
**ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ПАТОЛОГИЯ ВЫСШЕЙ
НЕРВНОЙ ДЕЯТЕЛЬНОСТИ**

УДК 612.821.2 + 612.829.3

**ИССЛЕДОВАНИЕ МЕЖКЛЕТОЧНОЙ КОНЦЕНТРАЦИИ ДОФАМИНА
И ЕГО МЕТАБОЛИТОВ В СТРИАТУМЕ МЫШЕЙ МЕТОДОМ
МИКРОДИАЛИЗА ПРИ ВНУТРИБРЮШИННОМ ВВЕДЕНИИ МФТП**

© 2010 г. Р. Г. Аверкин, В. А. Коршунов, Н. В. Щеголевский, В. Н. Мац,
В. А. Маркевич, Г. А. Григорьян, А. С. Базян

*Учреждение Российской академии наук Институт высшей нервной деятельности
и нейрофизиологии РАН, Москва,
e-mail: bazyan@mail.ru*

Поступила в редакцию 18.03.09 г.

Принята в печать 05.05.09 г.

В работе описывается строение микродиализной канюли, которая устанавливается в структуры мозга непосредственно перед микродиализом с помощью микроманипулятора. Главным результатом настоящих исследований явилось то, что использованная нами микродиализная канюля позволила выявить соответствие поведенческих и биохимических изменений у мышей линии C57BL/6 в разные интервалы времени после введения однократной дозы (20 мг/кг) 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридина, без каких-либо добавочных фармакологических воздействий увеличивающих концентрацию межклеточного дофамина в стриатуме. Сразу после введения 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридина наблюдалось значительное нарушение поведения мышей и достоверное уменьшение межклеточной концентрации дофамина и гомованилиновой кислоты в стриатуме. Через 7 сут ни поведение, ни межклеточная концентрация дофамина и его метаболитов в стриатуме достоверно не отличались от контроля. Через 30 сут вновь наблюдалось нарушение поведения у мышей и значительное уменьшение межклеточной концентрации дофамина и его метаболитов в стриатуме. Уменьшение межклеточной концентрации дофамина в стриатуме сразу после инъекции 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридина можно объяснить нарушением синтеза и метаболизма дофамина вызванным воздействием 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридина. А уменьшение межклеточной концентрации дофамина в стриатуме через 30 сут после инъекции 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридина связывается с разрушением дофаминергической nigro-стриатной системы.

Ключевые слова: болезнь Паркинсона, мыши, стриатум, 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридин, микродиализ, дофамин, 3,4-диоксифенилуксусная кислота, гомованилиновая кислота.

**Study of Extracellular Concentration of Dopamine and Its Metabolites in Mice
Striatum by a Microdialysis Technique at Intraperitoneal Administration of MPTP**

R. G. Averkin, V. A. Korshunov, N. V. Schegolevsky, V. N. Matz, V. A. Markevich,
G. A. Grigoryan, A. S. Bazyan

*Institute of Higher Nervous Activity and Neurophysiology, Russian Academy of Sciences, Moscow,
e-mail: bazyan@mail.ru*

In this paper a structure of a microdialytic cannula inserted into brain areas just before a microdialysis is described. The cannula used allowed to find out a correspondence of behavioral and biochemical changes in C57BL/6 mice at various time intervals after a single dose administration (20 mg/kg) of the neurotoxin, 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine, without any additional pharmacological actions enhancing an extracellular striatal dopamine concentration. Immediately after 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine administration an essential disturbance of mice behavior and a significant reduction of the extracellular concentration of dopamine and homovanillic acid were observed in striatum. A week after the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine administration neither behavior nor the extracellular dopamine and homovanillic acid striatal concentration substantially differed from those of controls. 30 days after the neurotoxin administration there was again an essential disturbance of behavior and the large reduction of dopamine and its metabolite concentration in striatum.

There was suggested that a reduction of the dopamine concentration immediately after 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine injection connected with abnormalities of dopamine synthesis and metabolism induced by 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine whereas a reduction of the extracellular striatal dopamine concentration 30 days after 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine administration related to damage of the nigrostriatal dopaminergic system.

Key words: Parkinson's disease, mouse, striatum, 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP), microdialysis, dopamine (DA), 3,4-dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC), homovanillic acid (HVA).

Использование МФТП (1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридин) в качестве специализированного токсического агента для повреждения nigro-стриатной дофаминергической системы является одной из наиболее успешных моделей экспериментального развития болезни Паркинсона у животных. В ряде работ [2, 10, 15] было показано, что разные дозы МФТП в зависимости от острого или хронического введения вызывают разные по степени повреждения nigro-стриатной системы и разные проявления их во времени. Так, введение токсина [9] в больших дозах (50–300 мг/кг) мышам линии C57BL/6 приводило к почти полному истощению (до 95%) уровня стриатного дофамина (ДА) и к выраженной гибели (от 55 до 75%) нейронов nigro-стриатной системы. В другой работе [10] при повторном внутривенном введении МФТП мышам той же линии активная фаза дегенерации начиналась через 12 ч после инъекции и продолжалась в течение 4 дней. Быстро (уже в 1-й день) наступали отчетливые повреждения нейронов черной субстанции/стриатума и при более длительных применениях МФТП (10 доз, 25 мг/кг в течение 5 недель) [17]. Другими словами, дозировка и способы введения МФТП оказывают существенное влияние на интенсивность повреждений nigro-стриатной системы и вследствие этого на динамику развития ее морфологических, нейрохимических и функциональных расстройств. Выяснение закономерностей этой динамики и установление корреляционных отношений между отмеченными расстройствами являются основополагающими задачами в исследованиях патогенетических механизмов развития болезни Паркинсона.

Надо отметить, что существуют различные поведенческие модели для оценки двигательных расстройств, вызываемых МФТП и другими токсическими агентами [3, 26]. Выбор их определяется задачей, которая стоит перед исследователем, — выявить тонкие специализированные изменения в движениях (напри-

мер, разницу в длине шага) или найти изменения в общем характере двигательной активности (время активности/покоя, траекторию движения и пр.). Наиболее простой и адекватной моделью для оценки общего характера движений является модель открытого поля [27]. Из нейрохимических методов широко используют методики измерения количества ДА и его метаболитов в гомогенизированной нервной ткани [21], плотности дофаминергических рецепторов [4], активности транспортера ДА [8] и т.д. Однако наиболее подходящим, на наш взгляд, приемом количественной оценки состояния нейромедиаторных систем в зонах повреждения является методика микродиализа, т.е. непосредственный забор диализата из внеклеточной жидкости через канюлю с последующим измерением в нем содержания дофамина и его метаболитов посредством высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). В доступной нам литературе не удалось найти работ с использованием метода микродиализа на мышах при исследовании влияния МФТП без дополнительного фармакологического повышения концентрации ДА. Это, вероятно, объясняется низкой концентрацией веществ у мышей наряду с резким уменьшением межклеточной концентрации ДА под влиянием МФТП. Необходимо отметить, что общепринятая методика микродиализа страдает, по нашему мнению, одним существенным недостатком, а именно: канюли для забора микродиализата устанавливаются в мозге стационарно. В течение времени они могут прорастать глиальными клетками, что затрудняет прохождение биологически активных веществ через мембрану и значительно уменьшает их концентрацию в диализате. Вероятно, поэтому в некоторых работах наряду с МФТП мышам вводили вещества, повышающие концентрацию ДА в стриатуме, — психостимулятор модафинил [7] и антагонист N-метил-D-аспартатного рецептора AP-5 [23]. Учитывая это, методика микродиализа была модифицирована нашим соавтором [1] таким образом, что сделала возможным ис-

пользование микродиализной канюли непосредственно перед экспериментом (подробно см ниже) без предварительной ее фиксации накануне.

Целью настоящей работы было: а) определение межклеточной концентрации ДА и его метаболитов 3,4-диоксифенилуксусной кислоты (ДОФУК) и гомованилиновой кислоты (ГВК) в стриатуме свободноподвижных мышей методом микродиализа в разные интервалы времени после инъекции МФТП, б) выяснение корреляции между наличием двигательных расстройств и концентрацией ДА и его метаболитов в те же интервалы времени.

МЕТОДИКА

Животные

Опыты проводили на 23 самцах мышей линии C57BL/6 в возрасте 3–4 мес., массой 28–32 г. Выбор мышей в качестве экспериментальных животных обусловлен тем, что моторные нарушения при воздействии МФТП у них являются более выраженными, чем у крыс [11, 27].

Животные содержались в виварии по 10 в клетке, при естественном суточном цикле и свободном доступе к воде и пище. Правила работы с животными и протоколы экспериментов утверждены этической комиссией Института высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН и находятся в соответствии с национальными и международными законами и правилами.

Операция

За 2 сут до эксперимента мышей анестезировали зоветилом (Zoletil-100, 35 мг/кг) внутрибрюшинно и помещали в стереотаксис Мещерского. Скальпирование производили под дополнительной новокаиновой блокадой (2% подкожно). В костях черепа сверлили трепанационное отверстие для канюли, которую позднее вводили в мозг по координатам атласа Дж. Паксиноса и К.Б. Франклина [18] ($AP = +0.5$ мм; $L = 1.7$ мм; $H = 3.5–4.0$ мм от поверхности мозга). Индифферентный электрод, электрод заземления и платформу для микроманипулятора крепили к кости черепа с помощью зуботехнической пластмассы. Животных фиксировали удерживанием за индифферентный электрод и электрод заземления во время погружения канюли и микро-

электрода. После операции каждое животное содержали в отдельной клетке.

Микродиализ

Для локального забора диализата предложено несколько типов микродиализных канюль. Мы использовали канюли коаксиального типа, поскольку они имеют наименьший диаметр и меньше повреждают ткани мозга. Коаксиальная канюля (см. рис. 1) представляет развитие ранее предложенной конструкции [1], модифицированной для крепления в микроманипуляторе. Базовая конструкция собирается из инъекционных игл (диаметром 0.3 мм), которые фиксируются в пластиковом цилиндре (диаметром 1.2 мм) эпоксидной смолой. Внутренний капилляр и мембрана сменные, что допускает многократное использование канюли. Мембрану и капилляр заменяли после каждого четырех экспериментов. Проницаемость мембраны 20 кД.

Микродиализную канюлю вставляли в микроманипулятор, который обеспечивал ее погружение в мозг. В микроманипулятор также вставляли микроэлектрод для регистрации нейронной активности и ЭЭГ во время забора диализата. Кроме того, наличие микроэлектрода позволяло точнее определить положение диализной канюли относительно исследуемых структур мозга. Отсчет глубины производили от момента касания электродом поверхности мозга. В микроманипуляторе предусмотрена шкала для мониторинга глубины погружения. Регистрирующий электрод устанавливали так, чтобы его кончик находился посередине рабочей зоны микродиализного зонда. Перемещение электрода и канюли происходило с помощью микровинта. Поскольку шаг винта известен, то подсчет числа оборотов и долей оборота позволяет определить глубину с точностью до 100 мкм.

В качестве диализного раствора использовали среда Кребса – Рингера (мМ): NaCl – 147; KCl – 3; CaCl₂ – 1.4; MgCl₂ – 0.8; Na-фосфатный буфер – 100 (pH 7.4). Раствор подавался с помощью шприцевого насоса со скоростью 1 мкл/мин через тонкую силиконовую трубку, подходящую к канюле. Выйдя из капилляра, раствор поступал в область, ограниченную полупроницаемой мембраной, откуда исследуемые вещества по концентрационному градиенту и через отводящую трубку поступали в пробирку, укрепленную на подающей трубке над головой

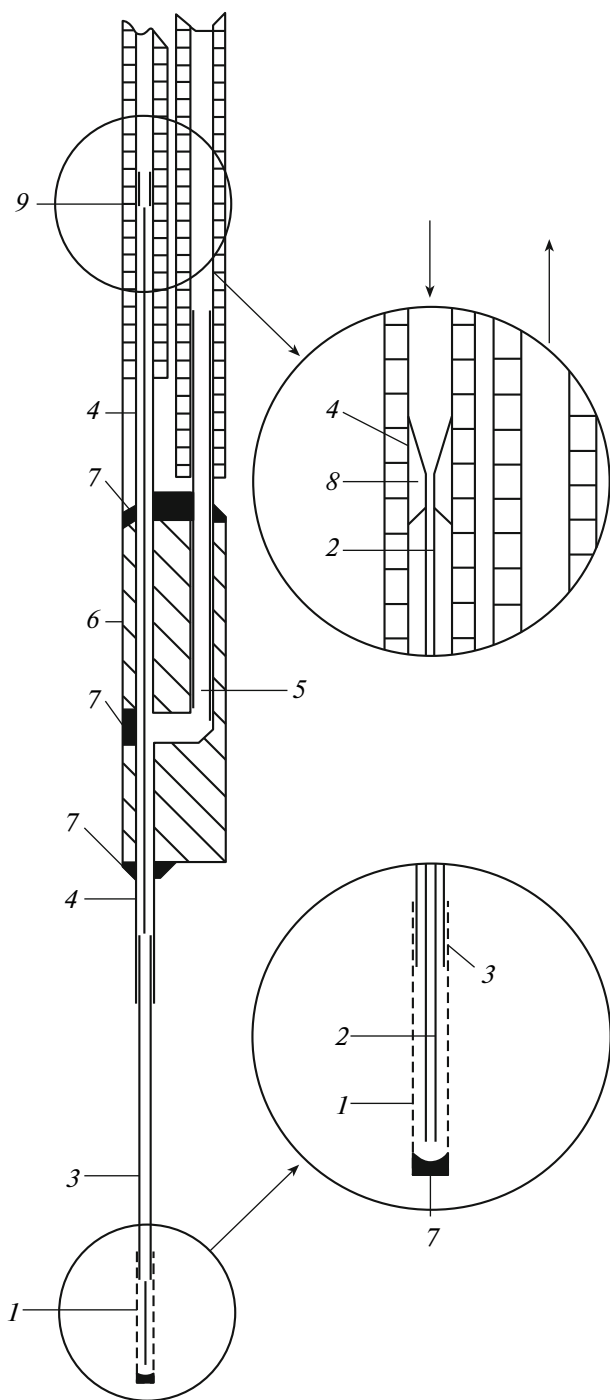


Рис. 1. Канюля в разрезе. 1 — диализная трубка (Spectrum 0D × 1D = 200 × 187); 2 — стеклянный капилляр; 3 — входная трубка; 4 — собирающая трубка; 5 — выходная трубка; 6 — корпус канюли; 7 — эпоксидная смола; 8 — канифоль; 9 — силиконовые трубки.

Fig. 1. Photo of cannula. 1 — tube for dialysis (Spectrum 0D × 1D = 200 × 187); 2 — glass capillary; 3 — input tube; 4 — tube for collection; 5 — output tube; 6 — body of cannula; 7 — epoxy resin; 8 — colophony; 9 — silicon tubes.

животного. Специальное крепление проби-рок позволяло менять их, не беспокоя животное (см. [1]).

Микродиализат у свободноподвижных животных начинали собирать спустя 40 мин после введения канюли, потом в течение 20 мин 4 раза; после хроматографии полученные результаты усредняли. В предварительных исследованиях было показано, что после первоначального падения к 40-й минуте выделение эндогенных веществ выходит на устойчивый уровень. Концентрацию катехоламинов и их метаболитов в микродиализате определяли с помощью метода высокоэффективной жидкостной хроматографии высокого давления с электрохимическим детектором. Для разделения диализата на фракции использовались хроматографические колонки (Dr. Maisch, Reprosil-Pur, C18, аq. 3мкм, 3 × 150 мм, “Элсико”, Россия) без преколонки. Подвижная фаза: цитратно-фосфатный буфер, pH 3.9, ацетонитрил 4% и тетрагидрофуран 0.8%. Скорость потока 0.3 мл/мин, насос BAS, PM-60 (США); инжектор Rheadyne 7010 (США). Для определения количества веществ использовали электрохимический детектор DIONEX ED50A (Германия). Напряжение на электроде 0.75 В. Чувствительность метода при использованной нами канюле, колонки с приведенной подвижной фазой и при удалении преколонки составляет 2.5–3 фмоль/20 мкл, в то время как средние величины определяемой концентрации ДА была значительно выше (около 120–160 фмоль/20 мкл).

Протокол эксперимента

Мышам однократно вводили МФТП (“Sigma”, Германия) внутривенно, в дозе 20 мг/кг с 30 мкл физиологического раствора. Контрольным животным вводили физиологический раствор в том же объеме. Двигательную активность исследовали в “открытом поле” у одних и тех же мышей сразу, через 7 и 30 сут после инъекции. В эти же сроки проводили исследования с применением микродиализа.

“Открытое поле” представляло собой круглую, хорошо освещенную по центру арену диаметром 50 см, разделенную на секторы. Регистрировали число пересеченных секторов (горизонтальная активность), число стоек (вертикальная активность). Время тестирования составляло 180 с.

В экспериментах по исследованию влияния МФТП сразу после его введения одни и те же мыши служили контролем для самих себя (пять животных). После четырех последовательных отборов микродиализата мышам вводили МФТП внутривентрикулярно и затем отбирали еще четыре последовательных микродиализата. Девяти контрольным и девяти подопытным мышам вводили физиологический раствор и МФТП соответственно. Сразу после введения препарата или физиологического раствора животных помещали в “открытое поле” и тестировали двигательную активность. Тех же 18 мышей повторно тестировали в “открытом поле” через 7 сут после однократного введения МФТП. Четырех контрольных и четырех подопытных (введение МФТП) мышей отбирали для микродиализа (четыре последовательные пробы), сразу после повторного тестирования. Пять контрольных и пять МФТП-инъектированных мышей тестировали в “открытом поле” через 30 сут после однократной инъекции, а затем подвергали микродиализу (четыре последовательные пробы).

Результаты представлены в виде средних арифметических значений $\pm$ стандартная ошибка ($M \pm SEM$). В связи с небольшим объемом выборок распределение некоторых показателей удовлетворяло как нормальному, так и логарифмически нормальному распределению, в силу чего проводилось сопоставление как исходных показателей, так и их логарифмов и было признано целесообразным при проведении расчетов использовать не только параметрические, но и непараметри-

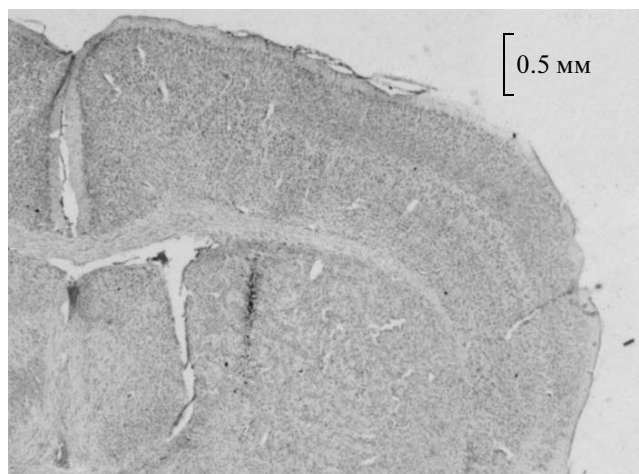


Рис. 2. Фотография среза мозга мыши на уровне стриатума со следами канюли (координаты локализации канюли приведены в тексте).

Fig. 2. Photo of the mouse brain slice at the level of striatum with traces of cannula (position data of cannula are in the text).

ческие критерии. При сопоставлении средних значений в нескольких группах наблюдений применяли однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) с последующим использованием *post-hoc*-критерия Ньюмена — Келлса. При выяснении совместного влияния двух факторов использовали аппарат двухфакторного дисперсионного анализа. Для статистической обработки использовали критерий Фишера, *t*-критерий Стьюдента для независимых и связанных выборок, соответствующие непараметрические критерии Манна — Уитни и Вилкоксона. Заключение с вероятно-

Влияние внутривентрикулярной инъекции МФТП (20мг/кг, внутривентрикулярно) на поведение мышей в “открытом поле”

Influence of intraperitoneal injection of MPTP (20mg/kg, i/p) on mice behavior in the “open field”

Животные	Через 5 мин после инъекции		Через 7 сут после инъекции		Через 30 сут после инъекции	
	горизонтальная активность (число переходов)	вертикальная активность (число стоек)	горизонтальная активность (число переходов)	вертикальная активность (число стоек)	горизонтальная активность (число переходов)	вертикальная активность (число стоек)
Контроль	170.44 $\pm$ 15.81 <i>n</i> = 9	8.22 $\pm$ 0.85 <i>n</i> = 9	159.00 $\pm$ 22.30 <i>n</i> = 4	7.50 $\pm$ 1.94 <i>n</i> = 4	166.20 $\pm$ 30.40 <i>n</i> = 5	8.00 $\pm$ 1.58 <i>n</i> = 5
МФТП	Ретропульсия <i>n</i> = 9	Ретропульсия <i>n</i> = 9	139.25 $\pm$ 26.11 <i>n</i> = 4 <i>F</i> (1, 6) = 0.331; <i>p</i> = 0.586	8.00 $\pm$ 1.83 <i>n</i> = 4 <i>F</i> (1, 6) = 0.035; <i>p</i> = 0.857	19.4 $\pm$ 5.56 <i>n</i> = 5 <i>F</i> (1, 8) = 22.57; <i>p</i> = 0.001	0.60 $\pm$ 0.25 <i>n</i> = 5 <i>F</i> (1, 8) = 21.39; <i>p</i> = 0.002

Примечание. *n* — число животных.

стью случайной ошибки $p < 0.05$ принимались как статистически значимые.

После каждого эксперимента проводили морфологический контроль (рис. 2).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Поведение животных

У всех мышей через несколько минут после внутрибрюшинного введения МФТП наблюдалось отчетливое нарушение двигательного поведения, проявляемого в форме ретропульсии: животные мелкими шажками двигались в обратном направлении, а при редких движениях вперед осуществляли их не прямолинейно, а с поворотами в правую сторону. При этом наблюдался общий тремор тела и напряженный дугообразный хвост. При таком поведении в тесте открытого поля у мышей с введенным токсином практически были нулевые величины горизонтальной (число переходов) и вертикальной активности. Через 7 сут в тесте открытого поля статистически значимой разницы в проявлениях горизонтальной и вертикальной активности у контрольных и МФТП-инъектированных мышей не наблюдалось (таблица). Но на 30-е сутки снова наблюдалось статистически значимое уменьшение обоих типов двигательной активности у МФТП-инъектированных мышей по сравнению с контролем (таблица). При этом у одной МФТП-инъектированной мыши происходило полное торможение двигательного поведения, у двух мышей — уменьшение двигательной активности, а еще у двух — наряду с уменьшением двигательной активности появился общий тремор тела.

Таким образом, поведение мышей, зарегистрированное сразу после введения токсина, спустя неделю и через 1 мес. проявляется в виде неоднозначных двигательных нарушений, различающихся между собой как количественно, так и качественно. По-видимому, в основе этих нарушений лежат разные патофизиологические и биохимические механизмы, которые включают фазу быстрого реагирования организма на интоксикацию, после чего следует медленное развитие и нарастание специализированных нейродегенеративных процессов в нигро-стриатной дофаминергической системе.

Микродиализ

Межклеточная концентрация ДА в стриатуме у МФТП-обработанной группы оказалась статистически значимо меньше, чем у контрольных мышей. Об этом свидетельствуют данные двухфакторного дисперсионного анализа (ANOVA), который показал высокозначимый общий эффект ГРУППЫ [$F(1, 85) = 11.83$; $p < 0.001$], т.е. итог сравнения МФТП-инъектированных и контрольных мышей вне зависимости от времени забора диализата (рис. 3). С другой стороны, общий эффект ВРЕМЕНИ, т.е. результат сравнения межклеточной концентрации ДА в разные периоды времени у всех мышей без разделения их на ГРУППЫ [$F(2, 85) = 0.15$; $p > 0.05$] и взаимодействие эффектов ГРУППЫ и ВРЕМЕНИ [$F(2, 85) = 0.70$; $p > 0.05$] оказались статистически незначимыми.

На рис. 3, А показаны изменения межклеточной концентрации ДА в стриатуме мышей двух групп в разные периоды времени после интоксикации. У МФТП-обработанной группы среднее значение ДА сразу после введения токсина понижалось на 41.1% от значений контрольной группы ($t = 2.64$; $p = 0.02$ по критерию Стьюдента для парных сравнений).

Через неделю после введения токсина снижение межклеточной концентрации ДА под влиянием МФТП хотя и имело место (на 21.7%), но было статистически незначимым ($t = 1.34$; $p = 0.19$ по критерию Стьюдента для независимых выборок). Через 1 мес. после введения МФТП межклеточной концентрации ДА опять значительно понижалась (на 45.7%) по сравнению со средними значениями контрольной группы ($t = 2.35$; $p = 0.025$ по критерию Стьюдента для независимых выборок).

Межклеточная концентрация ДОФУК в стриатуме не зависела от принадлежности мышей к группе с токсическими повреждениями или к контролю, на что указывает статистическая незначимость общего эффекта ГРУППЫ [$F(1, 87) = 0.004$; $p = 0.94$] (рис. 3, Б). Межклеточная концентрация ДОФУК мало менялась также в зависимости от того, сразу, через неделю или месяц после введения МФТП проводили ее исследование [$F(2, 87) = 1.69$; $p = 0.19$]. Статистически незначимым для показателей концентраций ДОФУК было также взаимодействие эффектов ГРУППЫ и ВРЕМЕНИ, хотя оно и имело тенденцию к значимости [$F(2, 87) = 2.41$; $p = 0.09$]. Как

видно из рис. 3, Б, эта тенденция была вызвана существенным увеличением концентрации ДОФУК у МФТП-обработанной группы через 1 мес. после введения токсического вещества.

Парные сравнения с помощью критерия Стьюдента средних значений уровня ДОФУК в контроле и после введения МФТП существенной разницы между ними в первом тестировании ($t = 0.12$; $p = 0.9$) не выявили. Однако через неделю различие средних становилось почти значимым ($p = 0.067$), а различие дисперсий (при однофакторном анализе) по критерию Фишера – статистически значимыми ($p = 0.036$). Наконец, через 1 мес. после введения МФТП различие средних было статистически незначимым ($p = 0.18$), но различие дисперсий становилось высоко значимым ($p < 0.001$), хотя и принимало обратный знак – при введении МФТП вариабельность реакций значительно увеличивалась по сравнению с контролем.

Межклеточная концентрация ГВК в стриатуме менялась статистически незначимо при совместном исследовании всех выборок с помощью двухфакторного дисперсионного анализа (ANOVA), как для исходных, так и для логарифмированных данных. При этом различий не было совсем по общему эффекту ВРЕМЕНИ [$F(1, 86) = 0.41$; $p = 0.66$] и по взаимодействию эффектов ГРУППЫ и ВРЕМЕНИ [$F(2, 86) = 1.35$; $p = 0.26$], тогда как по общему эффекту ГРУППЫ разница была пограничная [$F(1, 87) = 3.09$; $p = 0.08$]. Между тем, как это видно из рис. 3, В, после введения токсина наблюдалось заметное понижение уровня ГВК у МФТП-обработанной группы по сравнению с контрольными мышами. Об этом свидетельствуют как сравнение средних значений ГВК для проб со взаимным соответствием (связанная выборка) по критерию Стьюдента и сравнение сумм рангов разностей значений ГВК по ранговому критерию Вилкоксона, так и сопоставление подопытных и контрольных мышей (по критерию Стьюдента для независимых выборок и ранговому критерию Манна – Уитни). Сразу после введения токсина разница между двумя группами результатов была статистически значимой по первому ($t = 2.52$; $p < 0.01$) и второму ($p = 0.01$) критерию. Аналогично для сравнения экспериментальной группы мышей с ними же до введения (самоконтроль) эффект изменения ГВК был высокосignificant (по парному критерию Стьюдента $t = 3.19$;

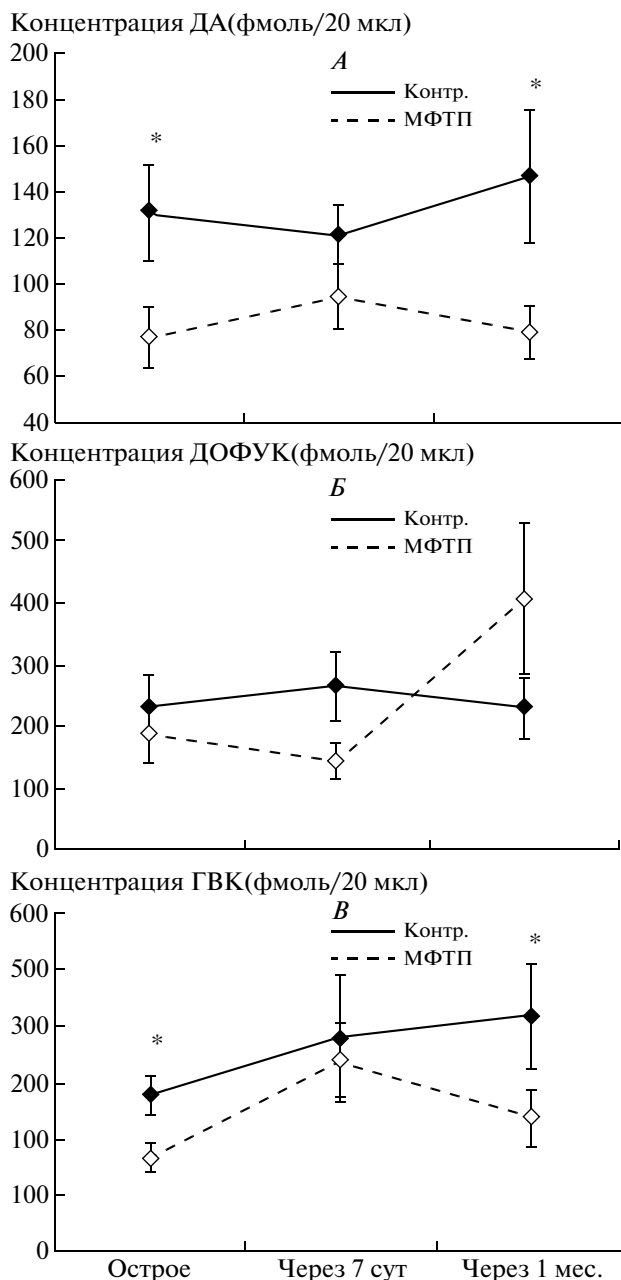


Рис. 3. Межклеточная концентрация дофамина – ДА (А), 3,4-диоксифенилуксусной кислоты – ДОФУК (Б) и гомованилиновой кислоты – ГВК (В) в стриатуме мышей сразу, через 7 и 30 сут после введения МФТП. * – $p < 0.05$, подробное описание статистики см. в тексте.

Fig. 3. Intercellular concentration of dopamine – DA (A), 3,4-dihydroxyphenylacetic acid – DOPAC (B) and homovanillic acid – HVA (B) in the mice striatum immediately, 7 and 30 days after MPTP injection. * – $p < 0.05$, the detailed description of statistics see in the text.

$p < 0.01$, по критерию Вилкоксона $p < 0.01$). Однако через неделю различия по критерию Манна — Уитни ($p = 0.86$) были уже статистически незначимыми, а по критерию Стьюдента ($p = 0.06$) сохраняли тенденцию к значимости. Через 1 мес. разница в уровне ГВК была снова статистически значимой ($p < 0.05$).

Таким образом, нетрудно видеть, что содержание ДА и его метаболитов во внеклеточной жидкости стриатума у МФТП-инъектированных мышей по сравнению с контрольными значениями в те же самые сроки повторяет динамику проявления отмеченных выше двигательных нарушений (исключение составляет ДОФУК через месяц после инъекции).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Главным результатом настоящих исследований явилось то, что использованная нами микродиализная канюля позволила выявить соответствие поведенческих и биохимических изменений у мышей линии C57BL/6 в разные интервалы времени после введения однократной дозы (20 мг/кг) специализированного токсического агента МФТП, без каких-либо добавочных фармакологических воздействий, увеличивающих концентрацию межклеточного ДА в стриатуме. Сразу после введения МФТП происходило резкое нарушение поведения в форме ретропульсии — появление дрожащих отступательных реакций с редкими движениями вперед и заворотами в правую сторону — и существенное снижение уровня внеклеточного ДА и ГВК в стриатуме. Важно подчеркнуть, что тестирование до и после введения МФТП в 1-й день проводилось на одних и тех же мышах, поэтому для оценки и сравнения полученных результатов использовали иные статистические методы исследования, чем при сравнении результатов для разных групп животных на 7-й день и спустя 1 мес. Через неделю после введения вещества поведение у МФТП-инъектированных мышей в “открытом поле” достоверно не отличалось по горизонтальной и вертикальной активности от такового у контрольных животных, а содержание ДА и его метаболитов в стриатуме хотя и было чуть ниже, но без достоверной разницы, чем у контрольных животных. Наконец, через 1 мес. после введения МФТП у мышей наблюдались все признаки двигательных расстройств, характерных для нигро-стриатных поврежде-

ний, и сопутствующие этим расстройствам значительные понижения внеклеточной концентрации дофамина и ГВК в стриатуме.

Нейротоксичность МФТП опосредована его моноаминоксидаза-В (МАО-В) производимым метаболитом, 1-метил-4-фенил-пиридин (МФП⁺) [29], который накапливается в терминалах нигро-стриатных нейронов, богатых ДА [12], транспортируется в митохондрии [16], где ингибирует окисление (НАДН⁺) и митохондриальный комплекс I [28]. Это приводит к усилению окислительного стресса, повышению уровня внутриклеточного Ca²⁺ и эксцитотоксичности, уменьшению продуцирования энергии и в конечном счете — к повреждению и смерти клеток. Сродство МФП⁺ к транспортеру ДА настолько высоко, что в экспериментах *in vitro* он вытесняет ДА со специфических мест связывания транспортера и ведет к накоплению ДА в инкубационной среде [8]. Специфический ингибитор транспортера дофамина GBR 13098 полностью снимает токсический эффект МФТП [20, 21].

Полученные нами результаты позволяют сделать несколько предположений. Можно думать, что немедленное нарушение двигательного поведения и резкое уменьшение стриатного дофамина и ГВК в ответ на введение МФТП являются следствием влияния МФТП на синтез и метаболизм дофамина. Показано, что в течение первых 6 ч после введения МФТП (50 мг/кг, подкожно) синтез и метаболизм ДА существенно меняется [19]. В течение 1 ч после введения МФТП наблюдается уменьшение концентрации ДА, L-ДОФА, ДОФУК и увеличение концентрации 3-метокситирамина в ткани стриатума мышей. К 75-й минуте наблюдалось дальнейшее истощение ДА, дополнительное увеличение 3-метокситирамина и увеличение ГВК. Спустя 6 ч после введения МФТП концентрации ДА и всех его метаболитов были также понижены. В другой работе из этой же лаборатории [21] эффект такой же дозы МФТП исследовали через 2 ч и 7 сут. Через 7 сут, так же как через 2 ч, наблюдали уменьшение концентрации ДА и ДОФУК и увеличение концентрации ГВК в ткани стриатума. Различия между нашими результатами и данными литературы могли быть вызваны двумя причинами. Во-первых, мы использовали значительно меньшую дозу МФТП (20 мг/кг, а не 50 мг/кг). Во-вторых, мы исследовали *in vivo* диализат из стриатума, а описанные выше данные лите-

ратуры касаются измерения концентрации веществ в ткани мозга.

На 7-е сутки при однократной инъекции дозы МФТП 50 мг/кг [22] и даже дозы 30 мг/кг [6] уже проявляется дегенерация нигро-стриатной ДАергической системы, возможно, поэтому концентрационные сдвиги в цитируемых работах настолько значительны. Доза 20 мг/кг, использованная нами, значительно меньше, и возможно, поэтому недостоверное уменьшение концентраций отражает только самое начало дегенерационного процесса. Этому соответствует и отсутствие изменений в двигательной активности.

Проявление нарушений поведения через несколько минут после введения МФТП, его нормализация через 7 сут и повторное нарушение поведения через 30 сут позволяют предположить, что повторное нарушение поведения, сопровождаемое уменьшением межклеточной концентрации ДА в стриатуме (рис. 3), связано с токсическим действием МФТП и с разрушением нигро-стриатной ДА-системы. Анализ результатов по межклеточной концентрации ДОФУК на 30-е сутки показывает, что к этому моменту времени метаболизм ДА через моноаминоксидазу-А резко нарушается, т.е. принимает нестабильный характер. У ряда животных межклеточная концентрация ДОФУК сильно варьирует, что выражается в проявлении высокой значимости различия дисперсий в сравниваемых группах при дисперсионном анализе (см. раздел Результаты исследований). Это можно объяснить, по-видимому, тем, что у разных животных нигро-стриатная ДАергическая система нарушена в разной степени. Разная степень нарушений отражается и в поведении животных (см. раздел “Результаты исследований”).

В литературе применяют разные тесты для оценки влияния МФТП на двигательную активность мышей, причем, как правило, токсический агент вводят не однократно, а в течение ряда дней и разными дозами [5, 26]. Например, В.А. Колотла и соавт. [3] инъецировали мышам МФТП (в дозах 10, 20 и 30 мг/кг) в течение 3 дней подряд, а двигательную активность оценивали по пройденному мышами общему расстоянию за единицу времени в 3 последующих дня. Мыши, которые получали МФТП, проходили больший путь, чем контрольные животные, и длина этого пути находилась в зависимости от дозировки вводимого вещества. Сходные данные

были получены в другой работе [13], в которой также использовалось многократное (5 дней подряд, 30 мг/кг) введение МФТП, а проверка двигательной активности проводилась в 1-й, 3-й, 5-й и 7-й дни. В отличие от указанных данных многократное введение МФТП (10 дней по 30 мг/кг) не облегчало, а тормозило двигательную активность, оцениваемую с помощью плавания [5]. Примечательно, что авторы тестировали ее через 30 мин, 24 ч и 7 дней после введения МФТП и в эти же сроки измеряли содержание дофамина в ткани стриатума. Несмотря на то что поведение мышей существенно страдало только в первые 30 мин после интоксикации, содержание стриатного дофамина у МФТП-инъецированных мышей уменьшалось во всех случаях — на 13.9% через 30 мин, на 17.3% через 24 ч, и на 26.4% через 7 дней. Необходимо отметить, что в условиях, наиболее напоминающих нашу экспериментальную обстановку, И. Лерокс-Николлет и Дж. Констендин [14] наблюдали значительное торможение двигательной (горизонтальной и вертикальной) активности мышей в “открытом поле”. Но в отличие от нас авторы исследовали двигательную активность мышей только в первые 8 ч после введения МФТП. В другой работе Р.К. Швартинг и соавт. [26] после многократных введений МФТП (15 и 20 мг/кг по 4 раза) обнаружили существенное торможение горизонтальной и вертикальной двигательной активности в “открытом поле” через 2 ч после последней инъекции. Горизонтальная активность возвращалась к норме через 4 дня, а вертикальная, коррелирующая со степенью потери стриатного дофамина, оставалась в эти сроки ниже нормы.

Таким образом, приведенные данные свидетельствуют о том, что поведенческие и биохимические показатели активности мышей под воздействием МФТП находятся в зависимости от дозы токсического вещества, характера его введения, времени последующего тестирования этих показателей и ряда других, не обсуждаемых здесь переменных [24, 25]. Практически во всех случаях мыши МФТП-группы отличаются от контрольных животных, но эти различия проявляют во времени разную динамику — от постоянного торможения всех реакций до их прогрессивного усиления или в виде смешанных возбуждительно-тормозных реакций (когда на раннем отрезке времени происходит усиление двигательного поведения, а затем его торможение). В нашем

исследовании была получена четкая $\cap$ -образная зависимость — вначале торможение двигательной активности, затем возвращение ее к норме и потом снова торможение. Причем такая же динамика во времени наблюдалась для внеклеточной концентрации дофамина и ГВК в стриатуме.

Известно, что большие дозы или такая же доза (что использовали мы), но применяемая многократно, часто приводит к летальности мышей [11, 26] или к очень серьезной нервной дегенерации, которая находит отражение либо в чрезмерном возбуждении, либо в преобладании тормозных эффектов, в том числе на биохимическом уровне. Что особенно важно, нашей целью было не вызвать массивные нейродегенеративные изменения в nigro-стриатной системе и вне ее, а добиться плавного, медленно развивающегося процесса нейродегенерации на уровне этой системы для выявления критического момента, с которого начинает проявляться поведенческая и биохимическая симптоматика заболевания. По нашим данным, этот момент находится где-то между 1-й и 4-й неделей после интоксикации, а до него заболевание протекает в виде латентной фазы.

ВЫВОДЫ

1. Сразу после введения МФТП наблюдалось значительное нарушение поведения мышей и достоверное уменьшение межклеточной концентрации дофамина и гомованилиновой кислоты в стриатуме. Такое уменьшение межклеточной концентрации дофамина и гомованилиновой кислоты в стриатуме связано с нарушением синтеза и метаболизма дофамина вызванным воздействием МФТП.

2. Через 7 сут ни поведение мышей, ни межклеточная концентрация ДА и его метаболитов в стриатуме достоверно не отличались от контроля.

3. Через 30 сут вновь наблюдалось нарушение поведения у мышей и значительное уменьшение межклеточной концентрации дофамина и его метаболита гомованилиновой кислоты в стриатуме. Уменьшение межклеточной концентрации дофамина в стриатуме через 30 сут после инъекции МФТП связано с разрушением nigro-стриатной ДАергической системы.

Работа выполнена при поддержке Программы Президиума РАН “Фундаментальные науки — медицине”.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Кориунов В.А.* Микродиализ у свободноподвижных животных с одновременной регистрацией электрофизиологических процессов в точке забора диализата. *Рос. физиол. журн.* 2005. 91:700–705.
2. *Bezard E., Dovero S., Imbert C., Boraud T., Gross C.E.* Spontaneous long-term compensatory dopaminergic sprouting in MPTP-treated mice. *Synapse*. 2000. 38:363–368.
3. *Colotla V.A., Flores E., Ocos A., Meneses A., Tapia R.* Effects of MPTP on locomotor activity in mice. *Neurotoxicol. Teratol.* 1990. 12:405–407.
4. *Decamp E., Wade T., Schneider J. S.* Differential regulation of striatal dopamine D₁ and D₂ receptors in acute and chronic parkinsonian monkeys. *Brain Res.* 1999. 847:134–138.
5. *Donnan G.A., Willis G.L., Kaczmarczyk S.J., Rowe P.* Motor function in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-treated mouse. *J. Neurol. Sci.* 1987. 77:185–191.
6. *Fornai F., Schluter O. M., Lenzi P., Gesi M., Ruffoli R., Ferrucci M., Lazzeri G., Busceti C.L., Pontarelli F., Battaglia G., Pellegrini A., Nicoletti F., Ruggieri S., Paparelli A., Sudhof T.C.* Parkinson-like syndrome induced by continuous MPTP infusion: Convergent roles of the ubiquitinproteasome system and α -synuclein. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 2005. 102:3413–3418.
7. *Fuxe K., Janson A.M., Rosen L., Finnman U.B., Tanganelli S., Morari M., Goldstein M., Agnati L.F.* Evidence for a protective action of the vigilance promoting drug modafinil on the MPTP-induced degeneration of the nigrostriatal dopamine neurons in the black mouse: an immunocytochemical and biochemical analysis. *Exp. Brain Res.* 1992. 88:117–130.
8. *Gainetdinov R.R., Fumagalli F., Jones S.R., Caron M.G.* Dopamine transporter is required for *in vivo* MPTP neurotoxicity: evidence from mice lacking the transporter. *J. Neurochem.* 1997. 69:1322–1325.
9. *German D.C., Nelson E.L., Liang C.L., Speciale S.G., Sinton C.M., Sonsalla P.K.* The neurotoxin MPTP causes degeneration of specific nucleus A8, A9 and A10 dopaminergic neurons in the mouse. *Neurodegeneration*. 1996. 5:299–312.
10. *Jackson-Lewis V., Jakowec M., Burke R.E., Przedborski S.* Time course and morphology of dopaminergic neuronal death caused by the neurotoxin 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. *Neurodegeneration*. 1995. 4:257–269.
11. *Jakowec M.W., Petzinger G.M.* 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine lesioned model of parkinson's disease, with emphasis on mice and nonhuman primates. *Comp. Med.* 2004. 54:497–513.
12. *Javitch J.A., D'Amato R.J., Strittmatter S.M., Snyder S.H.* Parkinsonism-inducing neurotoxin N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine: uptake of the metabolite N-methyl-4-phenylpyridine by

- dopamine neurons explains selective toxicity. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 1985. 82:2173–2177.
13. Kordower J.H., Felten S.Y., Felten D.L., Gash D.M. Behavioral sequelae following MPTP administration in mice. MPTP: A Neurotoxin Producing a Parkinsonian Syndrome. Eds Markey S.P., Castagnoli N.Jr., Trevor A.J., Kopin I.J. Orlando: Acad. Press. 1986: 413–417.
 14. Leroux-Nicollet I., Costentin J. Acute locomotor effects of MPTP in mice and relationships with dopaminergic systems. MPTP: A Neurotoxin Producing a Parkinsonian Syndrome. Eds Markey S.P., Castagnoli N.Jr., Trevor A.J., Kopin I.J. Orlando: Acad. Press. 1986: 419–424.
 15. Liu B., Gao H.M., Hong J.S. Parkinson's disease and exposure to infectious agents and pesticides and the occurrence of brain injuries: role of neuroinflammation. *Environ. Health Perspect.* 2003. 111:1065–1073.
 16. Mandemakers W., Morais V.A., De Strooper B. A cell biological perspective on mitochondrial dysfunction in Parkinson disease and other neurodegenerative diseases. *J. Cell Sci.* 2007. 120:1707–1716.
 17. Novikova L., Garriss B.L., Garriss D.R., Lau Y.S. Early signs of neuronal apoptosis in the substantia nigra pars compacta of the progressive neurodegenerative mouse 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine/probenecid model of Parkinson's disease. *Neurosci.* 2006. 140:67–76.
 18. Paxinos G., Franklin K.B.J. The mouse brain in stereotaxic coordinates. San Diego, San Francisco, New York, Boston, London, Sydney, Tokyo: Acad. Press. 2001.
 19. Piffl C., Hornykiewicz O. Dopamine turnover is up-regulated in the caudate/putamen of asymptomatic MPTP-treated rhesus monkeys. *Neurochem. Int.* 2006. 49:519–524.
 20. Pileblad E., Carlsson A. Catecholamine-uptake inhibitors prevent the neurotoxicity of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) in mouse brain. *Neuropharmacology*. 1985. 24:689–692.
 21. Pileblad E., Carlsson A. Studies on the acute and long-term changes in dopamine and noradrenaline metabolism in mouse brain following administration of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP). *Pharmacol. Toxicol.* 1988. 62:213–222.
 22. Pileblad E., Fornstedt B., Clark D., Carlsson A. Acute effects of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine on dopamine metabolism in mouse and rat striatum. *J. Pharm. Pharmacol.* 1985. 37:707–711.
 23. Richard M.G., Bennett J.P.Jr. NMDA receptor blockade increases *in vivo* striatal dopamine synthesis and release in rats and mice with incomplete, dopamine-depleting, nigrostriatal lesions. *J. Neurochem.* 1995. 64:2080–2086.
 24. Sedelis M., Hofele K., Auburger G.W., Morgan S., Huston J.P., Schwarting R.K. Evidence for resistance to MPTP in C57BL/6 x BALB/c F1 hybrids as compared with their progenitor strains. *Neuroreport*. 2000. 11:1093–1096.
 25. Sedelis M., Hofele K., Auburger G.W., Morgan S., Huston J.P., Schwarting R.K. MPTP susceptibility in the mouse: behavioral, neurochemical, and histological analysis of gender and strain differences. *Behav. Genet.* 2000. 30:171–182.
 26. Schwarting R.K., Sedelis M., Hofele K., Auburger G.W., Huston J.P. Strain-dependent recovery of open-field behavior and striatal dopamine deficiency in the mouse MPTP model of Parkinson's disease. *Neurotox. Res.* 1999. 1:41–56.
 27. Staal R.G., Sonsalla P.K. Inhibition of brain vesicular monoamine transporter (VMAT2) enhances 1-methyl-4-phenylpyridinium neurotoxicity *in vivo* in rat striata // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2000. 293: 336–342.
 28. Vila M., Przedborski S. Targeting programmed cell death in neurodegenerative diseases. *Nat. Rev. Neurosci.* 2003. 4:365–375.
 29. Wu W.-R., Zhu Z.-T., Zhu X.-Z. Differential effects of L-deprenyl on MPP⁺ and MPTP-induced dopamine overflow in microdialysates of striatum and nucleus accumbens. *Life Sci.* 2000. 67:241–250.