

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации  
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки  
ИНСТИТУТ БИОЛОГИИ РАЗВИТИЯ ИМ. Н.К. КОЛЬЦОВА РАН  
(ИБР РАН)

УДК 577.25

Рег. № ГЗ 0108-2018-0014

Рег. № НИОКТР АААА-А18-118041690143-2

УТВЕРЖДАЮ  
Директор ИБР РАН  
д-р биол. наук, чл.-корр. РАН  
\_\_\_\_\_ А.В. Васильев  
«10» декабря 2018 г.



ОТЧЕТ

О НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЙ РАБОТЕ

ИЗУЧЕНИЕ МОЛЕКУЛЯРНЫХ МЕХАНИЗМОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКИХ ПРОЯВЛЕНИЙ  
БОЛЕЗНИ ПАРКИНСОНА КАК ВАЖНАЯ ЗАДАЧА ТРАНСЛЯЦИОННОЙ МЕДИЦИНЫ  
ДЛЯ СОЗДАНИЯ РАННЕЙ ДИАГНОСТИКИ И ПРЕВЕНТИВНОЙ ТЕРАПИИ

по Программе Президиума РАН № 42  
«Фундаментальные исследования для биомедицинских технологий»  
(заключительный отчет)

Руководитель НИР,  
главный научн. сотр.,  
д-р биол. наук, проф.,  
акад. РАН



М.В. Угрюмов

6.12.2018

подпись, дата

Москва 2018

## СПИСОК ИСПОЛНИТЕЛЕЙ

Руководитель, академик РАН

  
28.11.18

М.В. Угрюмов

подпись, дата

Исполнители:

Старший научный сотрудник, кандидат  
биологических наук

  
28.11.18

Т.С. Пронина

подпись, дата

Научный сотрудник,  
биологических наук

кандидат

  
28.11.18

А.Р. Ким

подпись, дата

Инженер-исследователь

  
28.11.2018

С.А. Сурков

подпись, дата

Младший научный сотрудник, кандидат  
биологических наук

  
28.11.18

Ю.О. Никишина

подпись, дата

Младший научный сотрудник

  
28.11.18

В.В. Сафандеев

подпись, дата

Младший научный сотрудник

  
28.11.2018

А. Р. Муртазина

подпись, дата

Инженер-исследователь

  
28.11.2018

К.М. Рябинкина

подпись, дата

Нормоконтроль, ведущий научный  
сотрудник, кандидат биологических наук

  
28.11.2018

Е.Б. Абрамова

подпись, дата

28.11.2018

## РЕФЕРАТ

Отчет 23 стр., 8 рис., 1 табл., 17 источников, публикаций по теме – 3.

Ключевые слова: БОЛЕЗНЬ ПАРКИНСОНА, НЕЙРОДЕГЕНЕРАЦИЯ, НЕМОТОРНЫЕ ПРОЯВЛЕНИЯ, ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ МОДЕЛИ.

Целью работы является поиск биохимических, физиологических и морфологических маркеров доклинической стадии болезни Паркинсона при исследовании на нейротоксических моделях данного заболевания у мышей *in vivo*. Объектом исследования являются ткани глаз, а также веки и слезная жидкость мышей. Задачи проекта на данном этапе – оценить и сравнить характер метаболических и функциональных изменений в глазах на моделях доклинической и ранней клинической стадии болезни Паркинсона. В работе использованы методы количественной оценки уровня биогенных аминов и экспрессии ферментов их синтеза, такие как ВЭЖХ, Вестерн блот и ПЦР в реальном времени, а также измерение уровня внутриглазного давления и поведенческий тест. Полученные данные позволяют сделать вывод о перспективности использования анализа изменений биохимического состава слезной жидкости, а также внутриглазного давления как биомаркеров для разработки ранней (досимптомной) диагностики болезни Паркинсона.

## СОДЕРЖАНИЕ

|                                                                                                                                                   |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| СОКРАЩЕНИЯ И ОБОЗНАЧЕНИЯ.....                                                                                                                     | 5  |
| 1. ВВЕДЕНИЕ.....                                                                                                                                  | 6  |
| 2 ЦЕЛИ И ЗАДАЧИ.....                                                                                                                              | 8  |
| 3 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....                                                                                                                         | 9  |
| 3.1 Моделирование доклинической и ранней клинической стадий болезни Паркинсона.....                                                               | 9  |
| 3.2 Измерение внутриглазного давления у мышей.....                                                                                                | 9  |
| 3.3 Сбор биологического материала у мышей.....                                                                                                    | 9  |
| 3.4 Количественный анализ моноаминов методом ВЭЖХ с электрохимической детекцией.....                                                              | 10 |
| 3.5 Анализ содержания белка тирозингидроксилазы методом вестерн-блота.....                                                                        | 10 |
| 3.6 Анализ экспрессии мРНК тирозингидроксилазы методом ПЦР в реальном времени.....                                                                | 11 |
| 3.7 Биохимический анализ проб слезы.....                                                                                                          | 11 |
| 3.8 Статистический анализ.....                                                                                                                    | 11 |
| 4 РЕЗУЛЬТАТЫ.....                                                                                                                                 | 12 |
| 4.1 Воспроизведение моделей болезни Паркинсона.....                                                                                               | 12 |
| 4.2 Концентрация моноаминов в тканях целого глаза и век мышей.....                                                                                | 13 |
| 4.3 Концентрация катехоламинов в сетчатке и иридоцилиарном теле.....                                                                              | 14 |
| 4.4 Уровень белка тирозингидроксилазы в сетчатке.....                                                                                             | 15 |
| 4.5 Уровень экспрессии мРНК тирозингидроксилазы в сетчатке.....                                                                                   | 16 |
| 4.6 Концентрация норадреналина и альфа-2-макроглобулина в слезе мышей.....                                                                        | 16 |
| 4.7 Внутриглазное давление у мышей на моделях болезни Паркинсона.....                                                                             | 17 |
| 5 ОБСУЖДЕНИЕ.....                                                                                                                                 | 18 |
| 5.1 Патология зрительного анализатора как системное проявление нейродегенерации на моделях болезни Паркинсона.....                                | 18 |
| 5.2 Характеристика патологических изменений в отдельных структурах глаза – сетчатке и иридоцилиарном комплексе на моделях болезни Паркинсона..... | 18 |
| 5.3 Функциональные нарушения глаза как периферические биомаркеры для ранней диагностики болезни Паркинсона.....                                   | 19 |
| ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....                                                                                                                                   | 20 |
| СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ.....                                                                                                             | 21 |
| ПУБЛИКАЦИИ ПО ТЕМЕ ГОСЗАДАНИЯ ЗА 2018 ГОД.....                                                                                                    | 23 |

## СОКРАЩЕНИЯ И ОБОЗНАЧЕНИЯ

5-ГТФ – 5-гидрокситриптофан;

L-ДОФА – L-диоксифенилаланин;

$\alpha$ 2МГ – альфа-2-макроглобулин;

БП – болезнь Паркинсона;

ВГД – внутриглазное давление;

ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография;

ДОФУК – диоксифенилуксусная кислота;

МФТП – 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридин.

## 1. ВВЕДЕНИЕ

Болезнь Паркинсона (БП) является одним из наиболее распространенных в мире нейродегенеративных заболеваний, уступая по количеству больных только болезни Альцгеймера. С момента первого описания она известна, прежде всего, характерными двигательными нарушениями – ригидностью мышц, тремором и неустойчивостью позы, которые являются следствием тяжелой степени дегенерации нейронов nigrostriatalной системы головного мозга. Следствием позднего, из-за протекающих компенсаторных процессов, проявления выраженных двигательных нарушений при БП является низкая эффективность фармакологической терапии этого заболевания. Фактически, терапия БП на клинической стадии сводится только к уменьшению симптоматических проявлений для улучшения качества жизни, а на поздних стадиях или в запущенных случаях – к оказанию паллиативной помощи. Эффективных способов остановки или обращения патологических процессов вспять и полного излечения БП на данный момент не существует [1].

Помимо двигательных нарушений, связанных с патологией nigrostriatalной системы, при БП наблюдаются также многочисленные системные проявления, связанные с нейродегенерацией в периферических системах и органах. Наиболее изученными немоторными проявлениями БП на данный момент являются нарушения функции перистальтики, обоняния и сна [2-4]. В свою очередь, ряд более специфических и локальных дисфункций, таких как поражение сетчатки, мочеполовой системы, изменение болевой чувствительности, повышение усталости и т.д., охарактеризован пока достаточно слабо [5, 6]. Некоторые авторы предпринимают различные попытки классификации данных признаков, например, по физиологическим проявлениям [7, 8] или по типу нервной системы, затронутой дегенеративными процессами [7].

Однако помимо задачи по наиболее полному описанию, характеристике и классификации симптомов БП, существует параллельная и не менее важная задача по быстрому и надежному выявлению этой болезни на ранних стадиях. Сам факт наличия большого системного спектра проявлений БП дает поле для выявления отдельных симптомов или их групп, проявляющихся не только *помимо*, но и *до* возникновения моторных симптомов. Это даст возможность начинать терапию, пока nigrostriatalная система еще не достигла стадий серьезной дегенерации и затормозить развитие заболевания до моторных проявлений. Помимо надежности и специфичности подобных диагностических маркеров, они также должны отвечать критериям простоты и доступности для выявления, если рассматривать их в перспективе применения для широкой диагностики и диспансеризации населения [1].

В данном проекте нами уделено особое внимание обнаружению возможных нарушений в тканях, структурах и функции зрительного анализатора, поскольку ранее у больных были описаны клинические неоторные проявления БП, касающиеся функции глаз, век и слезного аппарата [9]. В отличие от головного мозга или внутренних органов, доступ к которым требует хирургического вмешательства, глаза представляют собой периферический орган, доступный как для функционального, так и биохимического (исследование слезной жидкости) анализа.

Можно предположить, что хотя бы часть из изменений функций глаза и век, обнаруженных у больных на клинической стадии БП, также характерны для больных на доклинической стадии до нарушения моторики, что позволило бы использовать эти изменения в качестве диагностических маркеров доклинической стадии заболевания. Это предположение может быть проверено только на экспериментальной модели БП на доклинической стадии, поскольку идентифицировать больных на этой стадии пока не удается. При этом наряду с моделированием БП на доклинической стадии, необходимо моделировать БП и на клинической стадии этого заболевания, чтобы быть уверенным в том, что используемая модель корректно воспроизводит, по крайней мере, биохимические и физиологические изменения в глазу и в веках, обнаруженные у больных [1].

В дальнейшем изменения, обнаруженные на моделях БП, могут быть использованы для сравнительного анализа с данными, полученными при изучении проб, взятых у больных людей. Это позволит не только выявлять новые биомаркеры, но и выделять среди них наиболее специфичные для доклинической стадии и потому наиболее пригодные для разработки ранней диагностики БП [10, 11].

## 2 ЦЕЛИ И ЗАДАЧИ

Целью данного проекта является поиск маркеров для ранней диагностики БП в виде изменения иннервации, функциональной и метаболической активности периферических органов на разработанных в нашей лаборатории нейротоксических моделях доклинической и ранней клинической стадий БП.

Задачами этапа 1 проекта на 2018 год были:

1. Воспроизведение нейротоксических МФТП-моделей доклинической и ранней клинической стадий БП на мышах;
2. Общая оценка вовлеченности зрительного анализатора в патогенез БП по изменению концентрации моноаминов в целом глазу и веках на моделях БП;
3. Характеристика состояния катехоламинергических систем в сетчатке и иридоцилиарном теле по изменению концентрации моноаминов в этих структурах;
4. Оценка содержания белка и экспрессии гена тирозингидроксилазы в амакриновых клетках сетчатки на моделях БП;
5. Анализ функционального состояния глаза на моделях БП по изменению концентрации в слезе норадреналина и маркера воспаления –  $\alpha$ -2-макроглобулина, а также по изменению внутриглазного давления.



### 3 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

#### 3.1 Моделирование доклинической и ранней клинической стадий болезни Паркинсона

В работе использовали самцов мышей линии C57Bl/6 в возрасте 2-2.5 месяцев и массой 22-26 г, полученных из питомника «Пушино». Животных содержали в стандартных условиях вивария ( $22 \pm 1^\circ\text{C}$ , свет с 8.00 часов до 20.00 часов) со свободным доступом к пище и воде. Модель БП на доклинической стадии воспроизводили двукратным подкожным введением 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридина (МФТП) (Sigma, США) в разовой дозе 8 мг/кг, модель БП на ранней клинической стадии – четырехкратным подкожным введением МФТП в разовой дозе 10 мг/кг. В обоих случаях интервал между инъекциями составлял 2 часа [12]. Животным контрольных групп вводили 0.9% NaCl по аналогичным схемам.

Перед введением МФТП или NaCl мышей оценивали по показателю пройденного пути в тесте «открытое поле» с помощью установки для анализа поведения животных PhenoMaster (TSE Systems, Германия). Через 2 недели после введения МФТП или NaCl проводилось повторное измерение моторного поведения животных.

#### 3.2 Измерение внутриглазного давления у мышей

Через 2 недели после введения МФТП с помощью автоматического тонометра Tonovet (Icare, Финляндия) у мышей измеряли 3 раза внутриглазное давление (ВГД) и брали среднее значение.

#### 3.3 Сбор биологического материала у мышей

После измерения ВГД осуществляли сбор материала для биохимического анализа: у анестезированных изофлураном животных собирали слезную жидкость с помощью фильтровальной бумаги, далее декапитировали, выделяли веки и глаза, удаляя хрусталик и стекловидное тело. В другой серии экспериментов выделенный глаз препарировали, выделяя на холодоэлементе под лупой сетчатку и радужку с цилиарным телом. Собранный биологический материал взвешивали, замораживали в жидком азоте и хранили при  $-70^\circ\text{C}$  до биохимического анализа.

Для оценки степени снижения уровня дофамина в нигростриатной системе экспериментальных животных из мозга декапитированных мышей выделяли дорсальный стриатум согласно ранее описанной методике [12]. Пробы стриатума взвешивали, замораживали в жидком азоте и хранили при  $-70^\circ\text{C}$  до биохимического анализа.

### 3.4 Количественный анализ моноаминов методом ВЭЖХ с электрохимической детекцией

Все количественные измерения содержания биогенных аминов в исследуемых тканях проводили методом обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с электрохимической детекцией.

Пробы гомогенизировали с помощью ультразвукового гомогенизатора Labsonic M (Sartorius, Франция) в 0.1 N HClO<sub>4</sub> (Sigma, США), содержащих внутренний стандарт 3,4-дигидроксibenзиламин (ДГБА, Sigma), после чего центрифугировали 20 мин при 2000g.

ВЭЖХ-разделение осуществляли на обращённо-фазной колонке ReproSil-Pur, ODS-3, 4x100 мм с диаметром пор 3 мкм (Dr. Majsch GMBH, Германия) при температуре +30°C и скорости подвижной фазы 1.2 мл/мин, поддерживаемой жидкостным хроматографом LC-20ADsp (Shimadzu, Япония). В состав мобильной фазы входили: 0.1 М цитратно-фосфатный буфер, 0.3 mM октансульфат натрия, 0.1 mM ЭДТА и 9% ацетонитрил (все реактивы – Sigma), pH 2.5. Электрохимический детектор Decade II (Antec Leyden, Нидерланды) был укомплектован стеклоуглеродным рабочим электродом (+0.85 V) и Ag/AgCl электродом сравнения. Пики биогенных аминов и метаболитов идентифицировали по времени их выхода в стандартном растворе. Содержание веществ рассчитывали методом внутреннего стандарта, используя отношение площадей пиков в стандартной смеси и в образце с помощью программного обеспечения LabSolutions (Shimadzu).

### 3.5 Анализ содержания белка тирозингидроксилазы методом вестерн-блота

Методом вестерн блота определяли количественное содержание тирозингидроксилазы в тканях глаза мышей на обеих модельных стадиях развития БП. Гомогенизированную ткань разделяли методом денатурирующего электрофореза в 12%-ном полиакриламидном геле на установке для вертикального фореа (Bio-Rad, США), в которой в дальнейшем осуществляли перенос разделенных веществ с геля на мембрану для нанесения антител. Первичные антитела к тирозингидроксилазе (mouse monoclonal TH, Sigma) наносили на мембрану при 4°C в течение суток, после чего обрабатывали вторичными (goat anti-mouse peroxidase) антителами с пероксидазной меткой.

Визуализацию мембран проводили на приборе ChemiDoc Touch (Bio-Rad), количественную обработку проводили на прилагающемся программном обеспечении.

### 3.6 Анализ экспрессии мРНК тирозингидроксилазы методом ПЦР в реальном времени

Методом ПЦР в реальном времени была измерена экспрессия мРНК тирозингидроксилазы. Тотальная РНК из тканей сетчатки и иридоцилиарного комплекса глаз мышей выделялась Тризолом (Sigma) и очищалась от ДНК свободной от РНКаз ДНКазой (Fermentas, США). Далее кДНК синтезировалась при помощи набора Revert Aid cDNA Synthesis Kit (Fermentas, США). Полимеразная цепная реакция проводилась с реагентом SYBRGreen (Fermentas, США) на приборе IQ5 (Bio-Rad).

### 3.7 Биохимический анализ проб слезы

Концентрация норадреналина в пробах слезы оценивалась методом ВЭЖХ с электрохимической детекцией аналогично вышеописанному.

Уровень альфа-2-макроглобулина определяли спектрофотометрически со специфическим субстратом *p*-бензоил-DL-аргинин-*p*-нитроанилид (БАПНА) согласно описанной методике [13].

### 3.8 Статистический анализ

Полученные данные были проверены на соответствие нормальному распределению с помощью критерия Шапиро-Уилка. Выбросы определяли с помощью диаграммы «ящик с усами» и исключали из дальнейшего анализа. Статистический анализ результатов проводили с помощью двухстороннего непарного *t*-теста Стьюдента с критерием статистической значимости  $p < 0,05$  в программном пакете GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software, США).

Данные представлены как среднее  $\pm$  стандартная ошибка среднего.

## 4 РЕЗУЛЬТАТЫ

### 4.1 Воспроизведение моделей болезни Паркинсона

Для решения поставленных задач проводилось экспериментальное моделирование БП на мышах. Были использованы две модели, воспроизводящие интересные нас стадии развития БП: доклиническую и раннюю клиническую. Обе стадии моделировались на мышах с помощью инъекций МФТП – специфического токсина нейронов nigrostriatной системы головного мозга.

Критерием успешного воспроизведения на модели доклинической либо клинической стадии БП является, во-первых, факт отсутствия/проявления моторных симптомов соответственно; во-вторых, степень гибели дофаминергических нейронов черной субстанции и их отростков в стриатуме, приводящая к снижению уровня дофамина в стриатуме до/ниже уровня порога (20-30% от нормы) [12]. Поэтому основными методами валидации воспроизведенных моделей были тест «открытое поле», а также оценка содержания дофамина в стриатуме экспериментальных животных, результаты которых представлены в табл. 1.

Таблица 1. Концентрация дофамина в стриатуме и пройденный путь у животных при моделировании БП на доклинической и ранней клинической стадиях

| Параметр<br>Группа   |                                                   | Дофамин<br>в стриатуме<br>(% от<br>контроля) | Пройденный путь<br>(% от контроля до введения) |                             |
|----------------------|---------------------------------------------------|----------------------------------------------|------------------------------------------------|-----------------------------|
|                      |                                                   |                                              | До введения<br>МФТП/NaCl                       | После введения<br>МФТП/NaCl |
| Контроль (0.9% NaCl) |                                                   | 100 ± 2.0                                    | 100 ± 7.0                                      | 95.4 ± 8.8                  |
| Модель<br>БП         | на доклинической стадии<br>(2x8 мг/кг МФТП)       | 43.3 ± 2.4 *                                 | 101 ± 5.6                                      | 92.3 ± 6.8                  |
|                      | на ранней клинической стадии<br>(4x10 мг/кг МФТП) | 20.1 ± 2.5 *                                 | 98 ± 6.1                                       | 51.8 ± 6.3 *                |

\*  $p \leq 0.05$  по сравнению с контролем

В стриатуме мышей на доклинической и ранней клинической стадии развития было показано снижение дофамина соответственно до 43,4% и до 20,1% по сравнению с контрольной группой (Табл. 1), что согласовывается с ранее полученными данными для используемых моделей [12]. Поведенческий тест «открытое поле» также показал отсутствие нарушений поведения у группы животных с моделью доклинической стадии и

достоверное снижение на 48,2% длины пройденного пути у мышей с ранней клинической стадией относительно контроля (Табл. 1).

Таким образом, полученные данные указывают на адекватное воспроизведение моделей доклинической и ранней клинической стадий БП в данной работе.

#### 4.2 Концентрация моноаминов в тканях целого глаза и век мышей

Была проанализирована концентрация моноаминов в тканях целого глаза мышей на моделях обеих стадий БП. Уровень дофамина снижался на 29% и 34% на моделях доклинической и ранней клинической стадиях, соответственно (Рис. 1). Снижение концентрации норадреналина составило 37% и 44%, соответственно (Рис. 1). При этом снижение уровня L-ДОФА в глазу на модели доклинической стадии БП не было статистически достоверным, но на модели клинической стадии наблюдалось достоверное и значительное (на 40%) снижение по сравнению с контрольной группой (Рис. 1).

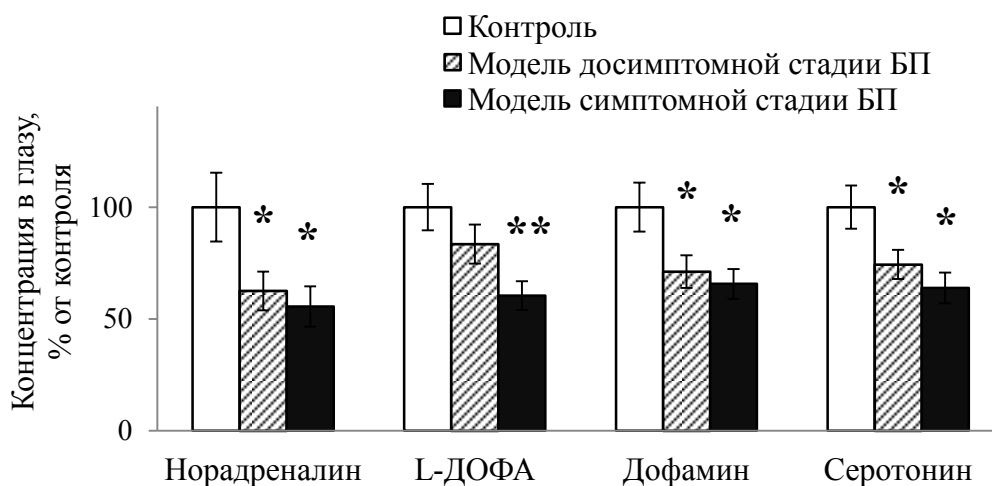


Рисунок 1. Концентрация моноаминов в тканях целого глаза на моделях доклинической (досимптомной) и ранней клинической (симптомной) стадий болезни Паркинсона. Данные представлены в виде процентов от контроля. \*  $p < 0,05$  по отношению к контролю, \*\*  $p < 0,05$  по отношению к двум другим группам

Также, в глазах и в тканях век было показано изменение уровня серотонина. В глазу она снизилась на 25,6% и 46,2% на моделях доклинической и клинической стадий, соответственно (Рис. 1). Напротив, в тканях века уровень серотонина резко повысился: в 1,5 раза на доклинической модели и в 3 раза – в клинической (Рис. 2). Уровень остальных проанализированных веществ – дофамина и предшественника серотонина 5-гидрокситриптофана (5-ГТФ) в веках на обеих моделях БП не изменился (Рис. 2).

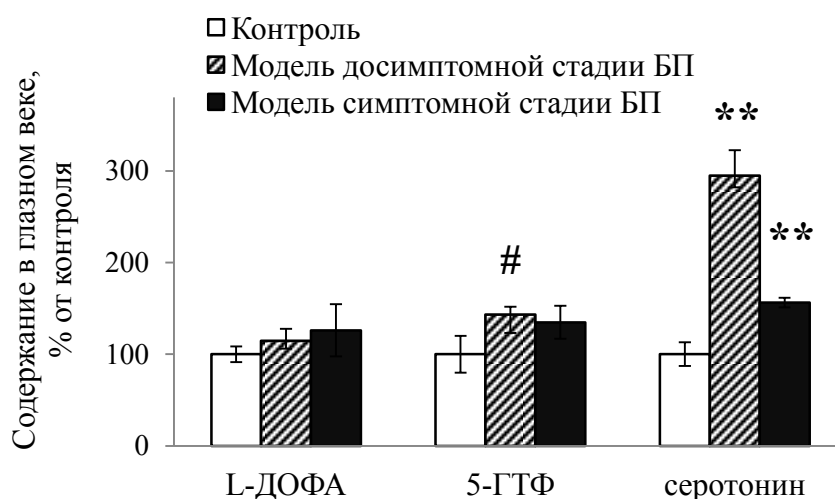


Рисунок 2. Содержание L-ДОФА, 5-гидрокситриптофана (5-ГТФ) и серотонина в тканях целого глаза на моделях доклинической (досимптомной) и ранней клинической (симптомной) стадий болезни Паркинсона. Данные представлены в виде процентов от контроля. \*\*  $p < 0,05$  по отношению к двум другим группам, #  $p < 0,15$  к контролю

#### 4.3 Концентрация катехоламинов в сетчатке и иридоцилиарном теле

В сетчатке мышей на модели доклинической стадии обнаружено значительное увеличение концентрации дофамина (на 39%) и его метаболитов (62% для L-ДОФА и в 2,1 раза для ДОФУК) (Рис. 3).

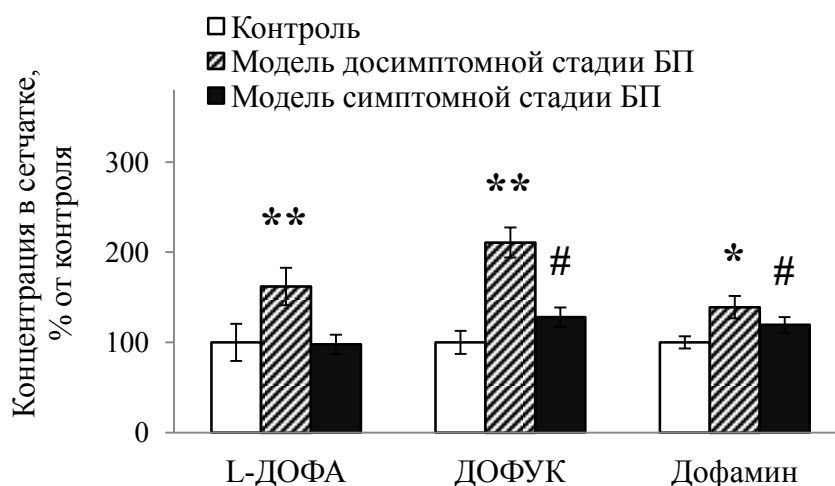


Рисунок 3. Концентрация дофамина и его метаболитов в сетчатке на моделях доклинической (досимптомной) и ранней клинической (симптомной) стадий болезни Паркинсона. Данные представлены в виде процентов от контроля. \*  $p < 0,05$  по отношению к контролю, \*\*  $p < 0,05$  по отношению к двум другим группам, #  $p < 0,15$  по отношению к контролю

На модели клинической стадии в иридоцилиарном комплексе концентрация норадреналина снизилась на 53%, а диоксифенилуксусной кислотой (ДОФУК) – на 21% по сравнению с контрольной группой (Рис. 4). При этом, на модели доклинической стадии концентрация L-ДОФА и ДОФУК повышается, а норадреналина и дофамина демонстрирует тенденцию к повышению (Рис. 4).

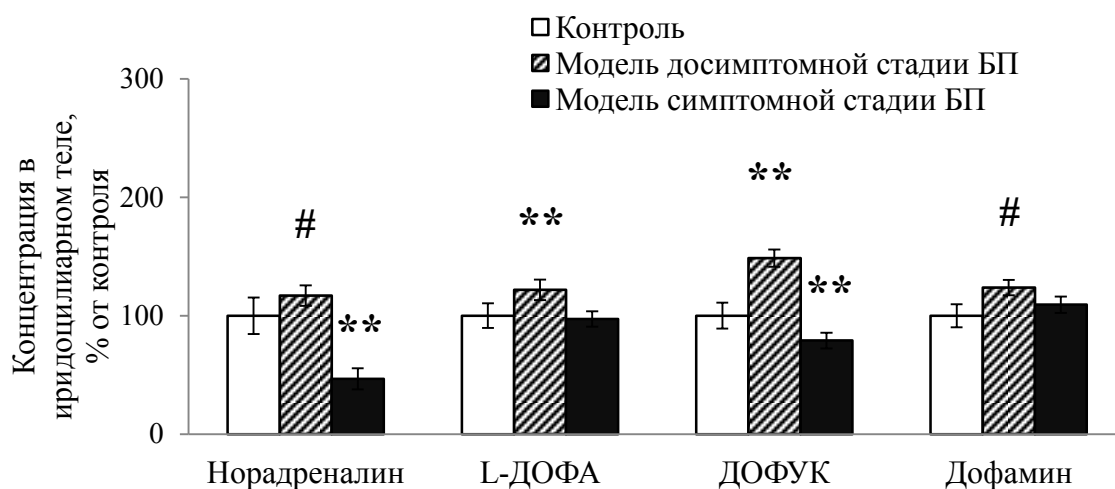


Рисунок 4. Концентрация катехоламинов и метаболитов в иридоцилиарном комплексе на моделях доклинической (досимптомной) и ранней клинической (симптомной) стадий болезни Паркинсона. Данные представлены в виде процентов от контроля. \*\*  $p < 0,05$  по отношению к двум другим группам, #  $p < 0,15$  по отношению к контролю

#### 4.4 Уровень белка тирозингидроксилазы в сетчатке

В сетчатке на модели клинической стадии БП было обнаружено резкое снижение уровня белка тирозингидроксилазы – ключевого фермента синтеза катехоламинов (Рис. 5).

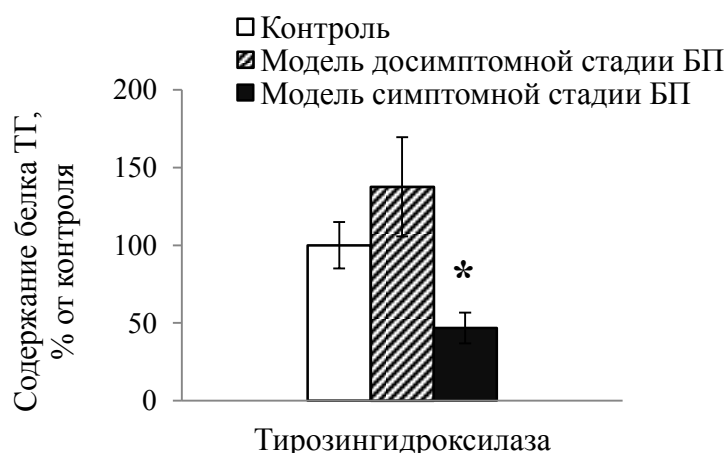


Рисунок 5. Содержание белка тирозингидроксилазы в сетчатке на моделях доклинической и ранней клинической стадий болезни Паркинсона. \*  $p < 0,05$  по отношению к контролю

#### 4.5 Уровень экспрессии мРНК тирозингидроксилазы в сетчатке

На модели доклинической стадии было обнаружено резкое снижение экспрессии мРНК ТГ в сетчатке, в то время как на модели клинической стадии БП экспрессия мРНК ТГ возвращается к контрольным значениям (Рис. 6)

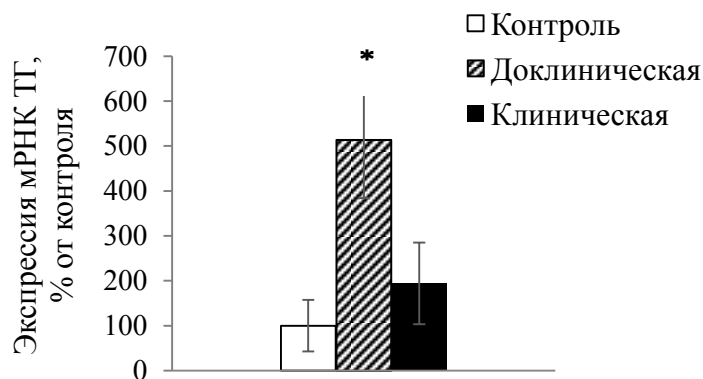


Рисунок 6. Уровень экспрессии мРНК тирозингидроксилазы в сетчатке на моделях доклинической и ранней клинической стадий болезни Паркинсона

#### 4.6 Концентрация норадреналина и альфа-2-макроглобулина в слезе мышей

Уровень воспалительного маркера альфа-2-макроглобулина ( $\alpha 2$ МГ) в слезе животных резко повышается на модели клинической стадии БП (Рис. 7). Сходная картина была показана и для норадреналина, который демонстрирует тенденцию к повышению на модели клинической стадии (Рис. 7).

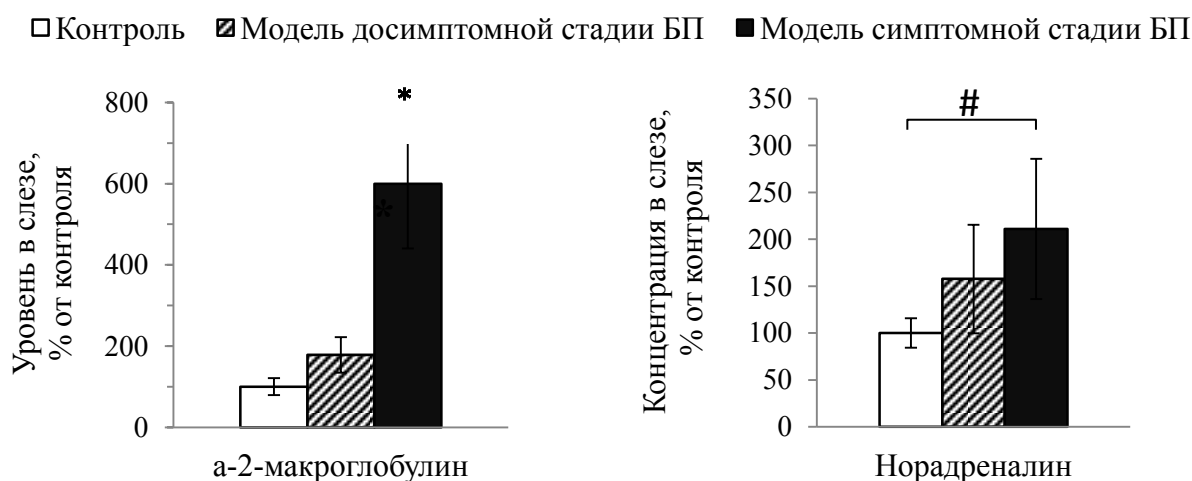


Рисунок 7. Уровень  $\alpha 2$ -макроглобулина и норадреналина в слезной жидкости на моделях доклинической (досимптомной) и ранней клинической (симптомной) стадий болезни Паркинсона. \*  $p < 0,05$  по отношению к контролю, #  $p < 0,15$  по отношению к контролю



#### 4.7 Внутриглазное давление у мышей на моделях болезни Паркинсона

В ходе были получены данные о не очень значительном, но статистически достоверном увеличении внутриглазного давления у мышей в обеих опытных группах в среднем на 1 мм рт. ст. (Рис. 8).

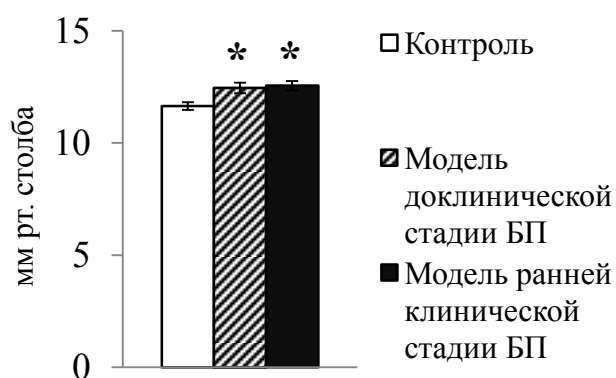


Рисунок 8. Внутриглазное давление у мышей на моделях доклинической и ранней клинической стадий болезни Паркинсона. \*  $p < 0,05$  по отношению к контролю

## 5 ОБСУЖДЕНИЕ

### 5.1 Патология зрительного анализатора как системное проявление нейродегенерации на моделях болезни Паркинсона

Обнаруженное нами снижение содержания моноаминов – норадреналина, дофамина и серотонина, в глазу у мышей не только на модели БП на ранней клинической стадии, но и на доклинической стадии свидетельствует о том, что системные патологические процессы, развивающиеся при БП, распространяются на глаз и начинаются уже на ранней стадии БП – до появления моторных нарушений.

Повышение уровня серотонина в веке может объясняться либо общим повышением активности его синтеза тучными клетками в веке под влиянием фактора нейровоспаления, известного как субстанция Р, либо нарушением его дальнейшего метаболизма. При снижении активности фермента N-ацетилтрансферазы, которая катализирует превращения серотонина в мелатонин, первый будет накапливаться. Как повышение фактора Р, так и снижение активности N-ацетилтрансферазы связывают с развитием БП [15].

Поскольку серотонин является регулятором функции расположенных на поверхности века слезных желез, такое значительное отклонение от нормы его содержания может, помимо изменения состава слезы, влиять на ее секрецию. Этим можно объяснить возникающие при БП патологии, такие как синдром сухого глаза [9]. Также, такое сильное изменение уровня серотонина на доклинической стадии должно влиять на изменение состава слезной жидкости.

Таким образом, у мышей при нейротоксическом моделировании БП на доклинической и клинической стадиях обнаружено изменение метаболизма моноаминов в глазу и в веке, что подтверждает пригодность этих моделей для изучения периферической патологии зрительной системы при паркинсонизме и делает актуальным анализ функциональных изменений, связанных с дисфункцией моноаминергических систем глаза. Полученные данные были опубликованы [14].

### 5.2 Характеристика патологических изменений в отдельных структурах глаза – сетчатке и иридоцилиарном комплексе на моделях болезни Паркинсона

В сетчатке, содержащей дофаминергические амакриновые клетки, на модели доклинической стадии БП обнаружено компенсаторное повышение уровня дофамина и его метаболитов. Судя по всему, это происходит вследствие повышения активности ТГ, поскольку, несмотря на рост мРНК ТГ, содержание белка ТГ на модели досимптомной

стадии остается на уровне контроля. На модели клинической стадии БП в сетчатке обнаружено более чем двукратное снижение содержания белка ТГ при сохранении концентрации ДА на уровне контроля, что также указывает на компенсаторное повышение активности ТГ. Интересно, что компенсаторное повышение активности ТГ на модели доклинической стадии БП является также хорошо охарактеризованным механизмом нейропластичности в нигростриатной системе [16].

В иридоцилиарном комплексе (радужке вместе с цилиарным телом) обнаружено резкое снижение концентрации норадреналина на модели клинической стадии БП. Как мышцы радужки, так и цилиарное тело иннервируются норадренергическими нейронами симпатической нервной системы, поэтому наблюдаемое снижение уровня норадреналина может быть следствием десимпатизации, являющейся характерным проявлением БП на периферии [1, 11]. Также цилиарное тело участвует в выработке внутриглазной жидкости, и нарушения в его работе могут являться причиной повышения внутриглазного давления, обнаруженного нами на моделях БП.

### 5.3 Функциональные нарушения глаза как периферические биомаркеры для ранней диагностики болезни Паркинсона

Изменения, обнаруженные нами при анализе состава слезы, хорошо сочетаются с вышеописанными изменениями в структурах глаза. Так, повышение уровня воспалительного маркера а2МГ в слезе коррелирует с нейровоспалением, на которое указывает повышение концентрации серотонина в тканях века. В свою очередь, повышение концентрации норадреналина в слезе может быть следствием повышенной активности ТГ в иридоцилиарном теле глаза.

С физиологической точки зрения большой интерес представляет повышение ВГД на обеих моделях БП ( $p \leq 0.015$ ), что указывает на возникновение функциональных нарушений в глазу ещё до возникновения моторных нарушений. Уровень ВГД определяется скоростью образования и оттока внутриглазной жидкости. В регуляции этих процессов участвует дофамин, который, воздействуя на ДА2 и ДА3 рецепторы, экспрессирующиеся в постганглионарных симпатических нервных окончаниях, снижает секрецию внутриглазной жидкости, а воздействуя на ДА1 рецепторы, локализованные в цилиарном теле, повышает секрецию внутриглазной жидкости [17]. Весьма вероятно, что повышение внутриглазного давления может быть одним из ранних признаков развития БП у людей. Косвенным подтверждением такой возможности является повышенная частота возникновения глаукомы, сопровождающейся увеличением внутриглазного давления у пациентов с БП по сравнению с возрастным контролем [9].

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе выполнения работы впервые были проанализированы биохимические, молекулярно-биологические и функциональные изменения, происходящие в глазу у мышей на нейротоксических моделях доклинической и ранней клинической стадий БП. Полученные данные позволяют сделать вывод о том, что патологический процесс распространяется на структуры глаза уже на доклинической стадии заболевания, что вызывает различные функциональные нарушения, проявляющиеся в виде изменения состава слезной жидкости и внутриглазного давления. Это является крайне перспективным направлением для разработки ранней диагностики БП.

Стоит отметить, что подавляющее большинство периферических биомаркеров обладают лишь относительной специфичностью, т.е. могут проявляться не только при БП, но и при других заболеваниях. Поэтому, использование большего числа маркеров повысит эффективность разрабатываемой диагностики. На втором этапе выполнения данного проекта на моделях БП будет проанализировано функциональное состояние сердца, а на третьем этапе – надпочечников. Успешное выполнение проекта позволит не только всесторонне охарактеризовать системные изменения, происходящие на моделях доклинической и ранней клинической стадий БП, но и набрать целую панель периферических биомаркеров.

## СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Угрюмов, М.В. Разработка доклинической диагностики и превентивного лечения нейродегенеративных заболеваний / М.В. Угрюмов и другие // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. –2015. –Т. 115. –№ 11. –С. 4 - 14.
2. Klingelhoefer, L. The Gut and Nonmotor Symptoms in Parkinson's Disease. / L. Klingelhoefer, H. Reichmann // International Review of Neurobiology. –2017. –V. 134. –P. 787 – 809.
3. Postuma, R.B. Nonmotor Aspects of Parkinson's Disease — How Do They Help Diagnosis? / R.B. Postuma // International Review of Neurobiology. –2017. –V 133. –P. 519 - 539.
4. St Louis, E.K. REM Sleep Behavior Disorder in Parkinson's Disease and Other Synucleinopathies. / E.K. St Louis [et al.] // Movement Disorders. –2017. –V. 32. –P. 645 - 658.
5. Archibald, N.K. The retina in Parkinson's disease. / N.K. Archibald // Brain. –2009. –V. 132. – P. 1128 - 1145.
6. Titova, N. The Nonmotor Features of Parkinson's Disease / N. Titova [et al.] // International Review of Neurobiology. –2017. –V. 132. –P. 33 - 54.
7. Jellinger, K.A. Neuropathobiology of non-motor symptoms in Parkinson disease / K.A. Jellinger // Journal of Neural Transmission. –2015. –V. 122. –№ 10. –P. 1429 – 1440.
8. Sauerbier, A. Nonmotor Subtyping in Parkinson's Disease. / A. Sauerbier [et al.] // International Review of Neurobiology. –2017. –V. 133. –P. 447 – 478.
9. Чеснокова, Н.Б. Патология органа зрения как одно из проявлений болезни Паркинсона / Н.Б. Чеснокова, Т.А. Павленко, М.В. Угрюмов // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. –2017. –Т. 117. –С. 124 – 131.
10. Balashova, E.E. Plasma Metabolome Signature in Patients with Early-stage Parkinson Disease / E.E. Balashova [et al.] // Current metabolomics. –2018. –V. 6. –№ 1. –P. 75 - 82.
11. Kim, A. Upgraded Methodology for the Development of Early Diagnosis of Parkinson's Disease Based on Searching Blood Markers in Patients and Experimental Models / A. Kim [et al.] // Molecular Neurobiology. 2018 г.
12. Ugrumov, M. V. Modeling of presymptomatic and symptomatic stages of parkinsonism in mice / M.V. Ugrumov [et al.] // Neuroscience. – 2011. – V. 181. – P. 175 - 188.
13. Чеснокова, Н.Б. Исследование суммарной активности трипсиноподобных протеиназ и антипротеолитической активности в слезной жидкости при

воспалительных заболеваниях глаз для выбора рациональной терапии: Методические рекомендации / Н.Б. Чеснокова и Т.П. Кузнецова // М.: Минздравмедпром РФ; 1995. 10 с.

14. Ким, А.Р. Биохимические и функциональные изменения в глазу как проявление системной деградации нервной системы при паркинсонизме / А.Р. Ким и другие // *Acta Naturae*. – 2018. –Т. –№ 10. –С. 3.
15. Singh, M. Association of Polymorphism in Cytochrome P450 2D6 and N-Acetyltransferase-2 with Parkinson's Disease / M. Singh [et al.] // *Disease Markers*. – 2010. –Т. 28. –№ 2. –С. 87 - 93
16. Kozina, E.A. Tyrosine hydroxylase expression and activity in nigrostriatal dopaminergic neurons of MPTP-treated mice at the presymptomatic and symptomatic stages of parkinsonism / E.A. Kozina [et al.] // *J Neurol Sci*. – 2014. – V. 340. –P. 198 - 207.
17. Pescosolido, N. Role of dopaminergic receptors in glaucomatous disease modulation / N. Pescosolido [et al.] // *Biomed Res Int*. – 2013. – № 193048.

ПУБЛИКАЦИИ ПО ТЕМЕ ГОСЗАДАНИЯ ЗА 2018 ГОД\*

1. \***Kim A.**, Nigmatullina R., Zalyalova Z., Soshnikova N., Krasnov A., Vorobyeva N., Georgieva S., Kudrin V., Narkevich V., **Ugrumov M.** Upgraded Methodology for the Development of Early Diagnosis of Parkinson's Disease Based on Searching Blood Markers in Patients and Experimental Models//**Molecular Neurobiology**. - 2018. DOI: 10.1007/s12035-018-1315-2 (WoS, Scopus)
2. \*Balashova E.E., Lokhov P.G., Maslov D.L., Trifonova O.P., Khasanova D.M, Zalyalova Z.A., Nigmatullina R.R., Archakov A.I., **Ugrumov M.V.** Plasma Metabolome Signature in Patients with Early-stage Parkinson Disease//**Current metabolomics**. - 2018. - V. 6. - N. 1. - P. 75 - 82. DOI: 10.2174/2213235X05666170221161735. (WoS, Scopus)
3. \***Kim AR**, Pavlenko TA, Katargina LA, Chesnokova NB, **Ugrumov MV** Biochemical and Functional Changes in the Eye As a Manifestation of Systemic Degeneration of the Nervous System in Parkinsonism//**Acta Naturae** - 2018 - V. 10. № 3. P. 62 - 67. (WoS, Scopus) - (Ким А.Р., Павленко Т.А., Катаргина Л.А., Чеснокова Н.Б., Угрюмов М.В. Биохимические и функциональные изменения в глазу как проявление системной деградации нервной системы при паркинсонизме//Acta Naturae. - 2018. - Т. 10. № 3. С. 67 - 72.)

Отчет утвержден Ученым советом ИБР РАН, протокол № 11 от 28 ноября 2018 г.