показателей результативности проекта

В рамках отчетного периода для достижения показателей результативности исполнители данного проекта популяризировали результаты на российских и международных конференциях, опубликованы научные статьи в журналах, индексируемых в Web of Science и Scopus, защищены две диссертации, скрыты способы воспроизведения хронических моделей доклинической и ранней клинической стадий болезни Паркинсона в режиме Ноу-Хау. Для реализации поставленных задач на данном этапе проекта были использованы уникальные установки и оборудование научных центров коллективного пользования.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

По результатам работы по 5 этапу Проекта можно сделать следующие выводы:

1. Проведена оценка кинетики действия и побочных эффектов α -МПП при использовании фармакологического провокационного теста на хронической модели доклинической стадии болезни Паркинсона у мышей. При этом показано, что:
 - количество тел дофаминергических нейронов в черной субстанции и терминалей их аксонов в стриатуме на отдаленных сроках после введения α -МПП не изменялось по сравнению с контрольной группой;
 - содержание тирозингидроксилазы в телах нейронов в черной субстанции и терминалях их аксонов в стриатуме на отдаленных сроках после введения α -МПП не изменилось по сравнению с контрольной группой.
2. Дана оценка количественных и качественных изменений состава плазмы крови на отдаленных сроках после введения α -МПП при разработке фармакологического провокационного теста. При этом показано:
 - отсутствие изменений в уровне дофамина как в контрольных, так и в опытных группах при введении α -МПП.
3. Проведены оценка и обобщение полученных результатов по разработке хронических экспериментальных моделей болезни Паркинсона, их характеристики, использования для поиска биомаркеров в плазме крови и разработки фармакологического провокационного теста для выявления скрытой функциональной недостаточности nigrostriatной дофаминергической системы.
4. Разработаны научно-технические рекомендации по использованию результатов ПНИ: биомаркеры крови и фармакологический провокационный тест для дальнейшей разработки комплексной диагностики болезни Паркинсона на доклинической стадии у больных и внедрения в реальный сектор экономики – фармацевтическую индустрию и здравоохранение (неврология).
5. Проведены обобщение и оценка полученных клинических результатов.

Все поставленные в Техническом задании и Календарном плане задачи выполнены полностью. Представленный отчет одобрен Ученым советом Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН.

Проведенная работа по разработке и апробации фармакологического провокационного теста для выявления скрытой недостаточности nigростриатной дофаминергической системы на доклинической стадии болезни Паркинсона, что является уникальным исследованием, которое не имеет аналогов в мировой практике диагностики нейродегенеративных заболеваний.

Заключительный отчет за этап по проекту представлен на сайте Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН <http://idbras.comcor.ru/>.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

- [1] Iskedjian, M. Cost analysis of ropinirole versus levodopa in the treatment of Parkinson's disease / M. Iskedjian, T. R. Einarson // *Pharmacoeconomics*. – 2003. – Vol. 21 – N 2. – P. 115-127.
- [2] Катунина, Е.А. Эпидемиологические исследования паркинсонизма. Методические рекомендации: мет. Пособие / Е. А. Катунина, Ю. Н. Бездольный // М: Российский государственный медицинский университет, 2010. – 43 с.
- [3] Whetten-Goldstein, K. The burden of Parkinson's disease on society, family, and the individual / K. Whetten-Goldstein [et al.] // *J. American Geriatrics Society*. – 1997. – Vol. 45. – N 7. – P. 844-849.
- [4] Fahn, S. Clinical aspects of Parkinson's disease / S. Fahn // *Parkinson's disease: molecular and therapeutic insights from model systems* / Amsterdam. Elsevier. – Amsterdam, 2008. – P. 3-8.
- [5] Bernheimer, H. Brain dopamine and the syndromes of Parkinson and Huntington. Clinical, morphological and neurochemical correlations / H. Bernheimer [et al.] // *J Neurol Sci*. – 1973. – Vol. 20. – P.415-455.
- [6] Agid, Y. Parkinson's disease: pathophysiology / Y. Agid // *Lancet*. – 1991. – Vol. 337. – N 8753. – P. 1321-1324.
- [7] Bezard, E. Compensatory mechanisms in experimental and human parkinsonism: towards a dynamic approach / E. Bezard, C.E. Cross // *Prog Neurobiol*. – 1998. – Vol. 55. – N 2. – P. 93-116.
- [8] Угрюмов, М. В. Нейродегенеративные заболевания: фундаментальные и прикладные аспекты: монография / М. В. Угрюмов // М.: Наука, 2010. – 448с.
- [9] Угрюмов, М.В. Новые представления о патогенезе, диагностике и лечении нейродегенеративных заболеваний / М. В. Угрюмов // *Вестник Российской Академии медицинских наук*. – 2010. – № 8. – С. 6-19.
- [10] Rosen, C. Cerebrospinal fluid biomarkers in cardiac arrest survivors / C. Rosen [et al.] // *Resuscitation*. – 2013. – Vol. 85. – N 2. – P. 227-232.
- [11] Sharma, S. Biomarkers in Parkinson's disease (recent update) / S. Sharma [et al.] // *Neurochem. Int*. – 2013. – Vol. 3. – P. 201-229.
- [12] Witek, P. The role of combined low-dose dexamethasone suppression test and desmopressin stimulation test in the diagnosis of persistent Cushing's disease. Case report / P. Witek [et al.] // *Endokrynol Pol*. – 2010. – Vol. 61. – N 3. – P.312-317.

- [13] Gasco, V. Acylated ghrelin as a provocative test for the diagnosis of GH deficiency in adults / V. Gasco [et al.] // *Eur J Endocrinol.* – 2012. – Vol. 168. – N 1. – P. 23-30.
- [14] Hermann, S. Preclinical research. Seal of approval translational medicine / S. Herman, B. Pichler, J. Kotzerke // *Nuklearmedizin.* – 2013. – Vol. 52. – N 6. – P.53-54.
- [15] DeKosky, S. T. Looking backward to move forward: early detection of neurodegenerative disorders / S. T. DeKosky, K.Marek // *Science.* – 2003. – Vol. 302. – P. 830-34.
- [16] Goldstein, D. S. Cardiac sympathetic denervation in Parkinson disease / D. S. Goldstein [et al.] // *Ann. Intern. Med.* – 2000. – Vol. 133. – P. 338-347.
- [17] Klos, K. J. Alpha-synuclein pathology in the spinal cords of neurologically asymptomatic aged individuals / K. J. Klos [et al.] // *Neurology.* – 2006. – Vol. 66. – N 7. – P. 1100-1102.
- [18] Braak, H. Gastric alpha-synuclein immunoreactive inclusions in Meissner's and Aurbach's plexuses in cases staged for Parkinson's disease-related brain pathology / H. Braak [et al.] // *Neurosci. Lett.* – 2006. – Vol. 396. – N 1. – P. 67-72.
- [19] Goldstein, D. S. Olfactory dysfunction in pure autonomic failure: Implications for the pathogenesis of Lewy body diseases / D. S.Goldstein, L. Sewell // *Parkinsonism Relat. Disord.* – 2009. – Vol. 15. – P. 516-520.
- [20] Magdalinou, N. Cerebrospinal fluid biomarkers in parkinsonian conditions: an update and future directions / N. Magdalinou, A. J Lees, H. Zetterberg // *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* – 2014. – Vol. 85. – N 10. – P. 1065-1075.
- [21] Хакимова, Г. Р. «Провокационный тест» как новый подход к ранней диагностике болезни Паркинсона / Г.Р. Хакимова [и др.] // *ДАН.* – 2015. – Т. 460. – № 6. – С. 733–735.
- [22] Khakimova, G.R. 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 / G.R. Khakimova [et al.] // *Mol Neurobiol.* – 2016. – DOI 10.1007/s12035-016-9936-9.
- [23] Gibb, W.R. A comparison of clinical and pathological features of young- and old-onset Parkinson's disease / W.R. Gibb, A.J. Lees // *Neurology.* – 1988. – Vol. 38. – N. 9. – P. 1402-1406.
- [24] Hoehn, M.M. Parkinsonism: onset, progression and mortality / M.M. Hoehn, M.D. Yahr // *Neurology.* – 1967. – Vol. 17. – N. 5. – P. 427-442.

ПРИЛОЖЕНИЕ А

План исследования по разработке, апробации и оценке кинетики действия и побочных эффектов α -МПП при использовании фармакологического провокационного теста для выявления скрытой функциональной недостаточности nigrostriатной дофаминергической системы на доклинической стадии болезни Паркинсона

Разрабатываемый фармакологический провокационный тест для выявления скрытой функциональной недостаточности nigrostriатной дофаминергической (ДА-ергической) системы на доклинической стадии болезни Паркинсона (БП) на мышах должен соответствовать следующим требованиям согласно пункту 4 Технического задания:

Доза ингибитора синтеза дофамина (ДА), α -метил-пара-тирозин (α -МПП), должна кратковременно снижать уровень ДА не более чем на 70% и вызывать при этом нарушение двигательной активности животных на хронической модели доклинической стадии БП, но при этом не вызывать аналогичных нарушений в контроле.

А. 1 Методика подбора протокола введения α -МПП и методика оценки кинетики действия и побочных эффектов α -МПП

Подбор протокола введения α -МПП и оценки кинетики действия и побочных эффектов α -МПП должны осуществляться на основе данных литературы и предварительных результатах, полученных в лаборатории нервных и нейроэндокринных регуляций ИБР РАН.

А.2 Схема введения МФТП и α -МПП

Для воспроизведения модели хронической доклинической (досимптомной) стадии БП, разработанную на предыдущих этапах выполнения проекта, должны быть самцы мышей линии C57BL/6 в возрасте 2-2,5 месяца и весом 22-26 г на начало экспериментов. Мыши должны содержаться в стандартных условиях вивария, со сменной светлой и темной фаз суток 12/12 часов при свободном доступе к воде и пище. Манипуляции с животными необходимо осуществлять в соответствии с протоколом, утвержденным комитетом по охране

животных Института биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, находящимся в соответствии с национальными и международными требованиями.

Модель хронической доклинической стадии БП животным должна воспроизводиться путем подкожного введения 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридин (МФТП, Sigma, США), специфический токсин дофаминергических нейронов, в течение 5 недель. Контрольная группа получает 0.9% NaCl по аналогичной схеме.

На шестой день после 5 инъекции МФТП (после 5 недель введения нейротоксина) у всех животных необходимо оценивать двигательную активность при помощи теста «открытое поле» (open field) и «вертикальной палки» (pole test). По результатам двигательной активности как контрольная, так и опытная группы делятся на равнозначные по средним и внутригрупповым дисперсиям на подгруппы: "NaCl¹" и "NaCl²", "МФТП¹" и "МФТП²" (см. рисунок 13).

На следующий день животным из подгрупп "NaCl¹" и "МФТП¹" однократно подкожно необходимо ввести 0.9% NaCl, тогда как животным из подгрупп "NaCl²" и "МФТП²" – α-МПТ (Sigma-Aldrich, США) в дозе – 50 мг/кг. Через 4 часа после введения α-МПТ или 0.9% NaCl необходимо повторно оценить двигательную активность животных.



α-МПТ – альфа-метил-пара-тирозин; МФТП – 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридин.

Рисунок 13 – Схема эксперимента по разработке фармакологического провокационного теста на хронической модели доклинической стадии болезни Паркинсона

Для изучения кинетики действия и отдаленных эффектов α-МПТ на хронической модели доклинической стадии болезни Паркинсона ингибитор синтеза дофамина необходимо ввести на 7 дней после введения МФТП (рис. 14).

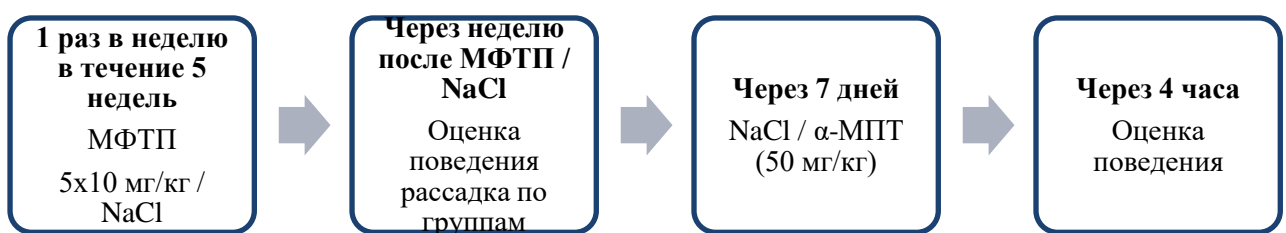


Рисунок 14 – Схема эксперимента по исследованию отдаленных эффектов α -МППТ при разработке фармакологического провокационного теста на хронической модели доклинической стадии болезни Паркинсона

А.3 Сбор материала

Сбор материала должен быть проведен сразу после повторной оценки двигательной активности животных, т.е. через 4 часа и через 7 дней после введения NaCl или α -МППТ. После декапитации, необходимо извлечь мозг и на холодной пластинке под бинокулярной лупой (Nikon SMZ660, США), снабженной окуляром со шкалой, разрезать его по средней сагиттальной линии. Далее правую половину мозга разрезать фронтально на уровне каудальной границы мозолистого тела (bregma -2.70), затем сделать срез каудальнее на 0.3 мм (bregma 0.02) передней комиссуры и отрезать обонятельные луковицы на уровне 1 мм роstralнее мозолистого тела (bregma 2.10) и далее выделить стриатум в соответствии с атласом. Из последнего оставшегося блока выделить черную субстанцию (ЧС): отрезать кору, медиальную часть блока, отступив на 0.75 мм от сагиттальной линии и на 1.3 мм от нижнего края блока. Затем образцы взвесить, заморозить в жидком азоте и хранить при -70°C до проведения дальнейших экспериментов.

Левую половину мозга необходимо поместить в фиксатор 4% параформальдегид на 12 часов и после отмывки в фосфатно-солевом буфере (pH 7.2-7.4) поместить в криопротектор – 20% сахарозу. После чего заморозить в гексане (-42°C) и хранить до дальнейшего проведения иммуногистохимии при -70°C .

Кровь необходимо собирать в пробирку, содержащую 30 мкл 5% раствора ЭДТА (Sigma) и 10 мкл 10% раствора метабисульфита натрия (Sigma). Затем отделить плазму от форменных элементов центрифугированием при 400 g в течение 10 минут и добавить в нее 250 пмоль 3.4-дигидроксibenзиламин гидробромида (ДГБА)- внутренний стандарт (Sigma) в 0.1 н HClO₄. Для освобождения от высокомолекулярных белков плазму центрифугировать при 2000 g 20 минут, перенести в чистую пробирку и хранить при -70°C до определения катехоламинов.

А.4 Двигательная активность

Двигательную активность животных необходимо оценить при помощи теста «открытое поле» в автоматизированном режиме с помощью системы наблюдения и длительной

регистрации двигательной активности животных TSE PhenoMaster («TSE Systems GmbH», Германия). В течение шести минут у животных как в контроле, так и в опыте необходимо измерять: а) пройденный путь (горизонтальная активность, см); б) время без движений (с); в) число вертикальных стоек (вертикальная активности). Также необходимо определять длину шага, как один из наиболее чувствительных тестов на изменение двигательной активности. Животным необходимо окрасить подошвы лап пищевой краской и поместить на лист белой бумаги, находящийся в пенале размером 50x25 см. Средняя длина шага должна определяться, как расстояние от начала среднего пальца передней лапы до конца пятки задней лапы той же стороны тела пока животное двигается по прямой линии. Также необходимо регистрировать время спуска с вертикальной палки (длина 60 см и диаметр 1 см), что позволяет оценить координацию движений, при этом оценивать 2 параметра: время разворота животных и время спуска. На 6 день после последней инъекции МФТП в группах контроля и опыта должны отсутствовать нарушения двигательной активности по всем оцениваемым параметрам.

А.5 Содержание дофамина и его метаболитов

Для определения содержания дофамина и его метаболитов в ЧС и стриатуме должна быть использована высокоэффективная жидкостная хроматография с электрохимической детекцией. Для этого замороженную нервную ткань необходимо гомогенизировать в 40 объемах 0.1 Н HClO₄ с добавлением диоксибензиламина (0.5 нмоль/мл). Далее пробы центрифугировать при +4°C и 12000 g в течение 15 мин и отобрать супернатант для дальнейших измерений. ДА и его метаболиты разделять на обращённо-фазной колонке ReproSil-Pur, ODS-3, 4x100 мм с диаметром пор 3 мкм (Dr. Majsch GmbH, «Элсико», Москва, Россия) при скорости подвижной фазы 1.0 мл/мин под давлением 200 атм. (насос PM-80, BAS, США). Состав мобильной фазы: 0.1 М цитратно-фосфатный буфер (pH 3.0), 1.1 мМ октансульфоновая кислота, 0.1 мМ ЭДТА и 9% ацетонитрил. Для измерения использовать стеклоугольный электрод (+0.85 V) и электрод сравнения Ag/AgCl. Пики дофамина и его метаболитов идентифицировать по времени их выхода в стандартном растворе, содержание катехоламинов рассчитывать методом внутреннего стандарта, используя отношение площадей пиков в стандартной смеси и в образце, с помощью программного обеспечения «Мультихром» (Ampersand LTD, Россия).

А.6 Иммуногистохимия и количественная оценка дофаминергических нейронов

Тела дофаминергических нейронов в черной субстанции и терминали их аксонов в стриатуме необходимо выявлять на тирозингидроксилазу (ТГ) методом иммуногистохимии. Для этого на криостате (Leica CM1850, Германия) приготовить фронтальные серийные срезы черной субстанции толщиной 20 мкм (от bregma -2.70 до bregma -3.88), около 70 срезов с одного мозга, и фронтальные срезы стриатума толщиной 12 мкм (от bregma 1.54 до bregma 0.14), около 20 срезов с одного мозга. Срезы монтировать на предметные стекла и последовательно инкубировать с: (а) 0.03% H₂O₂ 30 мин при +20°C, (б) 3% бычьим сывороточным альбумином (Sigma, США) и 0.3% Triton X-100 (Triton-X100, Sigma, США) на 0.02 М ФСБ 30 мин при +20°C; (в) кроличьими антителами к ТГ (1:2000) (предоставлены Ж. Тибо, Франция) (Arluison et al., 1984) на 0.02 М ФСБ, содержащем 1% бычий сывороточный альбумин и 0.1% Triton X-100 в течение 20 часов при +20°C; (г) биотинилированными козьими антителами к антителам кролика (1:200) (Vector Laboratories, США) на 0.02 М ФСБ в течение 2-х часов при +20°C; (д) авидин-биотиновым комплексом, связанным с пероксидазой хрена (Vector Laboratories, США), на 0.02 М ФСБ в течение 1 часа при +20°C. После каждой инкубации срезы промывать в 0.02 М ФСБ в течение 30 минут при +20°C. Выявление пероксидазы авидин-биотинового комплекса осуществлять путем инкубации с 0.05% 3,3'-диаминобензидинтетрагидрохлоридом (Sigma, США) и 0.02% H₂O₂ на ФСБ при +20°C под визуальным контролем. Затем срезы заключить в среду Mowiol.

Срезы черной субстанции и стриатума изучать в просвечивающем световом микроскопе Olympus BX51 (Япония), оснащенном цифровой камерой Olympus DP70 (Япония), при увеличениях объектива ×10 и ×100, соответственно. На каждом срезе черной субстанции (по 70 срезов с мозга) необходимо обвести область компактной части, содержащей тела дофаминергических нейронов, в соответствии с атласом (Paxinos and Franklin 2001), после чего в этой области подсчитать число нейронов, причем только с видимым ядром. Для исключения двойного подсчета нейронов, расположенных на соседних срезах, необходимо использовать метод Аберкромби в формуле (1):

$$N = n \frac{\Delta}{\Delta + d}, \quad (1)$$

где N – общее число клеток в слое, n – число подсчитанных клеток в слое, Δ - толщина среза (20 мкм), d – средний диаметр ядра клетки (6.94 мкм).

Верхняя граница дорзального стриатума определяется по границе мозолистого тела, а нижняя как ½ бокового желудочка, при этом высота нижней границы до передней комиссуры составляла 0.6 мм, а высота до мозолистого тела 1.25 мм. Терминали аксонов подсчитать в каждой из четырех анализируемых областей – в их центральной зоне площадью

900 мкм² с помощью программы «Striatum Image Analysis», которая позволяет автоматически обрабатывать каждое загруженное изображение, определяя количество иммунокрашенных терминалей, их средний размер (площадь в мкм²).

А.7 Содержание тирозингидроксилазы в нейронах черной субстанции и аксонах стриатума

Для полуколичественного иммуноцитохимического анализа содержания ТГ в дофаминергических нейронах выбрать 7 срезов черной субстанции (каждый десятый) для каждого животного. При помощи микроскопа Olympus BX51 (Япония), оснащенном цифровой камерой Olympus DP70 (Япония), при увеличении объектива ×20, получить изображения. Перевести изображения в черно-белые и анализировать с помощью программы AnalySIS 5.0. (Olympus, Япония) – на каждом выбранном срезе в месте черной субстанции обвести область «компактной части» черной субстанции и после этого обвести все нейроны (область цитоплазмы). Оптическую плотность (ОП) нейронов, коррелирующую с концентрацией ТГ, определить как «уровень серого» по следующей формуле: $ОП = \log(\text{уровень серого фона} / \text{уровень серого сигнала})$. Уровень серого для каждого нейрона определялся по его ТГ-иммунореактивной соме (без учета ядра), в качестве фона использовать часть среза без волокон и ТГ-иммунореактивных нейронов. Параллельно на тех же срезах определяется средний диаметр (в мкм) и средняя площадь (в мкм²) сомы нейронов.

Для полуколичественного анализа ТГ в волокнах дорзального стриатума использовать совместно разработанную с Вычислительным Центром им. А.А. Дородницына РАН программу «Striatum Image Analysis», которая позволяет автоматически обрабатывать каждое загруженное изображение, определяя количество иммунокрашенных терминалей, их средний размер (площадь в мкм²), а также уровень серого каждой терминали для дальнейшего вычисления ОП терминалей.

А.8 Белковый гель-электрофорез и Вестерн блот

Пробы стриатума и черной субстанции размораживать и гомогенизировать в буфере, содержащем 20 мМ ЭДТА, 50 мМ HEPES-Na, 200 мМ NaCl (Sigma Aldrich, США) из расчета 3 мкл буфера на 1 мг ткани. Гомогенат центрифугировать 20 минут при +4°C и 14000 об/мин, отделить супернатант и определить в нем концентрацию общего белка методом ВСА. Далее образцы в течение 5 мин необходимо денатурировать в 1% β-меркаптоэтаноле при 95°C и смешать с SLB-буфером, содержащим 10% SDS, 50% глицерол, 10% β-меркаптоэтанол, 0.5

M Tris-HCl, pH 6.8, 0.004% бромфеноловый синий в соотношении 4:1 (все реактивы – Sigma Aldrich, США).

Электрофорез белков необходимо проводить в двух полиакриламидных гелях. В качестве концентрирующего геля использовать 5% полиакриламидный гель, содержащий 130 мМ Tris-HCl (pH 6.8), 0.5% SDS, 0.5% персульфат аммония, 0,1% TEMED (все реактивы – Sigma Aldrich, США). В качестве разделяющего геля нужно использовать 12% полиакриламидный гель, содержащий 375 мМ Tris-HCl (pH 8.8), 1% SDS, 1% персульфат аммония, 0,8% TEMED. Пробы стриятума, содержащие 20 мкг общего белка, и черной субстанции, содержащие 30 мкг общего белка, наносить в лунки. Электрофорез проводить в трис-глициновом буфере (25 мМ Tris-HCl, 190 мМ глицин, 0.1% SDS), pH 8.3 в камере для вертикального электрофореза Mini-Protein Tetra System (BioRad, США), 30 мин при напряжении 80 В, далее 1.5 часа при напряжении 180 В.

Перенос белков из гелей на нитроцеллюлозные мембраны необходимо проводить с помощью системы Mini Trans-Blot (BioRad, США) в трис-глициновом буфере (48 мМ Tris-HCl, 39 мМ глицин, 20% этанол, 0.04% SDS) в течение 1,5 часов при силе тока 280 мА. Для окраски общего белка необходимо инкубировать мембраны в течение 10 мин в красителе понсо (0.5% Ponceau S и 7.5% трихлоруксусная кислота). Далее мембраны отмыть в бидистиллированной воде и TNT буфере, содержащем 10 мМ Tris-HCl, 150 мМ NaCl, 0.1% Tween-20, pH 7.5, и инкубировать в 5% обезжиренном молоке при комнатной температуре в течении 1 часа. После инкубации мембраны отмыть в TNT буфере три раза по 10 мин и инкубировать с первыми моноклональными антителами на ТГ (1:1500, Sigma Aldrich) в TNT с 1% обезжиренным молоком ночь при +4°C. На следующий день мембраны необходимо отмыть в TNT три раза по 10 мин и инкубировать со вторыми антителами, конъюгированными с пероксидазой хрена, к IgG мыши (1:50000) в TNT с 1% обезжиренным молоком при комнатной температуре 2 часа. После отмывки на мембрану нанести ECL (home-made: 0,1М Tris-HCl pH8,5, 12,5мМ люминол, 2мМ кумаровая кислота, 0,09% H₂O₂, все реактивы – Sigma Aldrich, США), и проявить с помощью системы геле-документирования ChemiDoc Touch (BioRad, США). Уровень серого полос блота, соответствующих ТГ, определить с помощью программы ImageLab(BioRad, США). Результаты представить в виде процентов от контроля.

ПРИЛОЖЕНИЕ Б

ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО НАУЧНЫХ ОРГАНИЗАЦИЙ
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
ИНСТИТУТ БИОЛОГИИ РАЗВИТИЯ ИМ. Н.К. КОЛЬЦОВА РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ
НАУК (ИБР РАН)
г. Москва, ул. Вавилова 26

УТВЕРЖДАЮ
Директор ИБР РАН
чл.-корр. РАН
_____ А.В. Васильев
« ____ » _____ 2017 г.

**НАУЧНО-ТЕХНИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ
ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИКЛАДНЫХ НАУЧНЫХ
ИССЛЕДОВАНИЙ**

по теме: Экспериментальное моделирование и разработка ранней диагностики болезни
Паркинсона

(Соглашение о предоставлении субсидии № 14.604.21.0073 от 27 июня 2014 г.)

**БИОМАРКЕРЫ КРОВИ И ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИЙ ПРОВОКАЦИОННЫЙ ТЕСТ
ДЛЯ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ КОМПЛЕКСНОЙ ДИАГНОСТИКИ БОЛЕЗНИ
ПАРКИНСОНА НА ДОКЛИНИЧЕСКОЙ СТАДИИ У БОЛЬНЫХ И ВНЕДРЕНИЯ
В РЕАЛЬНЫЙ СЕКТОР ЭКОНОМИКИ – ФАРМАЦЕВТИЧЕСКУЮ ИНДУСТРИЮ
И ЗДРАВООХРАНЕНИЕ (НЕВРОЛОГИЯ).**

Москва 2017

Дальнейшая разработка технологии комплексной диагностики болезни Паркинсона на доклинической стадии должна быть основана на использовании фармакологического провокационного теста и направленном поиске у нелеченых больных на ранней клинической стадии болезни Паркинсона биомаркеров в крови, которые также характерны для животных при экспериментальном моделировании ранней клинической и доклинической стадий этого заболевания. В качестве экспериментальных моделей болезни Паркинсона могут быть использованы созданные в ходе выполнения проекта хронические модели доклинической и ранней клинической стадий болезни Паркинсона у мышей. Перспективными потенциальными биомаркерами крови являются изменения состава плазмы крови, а также экспрессии генов и фенотипа клеток крови.

Создание технологии комплексной диагностики болезни Паркинсона на доклинической стадии должно быть осуществлено в несколько этапов:

1. Дальнейший поиск биомаркеров у нелеченых больных на ранней клинической стадии болезни Паркинсона.

На этом этапе необходимо продолжить скрининг изменений биохимического состава плазмы крови и уровня экспрессии специфических генов и фенотипа клеток крови у нелеченых больных на ранней клинической стадии болезни Паркинсона (рекомендуется использовать больных со стадией заболевания не выше 1-1.5 балла по шкале Хен-Яра) по сравнению с контролем – испытуемыми такого же возраста и пола при отсутствии хронической нервной и нейроэндокринной патологий. Выборки больных и контрольных испытуемых рекомендуется делать не меньше 100-150 человек в каждой группе.

У больных и контрольных испытуемых необходимо делать заборы венозной крови однократно или несколько раз в течение суток в условиях стационара. Далее центрифугированием крови необходимо получить образцы плазмы и лимфоцитов, которые рекомендуется заморозить и хранить при -70°C до проведения анализа. На этом этапе у больных необходимо выявить биомаркеры в виде изменения состава плазмы крови по сравнению с возрастным контролем. Для определения состава плазмы крови – концентраций моноаминов, стероидов, белков, пептидов, аминокислот и метаболитов этих веществ рекомендуется использовать современные высокоточные и высокопроизводительные аналитические методы: высокоэффективную хроматографию с электрохимической и флуоресцентной детекцией, иммуноферментный анализ, вестерн блот. Кроме того, для определения метаболического профиля в пробах крови рекомендуется использование масс-спектрометрических методов. В клетках крови у больных и испытуемых контрольной группы необходимо оценить экспрессию специфических генов: рецепторов, транспортеров, патологических белков, ферментов синтеза моноаминов, транскрипционных факторов, с

помощью ПЦР в реальном времени, а также рекомендуется измерить содержание соответствующих моноаминов и функционально значимых белковых молекул (транспортёры, ферменты и др.) с помощью высокоэффективной хроматографии с электрохимической детекцией, иммуноферментного анализа и вестерн блота.

2. Поиск у животных на моделях болезни Паркинсона биомаркеров, обнаруженных у больных.

На следующем этапе работы необходимо проверить, обнаруживаются ли биомаркеры, найденные у больных на предыдущем этапе работы, у животных на экспериментальных моделях доклинической и клинической стадии болезни Паркинсона. В качестве экспериментальных моделей болезни Паркинсона рекомендуется использовать созданные в ходе выполнения проекта хронические модели доклинической и ранней клинической стадий болезни Паркинсона у мышей, основанные на пролонгированном введении животным пронеуротоксина МФТП.

Кровь экспериментальных и контрольных животных необходимо разделить центрифугированием на пробы плазмы и лимфоцитов, которые рекомендуется хранить в замороженном состоянии при -70°C до их анализа с помощью тех же методов, которые рекомендовалось использовать для анализа крови людей (см п. 1).

3. Создание диагностической панели (диагностикума) для выявления болезни Паркинсона на доклинической стадии на основе отбора биомаркеров, обнаруженных как у больных, так и на обеих моделях этого заболевания.

На этом этапе необходимо провести сравнительный анализ и математическую обработку результатов, полученных на предыдущих этапах. Это позволит выявить группу биомаркеров, которые характерны как для больных, так и для животных на моделях ранней клинической и доклинической стадий болезни Паркинсона. Именно эти наиболее маркеры рекомендуются для дальнейшего использования в качестве диагностического теста для выявления больных на доклинической стадии заболевания.

4. Поиск отобранных биомаркеров доклинической стадии болезни Паркинсона у испытуемых пожилого возраста без нарушения двигательной функции, и по их наличию формирование первичной группы риска.

У испытуемых пожилого возраста без нарушений двигательной функции в условиях стационара или амбулаторно необходимо получить пробы крови, после чего осуществить поиск отобранных в ходе предыдущих исследований биомаркеров доклинической стадии болезни Паркинсона. Рекомендуемый размер выборки – 300-500 человек. При обнаружении искомым маркеров испытуемых необходимо включить в первичную группу риска для последующего исследования с помощью фармакологического провокационного теста.

5. Дальнейшая разработка фармакологического провокационного теста и проверка испытуемых в первичной группе риска с его помощью.

Приложение А содержит план исследования по разработке, апробации и оценке кинетики действия и побочных эффектов α -МППТ при использовании фармакологического провокационного теста для выявления скрытой функциональной недостаточности nigrostriatной дофаминергической системы на доклинической стадии болезни Паркинсона.

Испытуемых, включенных в первичную группу риска необходимо обследовать с помощью фармакологического провокационного теста. При обнаружении симптомов скрытой функциональной недостаточности nigrostriatной дофаминергической системы испытуемых необходимо включить в итоговую группу риска для последующего исследования помощью позитронно-эмиссионной томографии.

6. Подтверждение валидности технологии доклинической диагностики болезни Паркинсона путем проверки испытуемых в итоговой группе риска с помощью позитронно-эмиссионной томографии.

У испытуемых без нарушения двигательной функции, отобранных на предыдущем этапе работы в итоговую группу риска необходимо оценить функциональное состояние nigrostriatной дофаминергической системы с помощью неинвазивной позитронно-эмиссионной томографии. Подобный анализ рекомендуется осуществить в одной из европейских стран, поскольку в РФ такие исследования не проводятся. В качестве маркеров функционального состояния рекомендуется [18F]-DOPA, позволяющий оценивать скорость синтеза дофамина в стриатуме. Снижение функциональной активности дофаминергических нейронов у испытуемых в группе риска будет доказательством валидности разработанной технологии комплексной диагностики болезни Паркинсона на доклинической стадии.

ПРИЛОЖЕНИЕ В

ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО НАУЧНЫХ ОРГАНИЗАЦИЙ
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
ИНСТИТУТ БИОЛОГИИ РАЗВИТИЯ ИМ. Н.К. КОЛЬЦОВА РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ
НАУК (ИБР РАН)
г. Москва, ул. Вавилова 26

УТВЕРЖДАЮ
Директор ИБР РАН
чл.-корр. РАН
_____ А.В. Васильев
« ____ » _____ 2017 г.

Фармакологический провокационный тест для выявления скрытой функциональной
недостаточности дофаминергической nigростриатной системы – болезни Паркинсона на
доклинической стадии
(проект медицинской технологии)

Москва, 2017

Аннотация

Болезнь Паркинсона – одно из тяжелейших социально значимых нейродегенеративных заболеваний, которое до сих пор не излечивается и приводит к инвалидизации и летальному исходу. Это объясняется диагностированием заболевания через много лет после его начала при почти полной деградации nigrostriatalной дофаминергической системы мозга – ключевого звена регуляции двигательной функции, и появления моторных симптомов (тремор, акинезия, ригидность). Стратегия борьбы с болезнью Паркинсона включает разработку ранней (доклинической) диагностики – задолго до появления моторных симптомов, и превентивного лечения, направленного на замедление гибели нейронов и продление периода комфортной жизни больного. Медицинская технология – инновационная технология ранней диагностики болезни Паркинсона на доклинической (асимптомной) стадии с помощью фармакологического провокационного теста. В качестве провокационного агента используется обратимый ингибитор синтеза дофамина α -метил-л-тирозина (α МЛТ) в дозе, которая вызывает снижение уровня дофамина до порога, при котором кратковременно проявляется нарушения двигательной функции на доклинической стадии заболевания, но не в норме.

Медицинская технология адресована неврологам.

Медицинская технология рекомендована людям старше 40-50 лет при профилактическом осмотре, что позволит выявить болезнь Паркинсона на доклинической стадии и начать превентивное лечение, направленное на замедление гибели дофаминергических нейронов и продления развития заболевания без моторных нарушений и, сохранение, таким образом, работоспособность людей.

Патентная защита:

Патент на изобретение «Способ доклинической диагностики болезни Паркинсона у практически здоровых лиц» 2006127268/14 от 28.07.2006, Правообладатель – Угрюмов М.В.

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	54
В.1 Показания к использованию новой медицинской технологии.....	56
В.2 Противопоказания к использованию новой медицинской технологии.....	56
В.3 Материально-техническое обеспечение новой медицинской технологии	56
В.4 Описание новой медицинской технологии	57
В.5 Возможные осложнения при использовании медицинской технологии и способы их устранения.....	57
СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ ИСТОЧНИКОВ.....	58

ВВЕДЕНИЕ

Нарушение метаболизма нейротрансмиттеров, возникающее при гибели синтезирующих их нейронов мозга, у человека приводит к развитию нейродегенеративных заболеваний – болезни Альцгеймера, болезни Паркинсона, гиперпролактинемии, хореи Гентингтона и ряда других [1, 2, 3]. Важнейшей составляющей патогенеза болезни Паркинсона является деградация нигростриатной дофаминергической системы – ключевого звена регуляции двигательной функции. Особенностью болезни Паркинсона является то, что нарушение двигательной функции – моторные симптомы, а, следовательно, и возможность диагностирования заболевания появляются только через 20-30 лет после начала патологического процесса при гибели большей части дофаминергических нейронов и снижения уровня синтеза дофамина, ключевого нейротрансмиттера регуляции двигательной функции, в стриатуме на 70-80%. Исходя из этих данных, невозможность излечения болезни Паркинсона объясняют запоздалым диагностированием и началом лечения. Поэтому одним из важнейших приоритетов современной неврологии является разработка ранней – доклинической диагностики болезни Паркинсона.

Представления о патогенезе болезни Паркинсона были существенно расширены в последние пятнадцать лет. Оказалось, что при заболевании нейроны погибают в некоторых отделах мозга за пределами нигростриатной системы и в периферической нервной системе раньше, чем в самой нигростриатной системе [4, 5, 6, 7, 8]. Это объясняет появление немоторной симптоматики (нарушение обоняния, нарушение перистальтики кишечника и др.) гораздо раньше, чем характерных для болезни Паркинсона моторных симптомов. Широко распространённый нейродегенеративный процесс приводит к изменению функциональной и метаболической активности в мозге и в периферических органах [4, 5], что проявляется, в частности, в изменении состава биологических жидкостей – ликвора, крови и мочи. Поэтому в основе общепринятой методологии создания доклинической диагностики болезни Паркинсона лежит поиск у нелеченых больных на ранней клинической стадии изменений в составе биологических жидкостей, которые условно рассматриваются как биомаркеры доклинической стадии [1, 6, 9]. Однако у этой методологии есть два существенных недостатка. Во-первых, все биомаркеры только относительно специфичны, т.е. они могут проявиться не только при болезни Паркинсона, но и при ряде других заболеваниях со сходными метаболическими нарушениями. Во-вторых, пока нет серьезных научных оснований утверждать, что биомаркеры, обнаруженные у больных на ранней клинической стадии, также характерны и для доклинической стадии. Вероятно, в силу этих

причин указанная методология до сих пор не привела к созданию доклинической диагностики, рекомендованной для клинического применения [1].

Разработанная медицинская технология диагностики болезни Паркинсона на доклинической стадии, позволяет с помощью обратимого ингибитора тирозингидроксилазы и синтеза дофамина альфа-метил-пара-тирозин (α МРТ) кратковременно усиливать функциональную недостаточность nigrostriatной дофаминергической системы мозга до порогового уровня, при котором кратковременно проявится нарушение моторики на доклинической стадии развития заболевания, но не в норме. Важно подчеркнуть, что такого рода провокационные тесты никогда раньше не использовались для доклинической диагностики хронических неврологических или психических заболеваний, в то время как давно и широко применяется для доклинической диагностики хронических терапевтических заболеваний и для диагностирования скрытой недостаточности практически всех висцеральных систем – сердечно-сосудистой, эндокринной, дыхательной, пищеварительной и выделительной [10, 11, 12, 13].

В.1 Показания к использованию новой медицинской технологии

Показания к использованию новой медицинской технологии:

1. Наличие случаев болезни Паркинсона или паркинсонизма у близких родственников;
2. Появление неспецифических симптомов, характерных для болезни Паркинсона: нарушение сна, обоняния, терморегуляции, работы перистальтики кишечника и прочие.

В.2 Противопоказания к использованию новой медицинской технологии

Медицинские противопоказания:

1. Абсолютным противопоказанием является наличие психических нарушений, связанных с изменением уровня катехоламинов в мозге, например, шизофрения;
2. Абсолютным противопоказанием является нарушение работы симпатической и парасимпатической нервных систем.

Технические противопоказания:

1. Отсутствие оборудованного помещения, обеспечение проведение фармакологического провокационного теста, регистрацию появления нарушений двигательной активности;
2. Отсутствие обученного высокоспециализированного персонала (невролога), а также медсестер.

В.3 Материально-техническое обеспечение новой медицинской технологии

1. Врач невролог;
2. Процедурная медсестра;
3. Ампулы для внутривенного введения ингибитора синтеза дофамина α -МПП (в 2017 году будут начаты доклинические исследования для государственной регистрации с последующими клиническими испытаниями);
4. Таблетки L-ДОФА;
5. Процедурный кабинет;
6. Стерильные инструменты, оборудование для внутривенного введения;
7. Оборудование для измерения артериального давления;
8. Комната отдыха.

В.4 Описание новой медицинской технологии

Проведение фармакологического провокационного теста

1. Перед проведением фармакологического провокационного теста регистрируется артериальное давление и частота сердечных сокращений, которые должны быть в пределах нормы для соответствующего возраста.
2. Полный осмотр невролога, включая оценку двигательной функции.
3. Внутривенное введение α -МПП процедурной медсестрой с предварительной местной стерилизацией спиртовым раствором.
4. Повторный осмотр невролога через 4 часа, направленный на оценку нарушений двигательной активности: тремор, ригидность.
5. Пероральное введение L-ДОФА.
6. Повторный осмотр невролога через 2 часа, направленный на оценку нарушений двигательной активности: тремор, ригидность, которые должны пройти.
7. Повторная регистрация артериального давления и частоты сердечных сокращений, которые должны быть в пределах нормы для соответствующего возраста.

В.5 Возможные осложнения при использовании медицинской технологии и способы их устранения

Появление нарушений двигательной функции: тремор, ригидность, раньше чем через 4 часа после введения α -МПП. Способы устранения: стоит провести осмотр невролога сразу после появления нарушений двигательной функции с последующим пероральным введением L-ДОФА.

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ ИСТОЧНИКОВ

- [1] Угрюмов М.В. Разработка доклинической диагностики и превентивного лечения нейродегенеративных заболеваний // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. 2015. № 11. С. 4-14.
- [4] Braak H., Del Tredici K., Rüb U., de Vos R.A., Jansen Steur E.N., Braak E. Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease // *Neurobiol. Aging*. 2003. Vol. 24. N. 2. P. 197-211.
- [12] Gasco V., Beccuti G., Baldini C. Et al. Acylated ghrelin as a provocative test for the diagnosis of GH deficiency in adults // *Eur J Endocrinol*. 2012, 168(1):23-30.
- [8] Goldstein D.S. Dysautonomia in Parkinson disease // *Compr Physiol*. 2014. 4(2):805-826. 15
- [10] Goldstein D.S., Eisenhofer G., Kopin I.J. Sources and significance of plasma levels of catechols and their metabolites in humans // *Review. J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2003. V. 305. P. 800–811.
- [6] Haas B.R., Stewart T.H., Zhang J. Premotor biomarkers for Parkinson's disease - a promising direction of research // *Transl Neurodegener.* 2012, 1(1):11.
- [13] Hermann S., Pichler B., Kotzerke J. Preclinical research. Seal of approval translational medicine // *Nuklearmedizin*. 2013. 52(6):53-54.
- [9] Saunders J.A., Estes K.A., Kosloski L.M., Allen H.E., Dempsey K.M., Torres-Russotto D.R., Meza J.L., Santamaria P.M., Bertoni J.M., Murman D.L., Ali H.H., mStandaert D.G., Mosley R.L., Gendelman H.E. CD4+ regulatory and effector/memory T cell subsets profile motor dysfunction in Parkinson's disease // *J. Neuroimmune Pharmacol.* 2012. 7, 927–938. 16
- [5] Schiesling C., Kieper N., Seidel K., Krüger R. Familial Parkinson's disease--genetics, clinical phenotype and neuropathology in relation to the common sporadic form of the disease. Review // *Neuropathol Appl Neurobiol.* 2008, 34(3):255-271.
- [3] Selkoe D.J. Alzheimer's disease // *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2011. 3(7). pii: a004457.
- [2] Serri O., Chik C.L., Ur E., Ezzat S. Diagnosis and management of hyperprolactinemia // *CMAJ*. 2003, 169(6):575-581.
- [11] Witek P., Zgliczyński W., Zieliński G., Jeske W. The role of combined low-dose dexamethasone suppression test and desmopressin stimulation test in the diagnosis of persistent Cushing's disease. Case report // *Endokrynol Pol.* 2010, 61(3):312-317.