

Изменения в нигростриатных образованиях мозга при моделировании паркинсонизма, индуцированного ротеноном (количественное иммуноморфологическое исследование)

Д.Н. Воронков, Ю.В. Дикалова, Р.М. Худоевков, Н.Г. Ямщикова

ФГБУ «Научный центр неврологии» РАМН (Москва)

Для исследования одного из наиболее распространенных заболеваний нервной системы — паркинсонизма — у крыс Вистар моделировали данное состояние путем длительного введения пестицида ротенона, после чего методами иммуноморфологии и компьютерной морфометрии изучали изменения нейронов и нейроглии в нигростриатных образованиях мозга. Обнаружили, что под влиянием ротенона у животных снижалась двигательная активность и появлялись симптомы экспериментального паркинсонизма, что сопровождалось уменьшением в черной субстанции интенсивности окрашивания на тирозингидроксилазу в отростках нейронов и накоплением α -синуклеина в телах нейронов, а также значимым уменьшением числа дофаминовых нейронов в ростральном отделе черной субстанции. В дорсальном отделе стриатума обоих полушарий мозга ротенон вызывал очаги деструкции, окруженные валом активированных астроцитов. Таким образом, модель паркинсонизма, индуцированного ротеноном, характеризуется дегенеративными изменениями дофаминовых нейронов черной субстанции с отложением в них агрегатов α -синуклеина, локальной и симметричной деструкцией структур стриатума с вовлечением в процесс дофаминергических волокон, нейронов, нейроглии и церебральных сосудов, что, вероятно, является следствием нарушения митохондриального дыхания, вызываемого ротеноном.

Ключевые слова: паркинсонизм, головной мозг, стриатум, черная субстанция, митохондриальные токсины, иммуногистохимия, тирозингидроксилаза, глиофибрилярный кислый астроцитарный белок, α -синуклеин

Паркинсонизм представляет собой клинический синдром, характерный для обширной группы нейродегенеративных заболеваний, к которым в первую очередь относят болезнь Паркинсона, множественную системную атрофию, прогрессирующий супрануклеарный паралич и др., для которых общим является повреждение дофаминергической иннервации базальных ядер мозга [9]. Предполагается, что в основе развития паркинсонизма лежит сочетание генетической предрасположенности и влияния токсичных факторов окружающей среды [6, 16]. Так, в районах США с развитым индустриальным производством и сельским хозяйством болезнь Паркинсона регистрируется достоверно чаще [11]. Кроме того, ряд исследований указывают на взаимосвязь между применением в сельском хозяйстве пестицидов, в частности, ротенона, и возникновением болезни Паркинсона [12, 15].

Одной из причин гибели дофаминовых нейронов при болезни Паркинсона считается нарушение функций митохондрий, приводящее к окислительному стрессу. В эксперименте *in vitro* ротенон нарушал синтез и сборку белков цитоскелета, репликацию ДНК, везикулярный транспорт медиаторов [26], а при системном введении он повреждал центральные и периферические дофаминовые нейроны [3].

Причины повышенной уязвимости дофаминовых нейронов могут заключаться в токсичности метаболитов дофамина, образующихся в результате неферментативного окисления. Отмечено, что активация свободнорадикальных процессов нарушает работу убиквитин-протеасомной системы [27], что приводит к агрегации α -синуклеина в нейронах и образованию агрегатов, похожих на тельца Леви [23] — специфические для болезни Паркинсона включения. В связи с вышеизложенным, воспроизведение паркинсонизма с помощью пестицида ротенона может служить удобной моделью для изучения закономерностей развития нейродегенеративного процесса в нигростриатных образованиях мозга.

Цель работы: методами иммуноморфологии и компьютерной морфометрии исследовать изменения нейронов и нейроглии в нигростриатных образованиях мозга крыс при моделировании паркинсонизма с помощью ротенона.

Материалы и методы

Работу проводили на крысах Вистар, самцах, с массой тела 180–200 г, соблюдая «Правила обращения с лабораторными животными». Экспериментальной группе (n=17) еже-

дневно, длительно (до 4-х недель), подкожно вводили ротенон в дозе 2,5 мг/кг, растворенный в диметилсульфоксиде и смешанный с растительным маслом в соотношении 2:98 [10]. Действие ротенона на поведение животных оценивали визуально и на основании их двигательной активности в тесте «открытое поле» в течение всего срока эксперимента.

Для иммуноморфологического исследования были выделены три группы: первая группа получала ротенон одну неделю (n=5), вторая – четыре недели (n=7), третья группа крыс (n=6) служила интактным контролем. Мозг животных, декапитированных гильотиной, фиксировали в 4%-ном растворе формалина, заливали в парафиновые блоки и раскладывали на фронтальные срезы, толщиной 7 мкм. Уровень срезов определяли по атласу мозга крысы [18]. Иммуногистохимическим avidин-пероксидазным методом, следуя протоколу производителя антител (Sigma), в nigrostriатных образованиях мозга выявляли локализацию тирозингидроксилазы, служащей маркером дофамина в телах и отростках нейронов, α -синуклеин, указывающий на нарушение синтеза и сборки белков в нейронах, и специфические белки астроцитарной нейроглии – кислый глиофибрилярный белок (GFAP) и глутаминсинтетазу. Окрашивание конго красным использовали для выявления в ткани амилоида по дихроизму в поляризованном свете [4]; при окрашивании срезов мозга красителем FluoroJade-C [21] выявляли дегенерирующие нейроны с помощью микроскопа Carl Zeiss Fluoval. Для морфологического контроля срезы окрашивали крезиловым фиолетовым и гематоксилин-эозином. Подсчет клеточных элементов, нейронов и нейроглии и интенсивность иммуноокрашивания ткани хвостатого ядра на GFAP и тирозингидроксилазу выполняли при помощи микроскопа Leica DMLB, оснащенного цифровой фотокамерой Leica DC-300 и программой Leica Qwin [2]. Полученные данные обрабатывали непараметрическими методами статистики (тест Манна-Уитни, ANOVA Краскелл-Уоллиса) при помощи программы Statistica 6.0.

Результаты

У крыс, получавших инъекции ротенона, начиная с первой недели, наблюдали симптомы, характерные для экспериментального паркинсонизма: дискинезию, птоз верхнего века и согбенную позу животного с загнутым хвостом, что являлось следствием ригидности мышц туловища и хвоста. Двигательная активность животных при тестировании в «открытом поле» снижалась в зависимости от длительности введения ротенона (рис. 1А). В процессе эксперимента токсическое действие ротенона привело к гибели 30% животных, максимум летальности приходился на первые две недели введения препарата.

Под влиянием ротенона иммуноокрашивание на тирозингидроксилазу в телах и отростках нейронов компактной части черной субстанции снижалось (рис. 1Б, 2А), а плотность распределения нейронов по сравнению с контролем значительно уменьшалась на 25% в ростральном отделе компактной части черной субстанции, в области, расположенной на удалении от -4,7 до -4,9 мм от брегмы (рис. 1В). Иммуногистохимическая реакция на α -синуклеин под влиянием ротенона характеризовалась неравномерной локализацией в телах нейронов черной субстанции, что проявлялось от слабого до интенсивного окрашивания агрегированного белка (рис. 2Б).

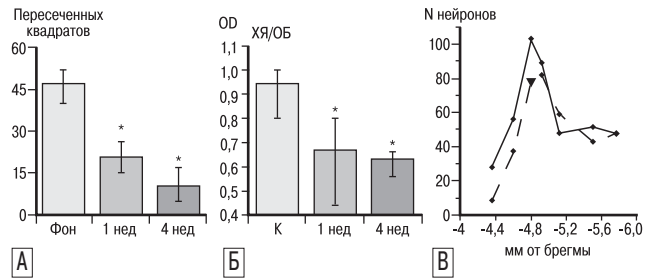


рис. 1: Количественные изменения двигательной активности и дофаминергических структур в nigrostriатной системе животных, получавших ротенон.

А – изменения двигательной активности животных (число пересеченных квадратов в тесте «открытое поле», медиана по группе), получавших ротенон на протяжении одной (1 нед) и четырех (4 нед) недель по сравнению с исходными значениями (Фон). * - $p < 0,05$ тест ANOVA Краскелл-Уоллиса. Показаны медианы и квартили в группах.

Б – снижение иммуноокрашивания на тирозингидроксилазу в стриатуме крыс, получавших ротенон на протяжении одной и четырех недель, в сравнении с контрольной группой (К). Представлено отношение интенсивности окрашивания хвостатого ядра (ХЯ) и обонятельных бугорков (ОБ). Обозначения – как на рис. 1А. В – распределение числа дофаминовых нейронов (медиана) черной субстанции по rostrocaudальной оси в мозге крыс, получавших ротенон на протяжении одной недели (пунктир «---»), в сравнении с контрольной группой (сплошная линия «—»). Треугольником «▼» отмечена область статистически значимого ($p < 0,05$, критерий χ^2 , критерий Манна-Уитни) снижения числа нейронов.

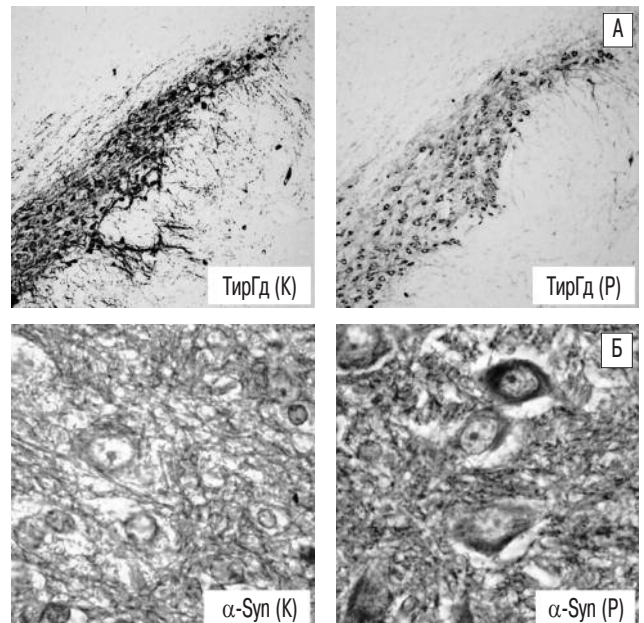


рис. 2: Иммуноморфологические изменения в черной субстанции крыс под действием ротенона.

А, Б – структуры мозга животных контрольной группы (К) и получавших ротенон (Р) ежедневно на протяжении одной недели. А – локализация тирозингидроксилазы – ТирГд (микрофото, об. x 3,2); Б – локализация α -синуклеина – α -Syn, с подкрашиванием крезиловым фиолетовым для выявления ядер нейронов (микрофото, об. x 100).

В дорсолатеральной части стриатума обоих полушарий мозга у всех подопытных крыс, вне зависимости от длительности эксперимента, регистрировали очаг деструкции

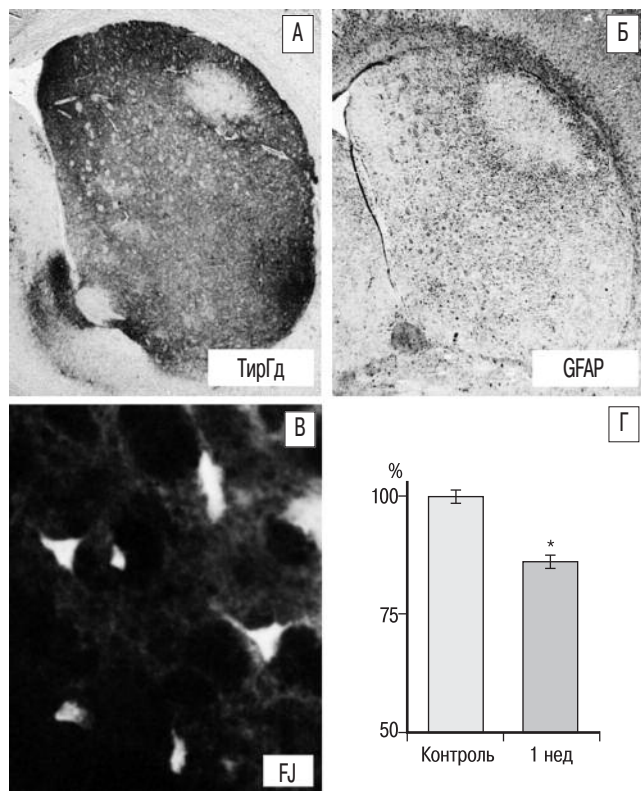


рис. 3: Иммуноморфологические изменения в стриатуме крыс под действием ротенона.

А, Б, В – структуры мозга животных, ежедневно получавших ротенон на протяжении одной недели: А, ТирГД – локализация тирозингидроксилазы (микрофото, об. х 3,2); Б, GFAP – локализация кислого глиофибрилярного белка (микрофото, об. х 3,2); В, FJ – дегенерирующие нейроны стриатума, выявляемые с помощью красителя FluoroJade (микрофото, об. х 40).

Г – снижение числа нейронов стриатума под действием ротенона (показано в процентах от интактного контроля).

* - $p < 0,05$, критерий Манна-Уитни.

дофаминергических волокон, окруженный волокнами с уменьшенной экспрессией тирозингидроксилазы. Очаг занимал от 15 до 35% площади фронтального среза стриатума и значимо не менялся на протяжении эксперимента, но иммунореактивность окружающих его волокон постепенно уменьшалась (рис. 1Б, 3А). Плотность распределения нейронов в очаге повреждения, выявляемых при подкрашивании по Нисслю, уменьшалась, начиная с первой недели эксперимента. Нейродегенерация в дорсальном стриатуме была подтверждена и при окрашивании срезов мозга флуоресцентным красителем FluoroJade, выявляющим погибшие нейроны (рис.3В). При этом ротенон не влиял на интенсивность окрашивания на тирозингидроксилазу в структурах мезолимбической системы. Реакция на GFAP в очаге дофаминовой денервации значимо снижалась и при этом уменьшалось количество выявляемых астроцитов (рис. 3Б). Однако на границе очага повреждения формировался глиальный вал из активированных астроцитов, содержащих GFAP. Аналогичные изменения астроглии обнаруживали и при исследовании иммуногистохимической локализации глутаминсинтетазы – фермента, участвующего в обмене глутамата и содержащегося в отростках астроцитов.

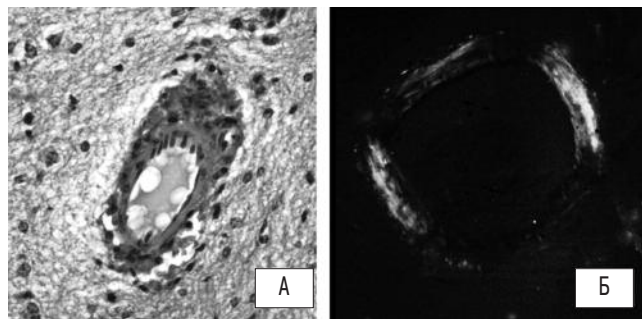


рис. 4: Изменения церебральных сосудов крыс, получавших инъекции ротенона.

А – периваскулярный отек и геморрагии в стриатуме, окраска гематоксилин-эозином;

Б – выявление амилоида в поляризованном свете (свечение) при окраске конго красным в стенке артериолы (микрофото, об. х 40).

На срезах мозга, окрашенных гематоксилин-эозином, наблюдали множественные фокальные геморрагии, преимущественно в подкорковых структурах мозга, в т.ч., в области черной субстанции и стриатума (рис. 4А). При окрашивании конго красным с последующей регистрацией дихроизма в поляризованном свете выявляли накопление амилоида в стенке артериол головного мозга (рис. 4Б). Кроме того, при исследовании брюшной полости животных обнаруживали геморрагии в серозной оболочке кишечника и сальника.

Обсуждение

Ротенон, обладающий свойствами ингибитора митохондриального дыхания, в отличие от токсинов, широко применяемых для воспроизведения дегенерации дофаминовых нейронов (6-OHDA и MPTP), не оказывает избирательного действия на дофаминергические структуры и при системном введении в больших дозах (10–20 мг/кг) вызывает множественные патологические изменения в различных органах и тканях [13, 19]. Однако, как показало проведенное исследование, ротенон в более низких дозах влияет преимущественно на структуры nigrostriatalной системы, что отмечают и другие авторы [13, 22, 23], а это поднимает вопрос о причинах повышенной уязвимости дофаминергических образований мозга при нарушениях митохондриального дыхания. Полученные результаты свидетельствуют в первую очередь о выраженном влиянии ротенона на отростки дофаминовых нейронов, причем отмечается характерная локализация повреждений в дорсальном стриатуме и локальное снижение численности дофаминовых нейронов в отдельной области черной субстанции. При этом выраженная гибель нейронов, по данным литературы [13, 23], отмечается после 4-й недели введения ротенона. Предполагается, что окислительный стресс, вызываемый ротеноном, приводит к нарушениям сборки, транспорта и деградации белков [7, 25], о чем свидетельствует и выявленное нами избыточное накопление α -синуклеина в нейронах черной субстанции. В свою очередь, накопление этого белка в нейронах связывают [14] со степенью нарушений внутриклеточного дыхания. Отсутствие в нашем эксперименте сформированных телец Леви, можно объяснить тем, что наблюдаемые изменения α -синуклеина отражают более ранний этап патологического процесса. Следовательно, можно предположить, что выраженное нарушение дофаминовой иннервации стри-

тума предшествует гибели нейронов черной субстанции. В связи с этим важно отметить, что и на других моделях при воздействии токсинов была показана более высокая чувствительность системы синтеза дофамина в отростках, чем в телах нейронов [5, 20], и нарушение ротеноном везикулярного транспорта дофамина [8, 29]. Не исключено, что локальное повреждение в стриатуме дофаминовых окончаний и гибель в этом очаге проекционных нейронов стриатума под действием ротенона, возможно, провоцируют ретроградную нейродегенерацию в черной субстанции.

Выявленная под действием ротенона гибель нейронов стриатума свидетельствует об их повышенной чувствительности к нарушению внутриклеточного дыхания, что также согласуется с действием другого митохондриального токсина — 3-нитропропионовой кислоты [1]. В то же время, локальное повреждение ротеноном астроглии в стриатуме и при этом ее активация вокруг поврежденной области обычно не характерны для моделей болезни Паркинсона [22]. Можно предположить, что повреждение астроглии в стриатуме может провоцировать развитие эксайтотоксических реакций и способствовать гибели нейронов стриатума по аналогии с установленными механизмами ишемического повреждения нервной ткани [17].

По-видимому, важную роль в ротенон-индуцированной нейротоксичности играют и выявленные нами сосуди-

стые нарушения, что отмечалось ранее в литературе [19]. Существенное значение в повреждении структур стриатума под действием ротенона может быть связано со слабым развитием в его структурах коллатералей сосудов [24], что определяет его высокую подверженность ишемии [28]. Следовательно, действие ротенона на нигростриатную систему не однозначно. Выявленные нами изменения дофаминовой иннервации и накопление α -синуклеина в нейронах черной субстанции соответствуют картине болезни Паркинсона, но гибель нейронов стриатума более характерна для других паркинсоноподобных расстройств [13].

Таким образом, по результатам комплексного иммуноморфологического исследования было показано, что ротенон повреждает не только тела и отростки дофаминовых нейронов черной субстанции с накоплением α -синуклеина в их телах, но и формирует в стриатуме правого и левого полушарий мозга локальные очаги повреждения, в которые вовлекаются дофаминовые волокна нигростриатной системы, нейроны стриатума, клетки астроглии и микроциркуляторное русло сосудов головного мозга. Выявленные в настоящей работе морфохимические изменения отражают многофакторность синдрома паркинсонизма, вызываемого нейротоксинами, и подчеркивают роль нарушений митохондриального дыхания при повреждении нигростриатной системы.

Список литературы

1. Степанова М.С., Беляев М.С., Стволинский С.Л. Действие карнозина на крыс при гипоксии, отягощенной 3-нитропропионатом. *Нейрохимия* 2005; 22: 128–132.
2. Худоевков Р.М., Воронков Д.Н. Количественная оценка нейронов и нейроглии с помощью компьютерной морфометрии. *Бюлл. эксперим. биол. мед.* 2010; 1: 109–113.
3. Alam M., Schmidt W.J. 1-DOPA reverses the hypokinetic behavior and rigidity in rotenone-treated rats. *Behav. Brain Res.* 2004; 153: 439–446.
4. Bancroft J.D., Gamble M. *Theory and Practice of Histological Techniques*. 5th ed. London: Churchill Livingstone 2002: 303–320.
5. Betarbet R., Sherer T.B., MacKenzie G. et al. Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson's disease. *Nat. Neurosci.* 2000; 3: 1301–1306.
6. Cicchetti F., Drouin-Ouellet J., Gross R.E. Environmental toxins and Parkinson's disease: what have we learned from pesticide-induced animal models? *Trends Pharmacol. Sci.* 2009; 30: 475–483.
7. Choi W.-S., Palmiter R.D., Zhengui X. Loss of mitochondrial complex I activity potentiates dopamine neuron death induced by microtubule dysfunction in a Parkinson's disease model. *Cell Biol.* 2011; 192: 873–882.
8. Choi W.-S., Kruse S.E., Palmiter R.D. et al. Mitochondrial complex I inhibition is not required for dopaminergic neuron death induced by rotenone, MPP+, or paraquat. *PNAS* 2008; 105: 15136–15141.
9. Dickson D.W. Parkinson's Disease and Parkinsonism: Neuropathology. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 2012; 2 (8): doi: 10.1101/cshperspect.a009258.
10. Drolet R.E., Cannon J.R., Montero L. et al. Chronic rotenone exposure reproduces Parkinson's disease gastrointestinal neuropathology. *Neurobiol. Dis.* 2009; 36: 96–102.
11. Fritsch T., Smyth K.A., Wallendal M.S. et al. Parkinson Disease: Research Update and Clinical Management. *South Med. J.* 2012; 105: 650–656.
12. Gorell J.M., Johnson C.C., Rybicki B.A. et al. The risk of Parkinson's disease with exposure to pesticides, farming, well water, and rural living. *Neurology* 1998; 50: 1346–1350.
13. Höglinger G.U., Feger J., Prigent A. et al. Chronic systemic complex I inhibition induces a hypokinetic multisystem degeneration in rats. *J. Neurochem.* 2003; 84: 491–502.
14. Lehmsiek V., Tan E.M., Schwarz J. et al. Expression of mutant alpha-synucleins enhances dopamine transporter-mediated MPP+ toxicity in vitro. *Neuroreport* 2002; 13: 1279–1283.
15. Liou H.H., Tsai M.C., Chen C.J. et al. Environmental risk factors and Parkinson's disease: a case-control study in Taiwan. *Neurology* 1997; 48: 1583–1588.
16. Massano J., Bhatia K.P. *Clinical Approach to Parkinson's Disease: Features, Diagnosis, and Principles of Management*. Cold Spring Harb. Perspect. Med. 2012; 2 (6): doi: 10.1101/cshperspect.a008870.
17. Panickar K.S., Norenberg M.D. Astrocytes in cerebral ischemic injury: morphological and general considerations. *Glia.* 2005; 50: 287–298.
18. Paxinos G., Watson C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. Academic Press, 2008.
19. Radad K., Hassanein K., Moldzio R. et al. Vascular damage mediates neuronal and non-neuronal pathology following short and long-term rotenone administration in Sprague-Dawley rats. *Exp. Toxicol. Pathol.* 2013; 65: 41–47.
20. Salvatore M.F., Pruett B.S. Dichotomy of tyrosine hydroxylase and dopamine regulation between somatodendritic and terminal field areas of nigrostriatal and mesoaccumbens pathways. *PLoS One* 2012; 7: e29867.
21. Schmued L.C., Stowers C.C., Scallet A.C. et al. Fluoro-Jade C results in ultra high resolution and contrast labeling of degenerating neurons. *Brain Res.* 2005; 1035: 24–31.
22. Sherer T.B., Betarbet R., Kimb J.-H. et al. Selective microglial activation in the rat rotenone model of Parkinson's disease. *Neurosci. Lett.* 2000; 341: 87–90.

23. Sherer T.B., Betarbet R., Testa C.M. et al. Mechanism of toxicity in rotenone models of Parkinson's disease. *J. Neurosci.* 2003; 23: 10756–10764.
24. Shigeno T., McCulloch J., Graham D.I. et al. Pure cortical ischemia versus striatal ischemia. Circulatory, metabolic, and neuropathologic consequences. *Surg. Neurol* 1985; 24: 47–51.
25. Uversky V.N. Neurotoxicant-induced animal models of Parkinson's disease: understanding the role of rotenone, maneb and paraquat in neurodegeneration. *Cell Tissue Res.* 2004; 318: 225–241.
26. Watabe M., Nakaki T. Mitochondrial complex I inhibitor rotenone inhibits and redistributes vesicular monoamine transporter 2 via nitra-

- tion in human dopaminergic SH-SY5Y cells. *Mol. Pharmacol.* 2008; 74: 933–940.
27. Yang W., Chen L., Ding Y. et al. Paraquat induces dopaminergic dysfunction and proteasome impairment in DJ-1-deficient mice. *Hum. Mol. Genet* 2007; 16: 2900–2910.
28. Yoshioka H., Niizuma K., Katsu M. et al. NADPH oxidase mediates striatal neuronal injury after transient global cerebral ischemia. *Cerebral Blood Flow Metab.* 2011; 31: 868–880.
29. Zhu C., Vourc'h P., Fernagut P. et al. Variable effects of chronic subcutaneous administration of rotenone on striatal histology. *Comp. Neurol.* 2004; 478: 418–426.

Brain nigrostriatal system changes in rotenone-induced parkinsonism (quantitative immune-morphological study)

D.N. Voronkov, Yu.V. Dikalova, R.M. Khudoerkov, N.G. Yamshchikova

Research Center of Neurology, Russian Academy of Medical Sciences (Moscow)

Key words: parkinsonism, brain, striatum, substantia nigra, mitochondrial toxins, immunohistochemistry, tyrosine hydroxylase, glial fibrillary acid protein, α -synuclein

For studying one of the commonest diseases of the nervous system, parkinsonism, long-term course of injections of pesticide rotenone to Wistar rats was used, and thereafter changes of neurons and glial cells in the nigrostriatal regions of the brain were investigated by immunohistochemical methods. It was found that rats treated by rotenone were characterized by reduced motor activity and displayed characteristics of experimental parkinsonism. These changes were accompanied by a decreased tyrosine hydroxylase staining in the processes of the s. nigra dopamine neurons and aggregation of α -synuclein in their bod-

ies, as well as by significant loss of dopamine cells in the rostral part of the s. nigra. Rotenone produced bilateral local destruction of brain tissue with surrounding activated astrocytes in the dorsal parts of the striatum bilaterally. One may conclude that a parkinsonian model induced by rotenone is characterized by degenerative changes of dopamine neurons in the s. nigra, with α -synuclein aggregation and local and symmetrical injury of the striatum (with the involvement of dopaminergic fibers, neurons, neuroglia and cerebral vessels), which presumably reflects rotenone-induced mitochondrial dysfunction.

Контактный адрес: Воронков Дмитрий Николаевич – науч. сотр. лаб. функциональной морфохимии Отдела исследований мозга ФГБУ «НЦН» РАМН. 105064, Москва, пер. Обука, д. 5. Тел.: +7 (495) 916-34-72; e-mail: voronkovdm@gmail.com;

Дикалова Ю.В. – мл. науч. сотр. лаб. функциональной морфохимии Отдела исследований мозга;

Худоерков Р.М. – зав. лаб. функциональной морфохимии Отдела исследований мозга;

Ямщикова Н.Г. – зав. лаб. экспериментальной патологии нервной системы Отдела исследований мозга.