

УДК 616.858:612.83 + 578.69

**Нейродегенерация спинного мозга
в экспериментальной модели болезни Паркинсона,
индуцированной 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-
тетрагидропиридином**

В. А. Княрян

*Институт биохимии им. Г.Х. Бунятыана НАН РА
0014, Ереван, ул. П.Севака, 5/1*

Ключевые слова: болезнь Паркинсона, МФТП, нейротоксин, спинной мозг

Согласно современным представлениям, патологические процессы, характерные для болезни Паркинсона (БП), развиваются не только в головном, но и в спинном мозге. Однако, ввиду отсутствия прямых нейропатологических показателей, механизмы нейродегенерации спинного мозга долгое время не изучались. Экспериментальные модели БП, в основном, разрабатывались для изучения nigrostriatной системы. Модель, индуцируемая 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридином (МФТП), является наиболее распространенной и эффективной с точки зрения изучения механизмов нейродегенерации дофаминергических нейронов nigrostriatума, а также тестирования антипаркинсонических препаратов [5, 20, 21]. МФТП является мощным паркинсоническим нейротоксином *par excellence*. Его токсичность обусловлена тем, что активные ионы 1-метил-4-фенилпиридина (МФП⁺), образующиеся *in vivo* из протоксина МФТП, избирательно действуют на дофаминергические нейроны черной субстанции среднего мозга (substantia nigra pars compacta, SNpc), вызывая в них характерные для идиопатической формы БП биохимические и гистопатологические изменения, ведущие к нейродегенерации и гибели этих нейронов. Нашими исследованиями впервые была продемонстрирована возможность изучения нейродегенеративных сдвигов в спинном мозге в экспериментальной модели МФТП-индуцированной БП.

Экспериментальная модель МФТП-индуцированной БП

МФТП является промежуточным продуктом химического синтеза аналога меперидина, обладающего сильным обезболивающим действием [32]. МФТП также был идентифицирован как сильный нейротоксин, вызывающий симптомы паркинсонизма у потребителей наркотиков [8],

что позволило использовать его для создания животной модели БП [15, 16, 18]. У приматов, грызунов [3, 4, 9] и других млекопитающих [10, 28, 31] МФТП может вызвать синдром паркинсонизма, схожий с идиопатической формой БП [17]. МФТП избирательно воздействует на дофаминергические нейроны черной субстанции (A8 и A9 клетки), вызывая в них митохондриальную дисфункцию и оксидативный стресс, ведущие к апоптозу клеток [6, 16, 19].

Токсикокинетика протоксина МФТП – сложный многоступенчатый процесс [5]. Будучи липофильным соединением, МФТП проходит через гематоэнцефалический барьер в мозг и под действием моноаминоксидазы типа Б (МАО-Б) окисляется в нейротоксичный активный МФП⁺; эта реакция, главным образом, происходит в серотонинергических нейронах и астроглиальных клетках мозга [2, 29]. Затем ионы МФП⁺, связываясь с астроглиальными переносчиками моноаминов, высвобождаются во внеклеточное пространство, конкурентно связываются с транспортерами дофамина, транспортируются в дофаминергические нейроны черной субстанции и аккумулируются внутри митохондрий [12]. МФП⁺ обладает способностью подавлять активность комплекса I (НАД·Н₂-дегидрогеназа-убихинон-оксиодоредуктаза) в митохондриальной дыхательной цепи, вызывая оксидативный стресс – генерацию свободных радикалов, высвобождение кальция из митохондрий, активирование вредоносных реакций (окисление ДНК, РНК, углеводов, протеинов, инактивацию ключевых ферментов и др.), что ведет к разрушению клеток [15, 22].

Механизм токсичности МФТП в спинном мозге

Как уже отмечалось, экспериментальная модель МФТП-индуцированной БП применяется главным образом для изучения нигростриатной системы и некоторых отделов головного мозга [11]. Имеются данные о повреждающем действии МФТП и на структуры спинного мозга. Однако патологические процессы в спинном мозге с использованием этой модели не изучались, ввиду отсутствия доказательства прямого нейротоксического воздействия МФТП на спинной мозг. Является ли спинной мозг прямой мишенью для нейротоксина, каковы ключевые сигнальные механизмы, ведущие к повреждению и гибели клеток спинного мозга? Ответы на эти вопросы были получены в ходе фундаментальных исследований, проведенных нами в Медицинском университете Южной Каролины в лаборатории под руководством Banik N.L. Существенной частью этих исследований, по праву, можно считать демонстрацию механизма превращения МФТП в активный нейротоксичный МФП⁺ в спинном мозге мышей линии C57BL/6N. Именно эта линия отличается повышенной степенью чувствительности к нейротоксину. Это, в свою очередь, явилось научным обоснованием для изучения патологических изменений в спинном мозге *in*

vivo на экспериментальной модели МФТП-индуцированной БП [13, 23, 27]. Применяв метод высокоэффективной жидкостной хроматографии, впервые было показано, что после введения МФТП мышам линии C57BL/6N МФТП⁺ обнаруживается не только в стриатуме, но и в спинном мозге [23]. Энзиматическое превращение МФТП в МФП⁺ в спинном мозге так же, как и в головном, катализируется MAO-B, активность которой в условиях *in vivo* и *in vitro* подавляется ее специфическим ингибитором, L-депренилом. Наличие в препаратах спинного мозга положительной иммуореактивности (ИМР) на MAO-B и дофаминовый транспортер (ДАТ), а также высокоаффинный захват ³H-MPP⁺ указывали на то, что спинной мозг является экстранигральной мишенью для нейротоксина МФТП [23]. Несмотря на то, что уровень образующегося МФП⁺ в спинном мозге в 3 раза ниже, чем в головном мозге (стриатум), этого количества было достаточно, чтобы вызвать гистопатологические изменения в спинном мозге мышей линии C57BL/6N.

Показатели нейродегенерации спинного мозга

Для изучения спинного мозга в экспериментальной модели БП мышам линии C57BL/6N вводили МФТП (25 мг/кг, в/б) в течение 5 последовательных дней; животных декапитировали на 7-й день после последней инъекции МФТП [11, 27]. Контрольной группе мышей вводили физиологический раствор. Наличие признаков нейродегенерации оценивали по результатам двойного иммуофлуоресцентного окрашивания срезов (толщина 5 мкм) спинного мозга с использованием антител к маркеру нейрональных ядер и нейронов – NeuN (*anti-neuronal nuclei*) в сочетании с TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) recombinant-mediated dUTP Nick End Labeling) – маркером фрагментации ДНК и гибели клеток по описанному методу [24, 27]. Участки колокализации положительной (+) ИМР на маркеры, отмеченные как TUNEL⁺ и NeuN⁺, указывали на поврежденные нейроны в спинном мозге. Аксональную дегенерацию и активацию нейроглии определяли по результатам иммуофлуоресцентного окрашивания срезов с использованием антител к маркерам дефосфорилированного белка нейрофиламента – deNFP (*anti-dephosphorylated neuronal neurofilament protein*) и глиального фибриллярного кислого белка астроцитов – GFAP (*anti-glia fibrillary acidic protein*). В качестве вторичных использовали IgG антитела, конъюгированные с флуоресцентными красителями FITC или Texas Red, флуоресцирующие зеленым или красным светом соответственно. Исследование препаратов под иммуофлуоресцентным микроскопом показало, что МФТП вызывает нейродегенерацию в спинном мозге C57BL/6N мышей [23, 27]. На представленных микроснимках видно, что в контроле высвечиваются NeuN⁺ (зеленый) интактные ядра маленьких сенсорных нейронов дорсального рога и отно-

сительно крупные ядра мотонейронов вентрального рога, при отсутствии ИМР на TUNEL (рисунок, А). В спинном мозге МФТП-инъектированных мышей отчетливо высвечиваются нейроны с ИМР на TUNEL⁺ (красный). Здесь же участки колокализации ИМР на TUNEL⁺ и NeuN⁺ (желтый) указывают на повреждение нейронов дорсального и вентрального рога спинного мозга, вызванное действием нейротоксина. Исследование аксонов, составляющих белое вещество спинного мозга, показало достаточно высокий уровень ИМР на deNFP⁺ у МФТП-инъектированных мышей, что свидетельствует о дефосфорилировании белка нейрофиламента и развитии аксональной дегенерации под действием нейротоксина, тогда как в контроле эти показатели отсутствуют (рисунок, Б). Немаловажным следствием действия МФТП является активация нейровоспалительных процессов в спинном мозге; при этом отмечается повышение ИМР на фактор астроглиоза GFAP⁺ (рисунок, В), микроглиоза (Iba-1, Ionized calcium-binding adapter molecule 1) и инфильтратов макрофагов (ED2, macrophage-associated antigen) [27]. В дополнение, проведенный нами Western blot анализ белковых препаратов, полученных из тканей спинного мозга, показал, что МФТП вызывает повышение уровня медиаторов воспалительных реакций – циклооксигеназы-2 (Cox-2), каспазы-1, индуцибельной NO синтазы (NOS2) [27]. Было также показано, что ключевым механизмом нейротоксического действия МФТП в спинном мозге является Ca²⁺-зависимая активация внутриклеточных протеаз кальпаина и каспазы-3; в результате происходит протеолитическое расщепление их субстратов, белков цитоскелета [27].

Биохимические и гистопатологические изменения, вызванные МФТП в спинном мозге C57BL/6N мышей, во многом схожи с описанными ранее явлениями нейродегенерации в спинном мозге крыс линии Lewis в экспериментальной модели ротенон-индуцированной БП [1, 24]. Эти результаты указывают на то, что, помимо дофаминергических нейронов нигростриатума, нейроны и, в частности, мотонейроны спинного мозга также являются избирательными мишенями для паркинсонических токсинов МФТП и ротенона. Это подтвердилось нашими экспериментами *in vitro*, которые показали, что введение указанных нейротоксинов в культуру дифференцированных VSC 4.1 (ventral spinal cells) мотонейронов спинного мозга вызывает апоптоз этих клеток [25]. Оба вещества оказывают токсический эффект и в культуре дифференцированных SH-SY5Y клеток нейробластомы [14]. Стереологические подсчеты, проведенные другой группой авторов, показали, что под действием МФТП в спинном мозге мышей теряется более 30% мотонейронов, а в оставшихся поврежденных нейронах обнаруживаются агрегаты α -синуклеина [30].

Нейродегенеративные процессы в спинном мозге подтверждаются нашими результатами, полученными при изучении *postmortem* образцов шейного и грудного отделов спинного мозга лиц с диагнозом БП [26].

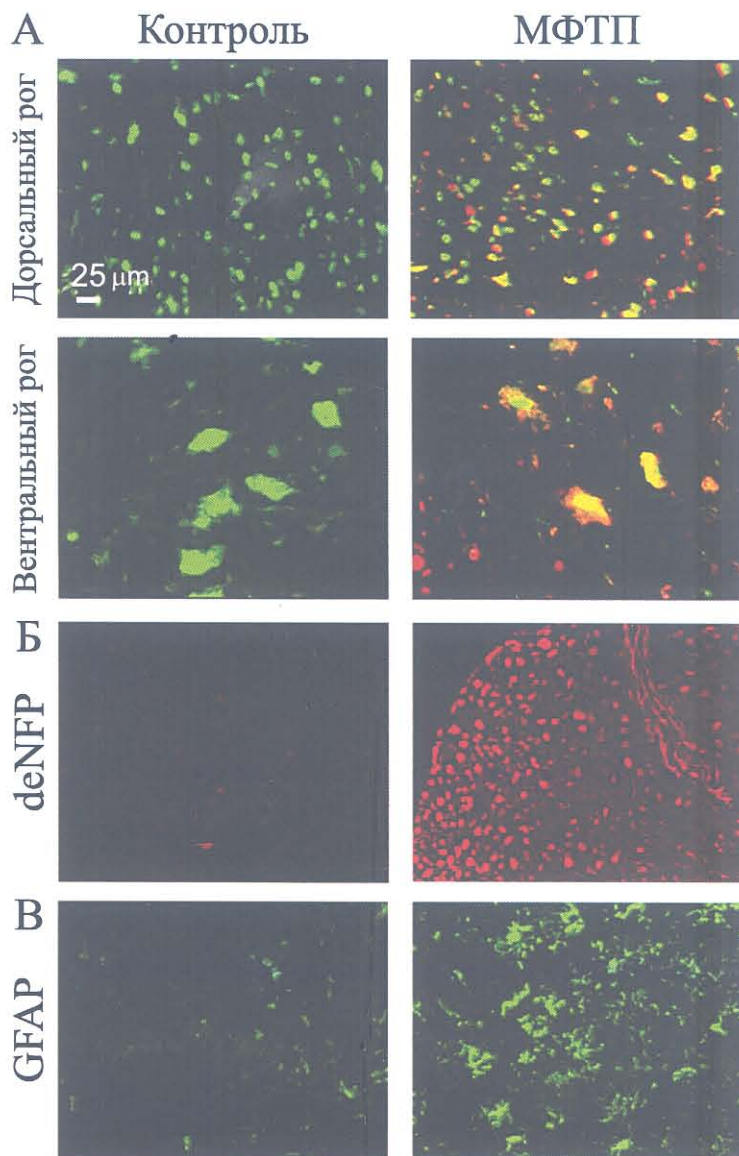


Рисунок. Иммунофлуоресцентные микроснимки (200х) срезов спинного мозга контрольных и МФТП-инъектированных C57BL/6N мышей [27]:
 А – колокализация TUNEL⁺ и NeuN⁺ (желтый) при дегенерации нейронов;
 Б – ИМР на deNFP⁺ (красный) при дегенерации аксонов;
 В – ИМР на GFAP⁺ (зеленый) при астроглиозе у МФТП-мышей;
 в контроле эти показатели отсутствуют

Иммунореактивные участки с колокализацией TUNEL⁺-NeuN⁺ и TUNEL⁺-ChAT⁺ указывали на пораженные болезнью нейроны дорсального рога и мотонейроны вентрального рога соответственно. Наличие ИМР на deNFP⁺ в области белого вещества и выраженное уменьшение уровня белка нейрофиламентов (NF-L) указывали на процессы аксональной дегенерации. Активация медиаторов нейровоспаления в спинном мозге при БП подтвердилась повышенной ИМР на GFAP⁺ (астроглиоз), Iba-1⁺ (микроглиоз), CD3⁺ (инфильтрация Т клеток), а также ростом экспрессии Cox-2 [26]. Эти результаты согласуются с данными патологоанатомических исследований Del Tredici and Braak [7], также обнаруживших нейродегенеративные изменения в спинном мозге лиц с БП.

Из вышеизложенного следует, что при МФТП-индуцированной БП процессы нейродегенерации затрагивают не только головной, но и спинной мозг. Нами впервые было продемонстрировано, что в спинном мозге C57BL/6N мышей действует механизм метаболического превращения МФТП в активный нейротоксин МФП⁺, который разрушительно действует на спинной мозг. Дегенерация охватывает нейроны и мотонейроны серого вещества, а также аксоны белого вещества. В отсутствие нейропротекторов, бесконтрольная активация внутриклеточных сигнальных реакций под действием нейротоксина может привести к нарушению морфофункциональной целостности нейронов и их разрушению. В связи с этим выявленные нами ключевые механизмы, лежащие в основе процессов нейродегенерации спинного мозга, могут рассматриваться в качестве мишеней нейропротекторных средств для защиты нейронов как нигростриатной системы головного мозга, так и спинного мозга.

Поступила 19.10.16

Ողնուղեղի նեյրոդեգեներացիան 1-մեթիլ-4-ֆենիլ-1,2,3,6-տետրահիդրոպիրիդինով առաջացրած փորձարարական Պարկինսոնի հիվանդության ժամանակ

Վ. Հ. Քնարյան

Պարկինսոնի հիվանդության (ՊՀ) զարգացման արդի պատկերացման համաձայն ողնուղեղը նույնպես ներգրավվում է պաթոլոգիական պրոցեսների մեջ: Սակայն, ուղղակի ցուցանիշների բացակայության պատճառով, ողնուղեղի նեյրոդեգեներացիայի մեխանիզմները համեմատաբար քիչ են ուսումնասիրվել: Բացի այդ, մշակված փորձարարական մոդելները կիրառվել են հիմնականում գլխուղեղի սև մարմնի (*substantia nigra pars compacta*) և գոլավոր մարմնի (*striatum*) ուսումնասիրության համար: Մեր հետազոտությունները ցույց են տվել, որ 1-

մեթիլ-4-ֆենիլ-1,2,3,6-տետրահիդրոպիրիդին (ՄՖՏՊ) նեյրոտոքսիկ առաջացրած ՊՀ-ի փորձարարական մոդելը կարելի է արդյունավետ կիրառել նաև ողնուղեղի ուսումնասիրության նպատակով: C57BL/6N զծային մկներին ՄՖՏՊ ներարկելուց հետո առաջացած ՄՖՊ⁺ ակտիվ նեյրոտոքսինը կործանարար է ազդում ողնուղեղի նեյրոնների վրա: Նեյրոդեգեներացիայի երևույթները դիտվում են ողնուղեղի առջևի և հետին եղջուրների նեյրոններում և մոտոնեյրոններում: Ողնուղեղի հյուսվածքներում ակտիվանում են նեյրոբոքոքային պրոցեսները, որոնք արտահայտվում են աստրոգլիոզի, միկրոգլիոզի և մակրոֆագերի ինֆիլտրացիայի ձևով, զգալիորեն ավելանում է բոքոքային գործոնների էքսպրեսիան: Վնասվում են նաև ողնուղեղի սպիտակ նյութի բաղկացուցիչ աքսոնները: Այս տվյալները վկայում են, որ ՄՖՏՊ-ով առաջացրած փորձարարական ՊՀ-ի ժամանակ նեյրոդեգեներացիայի պրոցեսները ընթանում են թե գլխուղեղում, և թե ողնուղեղում: Այս պրոցեսների հանգուցային մեխանիզմները կարող են լրացուցիչ թիրախներ հանդիսանալ գլխուղեղի և ողնուղեղի նեյրոնները դեգեներացիայից պաշտպանող նյարդապաշտպանիչ դեղամիջոցների համար:

Spinal cord neurodegeneration in experimental Parkinson's disease induced by 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine

V.H. Knaryan

According to the current concept, spinal cord is also involved in the pathophysiology of Parkinson's disease (PD). Unlike the brain, the mechanisms of spinal cord neurodegeneration have been less investigated, as there were not been enough direct indications for that. Besides, the existing experimental models have been explored mainly for studying nigrostriatal pathway in the brain (*substantia nigra pars compacta, striatum*). Our investigations for the first time have demonstrated that the experimental model of PD induced by a neurotoxin 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) can also be used in spinal cord studies. The MPTP neurotoxicity is mediated via *in vivo* generated metabolite – active neurotoxic MPP⁺ ions, which selectively affect nigrostriatal dopaminergic neurons, inducing neurodegeneration. It has been shown that after administration in C57BL/6N mice MPTP is converted into MPP⁺ in the spinal cord as well, harmfully affecting spinal neurons. Neurodegenerative alterations have been observed in dorsal neurons and ventral motoneurons. Generated in the spinal cord, MPP⁺ induce a cascade of damaging mechanisms there, including activation of neuroinflammatory reactions such as astrogliosis,

microgliosis and infiltration of macrophages (increased immunoreactivity of GFAP, Iba-1, ED-2, respectively), as well as enhanced expression of inflammatory mediators (Cox-2, caspase-1, NOS2). There was discernible axonal degeneration in the white matter, detected by deNFP immunoreactivity.

Thus, in MPTP-induced experimental PD in C57BL/6N mice neurodegenerative processes occur both in the brain and spinal cord. The key mechanisms of these processes can be additional targets for neuroprotective agents, with protective ability for the brain and spinal cord neurons.

Литература

1. *Кнарян В.А.* Влияние ротенона на нейрональные клетки спинного мозга при экспериментальном паркинсонизме у крыс линии Lewis. Мед. наука Армении НАН РА, 2010, т. L., 2, с. 51-61.
2. *Brooks W.J., Jarvis M.F., Wagner G.C.* Astrocytes as a primary locus for the conversion MPTP into MPP⁺. J. Neural. Transm., 1989, 76(1), p. 1-12.
3. *Burns R.S., Chiueh C.C., Markey S.P. et al.* A primate model of parkinsonism: selective destruction of dopaminergic neurons in the pars compacta of the substantia nigra by N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1983, 80, p. 4546-4550.
4. *Chiueh C.C., Markey S.P., Burns R.S. et al.* Neurochemical and behavioral effects of systemic and intranigral administration of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine in the rat. Eur. J. Pharmacol., 1984, 100, p. 189-194.
5. *Dauer W., Przedborski S.* Parkinson's disease: mechanisms and models. Neuron, 2003, 39, p. 889-909.
6. *Davis G.C., Williams A.C., Markey S.P. et al.* Chronic Parkinsonism secondary to intravenous injection of meperidine analogues. Psychiatry Res., 1979, 1, p. 249-254.
7. *Del Tredici K., Braak H.* Spinal cord lesions in sporadic Parkinson's disease. Acta Neuropathol., 2012, 124, p. 643-664.
8. *Fahn S.* Book Review - The Case of the Frozen Addicts: How the Solution of an Extraordinary Medical Mystery Spawned a Revolution in the Understanding and Treatment of Parkinson's Disease. The New England Journal of Medicine, 1996, 335, 26, p. 2002-2003.
9. *Hallman H., Olson L., Jonsson G.* Neurotoxicity of the meperidine analogue 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine on brain catecholamine neurons in the mouse. Eur. J. Pharmacol., 1984, 97, p. 133-136.
10. *Hammock B.D., Beale A.M., Work T. et al.* A sheep model for MPTP induced Parkinson-like symptoms. Life Sci., 1989, 45, p. 1601-1608.
11. *Jackson-Lewis V., Przedborski S.* Protocol for the MPTP mouse model of Parkinson's disease. Nat. Protoc., 2007, 2(1), p. 141-151.
12. *Javitch J.A., Snyder S.H.* Uptake of MPP⁺ by dopamine neurons explains selectivity of parkinsonism-inducing neurotoxin, MPTP. Eur. J. Pharmacol., 1984, 106(2), p. 455-456.
13. *Knaryan V.H., Samantaray S., Le Gal C., Ray S.K., Banik N.L.* Tracking extranigral degeneration in animal models of Parkinsonism: Quest for effective therapeutic strategies. J. Neurochem., 2011, 118, p. 326-338.
14. *Knaryan V.H., Samantaray S., Park S. et al.* SNJ-1945, a calpain inhibitor, protects SH-SY5Y cells against MPP⁺ and rotenone. J. Neurochem., 2014, 130(2), p. 280-290.
15. *Kopin I.J.* MPTP: an industrial chemical and contaminant of illicit narcotics stimulates a new era in research on Parkinson's disease. Environmental Health Perspectives, 1987, 75, p. 45-51.
16. *Langston J.W., Ballard P., Tetrud J.W., Irwin I.* Chronic Parkinsonism in humans due to a product of meperidine-analog synthesis. Science, 1983, 219, p. 979-980.

17. Langston J.W., Irwin I. MPTP: current concepts and controversies. Clin. Neuropharmacol., 1986, 9, p. 485–507.
18. Markey S.P., Johannessen J.N., Chiueh C.C. et al. Intraneuronal generation of a pyridinium metabolite may cause drug-induced parkinsonism. Nature, 1984, 311(5985), p. 464–467.
19. Mizuno Y., Ohta S., Tanaka M. et al. Deficiencies in complex I subunits of the respiratory chain in Parkinson's disease. Biochem. Biophys. Res. Commun., 1989, 163, p. 1450–1455.
20. Przedborski S., Jackson-Lewis V., Naini A. B. et al. The parkinsonian toxin 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP): a technical review of its utility and safety. J. Neurochem., 2001, 76, p. 1265–1274.
21. Przedborski S., Vila M. The 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine mouse model: a tool to explore the pathogenesis of Parkinson's disease. Ann. N. Y. Acad. Sci., 2003, 991, p. 189–198.
22. Ramsay R.R., Singer T.P. Energy-dependent uptake of N-methyl-4-phenyl pyridinium, the neurotoxic metabolite of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine, by mitochondria. J. Biol. Chem., 1986, 261, p. 7585–7587.
23. Samantaray S., Knaryan V.H., Butler J.T., Ray S.K., Banik N.L. Spinal cord degeneration in C57BL/6N mice following induction of experimental parkinsonism with 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. J. Neurochem., 2008, 104, p. 1309–1320.
24. Samantaray S., Knaryan V.H., Guyton M.K. et al. The parkinsonian neurotoxin rotenone activates calpain and caspase-3 leading to motoneuron degeneration in spinal cord of Lewis rats. Neuroscience, 2007, 146, p. 741–755.
25. Samantaray S., Knaryan V.H., Le Gal C., Ray S.K., Banik N.L. Calpain inhibition protected spinal cord motoneurons against 1-methyl-4-phenylpyridinium ion and rotenone. Neuroscience, 2011, 192, p. 263–274.
26. Samantaray S., Knaryan V.H., Shields D.C., Banik N.L. Critical role of calpain in spinal cord degeneration in Parkinson's disease. J. Neurochem., 2013, 127(6), p. 880–890.
27. Samantaray S., Knaryan V.H., Shields D.C., Cox A.A., Haque A., Banik N.L. Inhibition of calpain activation protects MPTP-induced nigral and spinal cord neurodegeneration, reduces inflammation, and improves gait dynamics in mice. Mol. Neurobiol., 2015, 52(2), p. 1054–1066.
28. Schneider J.S., Markham C.H. Neurotoxic effects of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) in the cat. Tyrosine hydroxylase immunohistochemistry. Brain Res., 1986, 373, p. 258–267.
29. Shen R.S., Abell C.W., Gessner W., Brossi A. Serotonergic conversion of MPTP and dopaminergic accumulation of MPP+. FEBS Lett., 1985, 189(2), p. 225–230.
30. Vivacqua G., Biagioni F., Yu S. et al. Loss of spinal motor neurons and alteration of alpha-synuclein immunostaining in MPTP induced Parkinsonism in mice. J. Chem. Neuroanat., 2012, 44, p. 76–85.
31. Wilson J.S., Turner B.H., Morrow G.D., Hartman P.J. MPTP produces a mosaic-like pattern of terminal degeneration in the caudate nucleus of dog. Brain Res., 1987, 423, p. 329–332.
32. Ziering A., Berger L., Heinemann S.D., Lee J. Piperidine derivatives; 4-arylpiperidines. J. Org. Chem., 1947, 12, p. 894–903.