

Взаимосвязь локализации повреждений дофаминовой иннервации стриатума и их поведенческих проявлений на 6-гидроксидофамин-индуцированной модели паркинсонизма у крыс

А.В. Ставровская, Д.Н. Воронков, А.С. Ольшанский, А.С. Гущина, Н.Г. Ямщикова

ФГБНУ «Научный центр неврологии», Москва, Россия

Введение. Моделирование болезни Паркинсона на животных является важным этапом в изучении патогенеза заболевания и поиска эффективных методов лечения.

Цель исследования — выявить взаимосвязь локализации повреждений дофаминовой иннервации стриатума мозга при введении грызунам нейротоксина 6-гидроксидофамина (6-ГДА) и их поведенческих проявлений.

Материалы и методы. Работа проведена на 75 крысах-самцах Вистар с интранингальным введением 3 мкл 6-ГДА в дозе 4 мкг/мкл. Через 33 сут после введения животные были обследованы в тестах «открытое поле» и «сужающаяся дорожка», после чего часть животных декапитирована ($n = 25$) для проведения иммуногистохимического анализа.

Результаты. Группа неактивных животных статистически значимо отличалась от активных животных более выраженным повреждением ДА-окончаний в дорсомедиальной ($p = 0,0235$) и вентральной ($p = 0,091$) областях стриатума, тогда как у активных животных повреждение преимущественно локализовалось в дорсолатеральной области. В группе неактивных животных среднее пройденное расстояние в «открытом поле» было значимо меньше ($p < 0,001$), а время замирания ($p < 0,0168$) и средний балл по шкале невротизации ($p < 0,001$) — больше по сравнению с активными. Результаты корреляционного анализа по Спирмену показали значимую негативную связь ($r_s = -0,762$; $p < 0,0001$) между интенсивностью окрашивания на тирозингидроксилазу в дорсолатеральном отделе и длительностью замираний в «открытом поле». Связь между длительностью замираний и повреждением других областей стриатума не выявлена.

Заключение. Повреждение дорсомедиальной и дорсолатеральной областей вызывает двигательные и эмоциональные нарушения меньшей степени тяжести, чем повреждения, затрагивающие и вентральную область стриатума. Поведенческий тест «сужающаяся дорожка» может использоваться для достоверной оценки наличия и степени повреждения стриатума. Такая оценка очень важна в исследованиях эффективности последующих терапевтических воздействий для редукции паркинсонического синдрома.

Ключевые слова: болезнь Паркинсона; 6-гидроксидофамин; поведение; иннервация стриатума; модели на животных

Источник финансирования. Авторы заявляют об отсутствии внешних источников финансирования при проведении исследования.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Адрес для корреспонденции: 125367, Москва, Волоколамское шоссе, д. 80. ФГБНУ «Научный центр неврологии». E-mail: alla_stav@mail.ru. Ставровская А.В.

Для цитирования: Ставровская А.В., Воронков Д.Н., Ольшанский А.С., Гущина А.С., Ямщикова Н.Г. Взаимосвязь локализации повреждений дофаминовой иннервации стриатума и их поведенческих проявлений на 6-гидроксидофамин-индуцированной модели паркинсонизма у крыс. *Анналы клинической и экспериментальной неврологии* 2021; 15(2): 42–49.

DOI: 10.25692/ACEN.2021.2.6

Поступила 19.03.2021 / Принята в печать 19.04.2021

The relationship between the location of a lesion in the striatal dopaminergic innervation and its behavioral manifestation in a 6-hydroxydopamine-induced model of Parkinson's disease in rats

Alla V. Stavrovskaya, Dmitry N. Voronkov, Artem S. Olshansky, Anastasia S. Gushchina, Nina G. Yamshikova

Research Center of Neurology, Moscow, Russia

Introduction. Animal modelling of Parkinson's disease is an essential step in studying disease pathogenesis and searching for effective treatment methods. An accurate assessment of the resulting model is critical.

The aim of the study was to identify the correlation between the location of a lesion in the striatal dopaminergic innervation when the neurotoxin 6-hydroxydopamine (6-OHDA) was administered to rodents and the resulting behavior.

Materials and methods. The study was carried out on 75 male Wistar rats that received intranigral injection of 3 μ l of 6-OHDA at a dose of 4 μ g/ μ l. The animals were examined in the open field test and narrowing beam walking test 33 days after administration, after which some of the animals were decapitated ($n = 25$) for immunohistochemical analysis.

Results. The inactive animal group was statistically significantly different from the active animal group, with more pronounced damage to the dopamine endings in the dorsomedial ($p = 0.0235$) and ventral ($p = 0.091$) striatum. In contrast, in the active animals, the lesion was primarily in the dorsolateral striatum. In the inactive animal group, the mean distance travelled in the open field test was significantly shorter ($p < 0.001$), while freezing time ($p < 0.0168$) and the average score on the neuroticism scale ($p < 0.001$) were higher compared to the active animals. Spearman's correlation results showed a significant negative correlation ($r_s = -0.762$; $p < 0.0001$) between tyrosine hydroxylase staining intensity in the dorsolateral striatum and freezing time in the open field test. No correlation was found between freezing time and damage to other striatal areas.

Conclusion. Damage to the dorsomedial and dorsolateral striatum causes less severe motor and emotional disturbances than damage to the ventral striatum. The narrowing beam walking test can be used to assess the presence and severity of striatal damage reliably. This evaluation is critical in studies of subsequent treatment efficacy to reduce Parkinsonian syndrome.

Keywords: Parkinson's disease; 6-hydroxydopamine; behavior; striatal innervation; animal models

Source of funding. This study was not supported by any external sources of funding.

Conflict of interest. The authors declare no apparent or potential conflicts of interest related to the publication of this article.

For correspondence: 1125367, Russia, Moscow, Volokolamskoye shosse, 80. Research Center of Neurology. E-mail: alla_stav@mail.ru. Stavrovskaya A.V.

For citation: Stavrovskaya A.V., Voronkov D.N., Olshansky A.S., Gushchina A.S., Yamshikova N.G. [The relationship between the location of a lesion in the striatal dopaminergic innervation and its behavioral manifestation in a 6-hydroxydopamine-induced model of Parkinson's disease in rats]. *Annals of clinical and experimental neurology* 2021; 15(2): 42–49. (In Russ.)

DOI: 10.25692/ACEN.2021.2.6

Received 19.03.2021 / Accepted 19.04.2021

Введение

Возрастзависимые дегенеративные изменения нервной системы являются одной из наиболее значимых проблем неврологии. Прогрессирующие дегенеративно-атрофические поражения мозга, в частности болезнь Паркинсона (БП), вторая по распространённости после болезни Альцгеймера, чётко ассоциированы с пожилым возрастом и встречаются у 1–2% лиц старше 70 лет [1]. Это обстоятельство в связи с неуклонным увеличением доли пожилых лиц в структуре современного общества придаёт БП высокую социальную значимость.

БП связана с прогрессирующей гибелью дофаминергических (ДА) нейронов чёрной субстанции среднего мозга (SNc) и, как следствие, значительным (свыше 60%) снижением уровня дофамина в стриатуме. Установлено также, что при БП нейродегенерация связана с патологической агрегацией в нейронах белка α -синуклеина и носит мультисистемный характер, затрагивая и периферические отделы нервной системы [2]. Это приводит к развитию основных двигательных симптомов заболевания: брадикинезии, мышечной ригидности и тремора [3], а также неуклонно прогрессирующему неврологическому дефициту, включая психоэмоциональные и когнитивные нарушения. При этом немоторные нарушения во многих случаях опережают манифестацию двигательных расстройств на 5–10 и более лет [4]. По данным позитронно-эмиссионной томографии, у пациентов с БП, имеющих нарушения внимания, рабочей памяти и других исполнительных функций, по сравнению с пациентами, не имеющими когнитивных нарушений, наблюдается более выраженное снижение ДА-иннервации в хвостатом ядре, вентральном стриатуме и в переднем отде-

ле скорлупы [5, 6]. Показана связь депрессивных и тревожных расстройств у пациентов с БП со снижением уровня дофамина в стриатуме [7]. Вместе с тем в ряде работ у пациентов с БП не обнаружено корреляции между снижением дофамина в определённых регионах стриатума и выраженностью немоторных симптомов при БП [8, 9].

БП в настоящее время неизлечима, поскольку патологический механизм не совсем ясен, и его изучение зависит от идеальных моделей *in vivo*, которые должны воспроизводить все клинические и патогенетические характеристики БП.

В силу очевидных причин создание идеальных моделей на лабораторных животных невозможно, и задача исследователей — использовать в полной мере возможности уже существующих [10]. Так, классической нейротоксической моделью является введение в компактную часть SNc нейротоксина 6-гидроксидофамина (6-ГДА), приводящего к гибели ДА-нейронов за счёт индукции окислительных повреждений клетки и нарушения окислительного фосфорилирования [11]. Как правило, используют унилатеральное введение, при котором неповреждённое полушарие животных служит внутренним контролем. Кроме того, одностороннее введение токсина соответствует латерализации моторных нарушений в начальных стадиях БП [12]. В то же время всё больше внимания привлекают немоторные проявления паркинсонизма в данной модели [13]. Для изучения функциональных дефицитов на животных моделях БП обычно используется батарея поведенческих тестов, которая включает тесты для выявления как дисфункций двигательного аппарата, так и сенсорных и когнитивных нарушений [14–16]. Это позволяет исследовать оба функциональных пути, а также определять степень взаимо-

действия между ними и избегать маскировки поведения другими конкурирующими механизмами. Разработка и применение новых парадигм, которые интегрируют такие задачи, может уменьшить необходимость в нескольких тестах при попытке оценить сложное поведение животного [17]. В связи с этим представляет интерес проанализировать поведение крыс с 6-ГДА-индуцированной моделью БП в двух тестах — «открытом поле» и «сужающейся дорожке», с точки зрения их релевантности для оценки результатов моделирования.

Цель исследования: выявить взаимосвязь между степенью и топологией повреждения ДА-стриатума и поведенческими проявлениями при моделировании паркинсонизма с помощью унилатерального интранигрального введения 6-ГДА.

Материалы и методы

Эксперимент проведён на 75 крысах-самцах Вистар в возрасте 3,5 мес массой 300–350 г, которые содержались в стандартных контролируемых условиях вивария при 12-часовом световом цикле.

Для получения модели паркинсонического синдрома животных помещали на раму лабораторного стереотаксиса («Stoelting Co.»), скальп надрезали и через просверленные в черепе отверстия в компактную часть SNc справа вводили 6-ГДА в дозе 12 мкг в 3 мкл 0,05% раствора аскорбиновой кислоты в соответствии с координатами атласа мозга крыс (AP = -4,8; L = 2,2; V = 8,0) [18], с левой стороны вводили растворитель в том же объёме. Ложнооперированным животным ($n = 5$) билатерально вводили растворитель. Для анестезии применяли золетил 100 в дозе 3 мг/100 г и ксиланит в дозе 3 мг/кг внутримышечно, для премедикации использовали атропин в дозе 0,04 мг/кг подкожно за 10–15 мин до введения ксиланита.

Через 33 сут после введения токсина животным проводили тестирование поведения. Следует отметить, что большое количество животных в эксперименте предполагало поэтапное проведение операций и, соответственно, поэтапное тестирование, что обеспечивало строгое соблюдение интервала между введением токсина и проведением тестов.

Установка для изучения изменения двигательной активности и ориентировочно-исследовательского поведения «открытое поле» представляла собой короб 97 × 97 × 40 см из жёсткого ПВХ («Открытая наука», Россия). Поведение крыс фиксировали в течение 3 мин, последующий анализ данных проводили с помощью системы видеонаблюдения «Any-Maze» («Stoelting Inc.») с программным обеспечением.

Установка «сужающаяся дорожка» («Открытая наука», Россия) для выявления двигательных и эмоциональных нарушений состояла из двух сужающихся лучей, располагающихся один поверх другого, приподнятых над полом на высоту 70 см. Общая длина дорожки — 165 см, ширина верхнего луча — от 6 до 1,5 см, нижнего — от 10 до 5,5 см, высота верхнего луча — 2 см. К узкому концу «дорожки» прикреплён короб (укрытие) размером 25 × 19 × 12 см, имеющий съёмную крышку и отверстие в передней панели, через которое животное может проникнуть внутрь. Экспериментальное животное должно пройти по верхней

планке от стартового участка до укрытия. В данном эксперименте учитывался латентный период начала движения по «сужающейся дорожке», а также была проведена оценка психоэмоционального состояния животных с присвоением баллов по шкале невротизации [19]. Учитывались проявления «нестандартной» поведенческой активности животного, которые могли быть отнесены к внешним признакам нев-роподобного состояния: повороты головы из стороны в сторону или вверх–вниз, жевательные движения, активное обнюхивание и лизание установки, повороты вокруг своей оси, пачение, груминг, сокращения диафрагмы, птоз и др. Максимальное время тестирования — 100 с.

По окончании эксперимента крыс декапитировали и извлекли мозг для проведения иммуногистологического анализа.

Для морфологического исследования часть животных из каждой группы, отобранных случайным образом (15 активных и 10 неактивных), декапитировали гильотиной. Мозг извлекали и фиксировали погружением в нейтральный забуференный 4% формалин на 24 ч. После фиксации образцы пропитывали средой O.C.T. («Tissue Tek, Sakura») и готовили серийные фронтальные срезы толщиной 10 мкм на криостате «Cryo 3» («Tissue Tek, Sakura»). Для выявления тирозингидроксилазы использовали поликлональные кроличьи антитела (1 : 500, T8700, «Sigma») и вторичные биотинилированные мышинные антитела к иммуноглобулинам кролика (EXTRA3-KIT, «Sigma»). Связывание антител визуализировали при помощи экстравидин-пероксидазы (EXTRA3-KIT, «Sigma»). В качестве хромогена использовали 3,3-диаминобензидин (BioSite, high contrast substrate kit, ВСВ20032). От каждого животного окрашивали 6–8 срезов стриатума, взятых на уровне 0,4–1,0 мм от брегмы (по атласу Paxinos and Watson). Срезы изучали и документировали с помощью микроскопа «Nikon SMZ18». При одинаковых настройках камеры и осветительной системы микроскопа измеряли интенсивность окрашивания на 16-битных монохромных изображениях (65 536 градаций серого). Для измерений выделили три области стриатума в соответствии со схемой распределения ДА-проекций [20]: дорсолатеральную (DL), дорсомедиальную (DM) и вентральную (V). Интенсивность окрашивания на стороне введения токсина выражали в процентах от соответствующей области в противоположном полушарии.

Все эксперименты проводили в соответствии с международными правилами по работе с лабораторными животными, с соблюдением биоэтических норм и возможным сокращением числа животных в эксперименте [21]. Статистическую обработку результатов поведенческих тестов осуществляли с использованием программы «GraphPad Prism 7.0». Нормальность распределения проверяли с помощью теста Шапиро–Уилка. Для определения статистической значимости различий использовали факторный дисперсионный анализ (ANOVA) с апостериорным тестом Тьюки или непараметрический тест Краскелла–Уолиса с апостериорным тестом Данна при отклонении от нормального распределения. Различия считали значимыми при $p < 0,05$.

Результаты

Результаты поведенческих тестов позволили выделить среди крыс с введением 6-ГДА две группы: «активных» ($n = 45$) и «неактивных» ($n = 25$) животных. Так, среднее пройденное

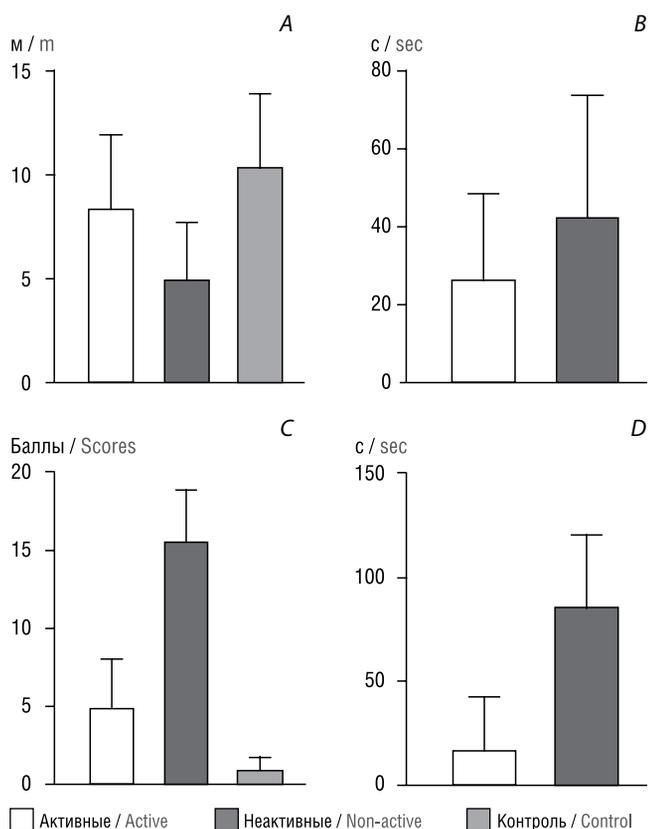


Рис. 1. Тестирование поведения крыс в тестах «открытое поле» (A, B) и «сужающаяся дорожка» (C, D). A — величина пройденного пути (м); B — длительность замириания (фризинга) (с); C — оценка невротоподобного состояния (баллы); D — латентный период начала движения (с). * $p < 0,05$ по сравнению с активными крысами.

Fig. 1 Assessment of rat behavior in the open field test (A, B) and narrowing beam walking test (C, D). A — distance travelled (meters); B — freezing time (sec); C — assessment of the neurosis-like state (points); D — delay before the start of movement (sec). * $p < 0.05$ compared to the active rats.

расстояние в тесте «открытое поле» было значимо меньше в группе «неактивных» животных (ANOVA $F(2, 72) = 10,32$, $p < 0,001$; рис. 1, A), а время замириания — значимо больше по сравнению с группой «активных» ($p < 0,0168$) (рис. 1, B). При тестировании на «сужающейся дорожке» «активные» животные, в целом, справлялись с тестом, слабо выраженные моторные и немоторные нарушения не мешали проходу по всей длине планки до укрытия. «Нестандартная» поведенческая активность проявлялась лишь в активном обнюхивании планки, свешивании головой, кратких остановках. «Неактивные» крысы либо проходили не более половины пути до укрытия, совершая при этом пачение, длительные остановки, глубокие свешивания с дорожки, повороты вокруг своей оси, аутогруминг, либо оставались на протяжении всего времени тестирования на стартовом участке дорожки; большинство животных этой группы находилось в замершей позе, у них наблюдался полный птоз верхнего века, частые сокращения диафрагмы и др. (рис. 1, C, D). Средний балл по шкале невротизации (рис. 1, C), по сравнению с группой «активных» животных и контрольной группой (ANOVA $F(2, 72) = 102,2$; $p < 0,001$) значимо различался, как и величина латентного периода.

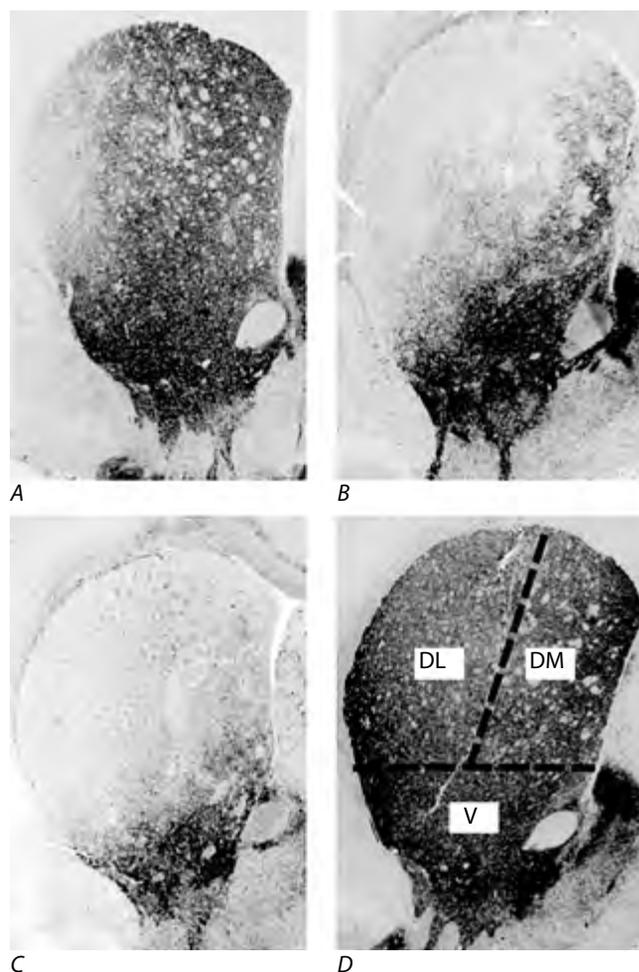


Рис. 2. Различия в степени выраженности повреждения ДА-окончаний в стриатуме животных при интрастригальном введении 6-ГДА. A — умеренное повреждение преимущественно в DL-области стриатума; B — выраженное повреждение в дорсальной области с локализацией преимущественно в DL-отделе; C — объёмное повреждение, затрагивающее как дорсальный, так и вентральный отделы стриатума; D — интактный контроль; схема областей, в которых проводили измерения интенсивности окрашивания; Иммуногистохимическое окрашивание на тирозингидроксилазу, $\times 2$.

Fig. 2. Differences in the severity of damage to the striatal dopaminergic endings in animals with intrastriatal administration of 6-OHDA. A — moderate damage, mainly to the DL striatum; B — significant damage to the dorsal region, mainly to the DL striatum; C — mass lesion affecting both the dorsal and ventral parts of the striatum; D — intact control; diagram of the regions where staining intensity was measured; Immunohistochemical staining for tyrosine hydroxylase, $\times 2$.

Тест Краскелла–Уоллиса показал значимые различия ($H(5) = 40,34$; $p < 0,0001$) интенсивности окрашивания областей стриатума в экспериментальных группах. Наибольшее снижение интенсивности окрашивания в обеих группах регистрировали в DL-области (рис. 2).

Интенсивность окрашивания на тирозингидроксилазу в DL-области стриатума по сравнению с контралатеральной стороной составила у активных животных 31,8%, а у неактивных — 20,6%. Однако различия между активными

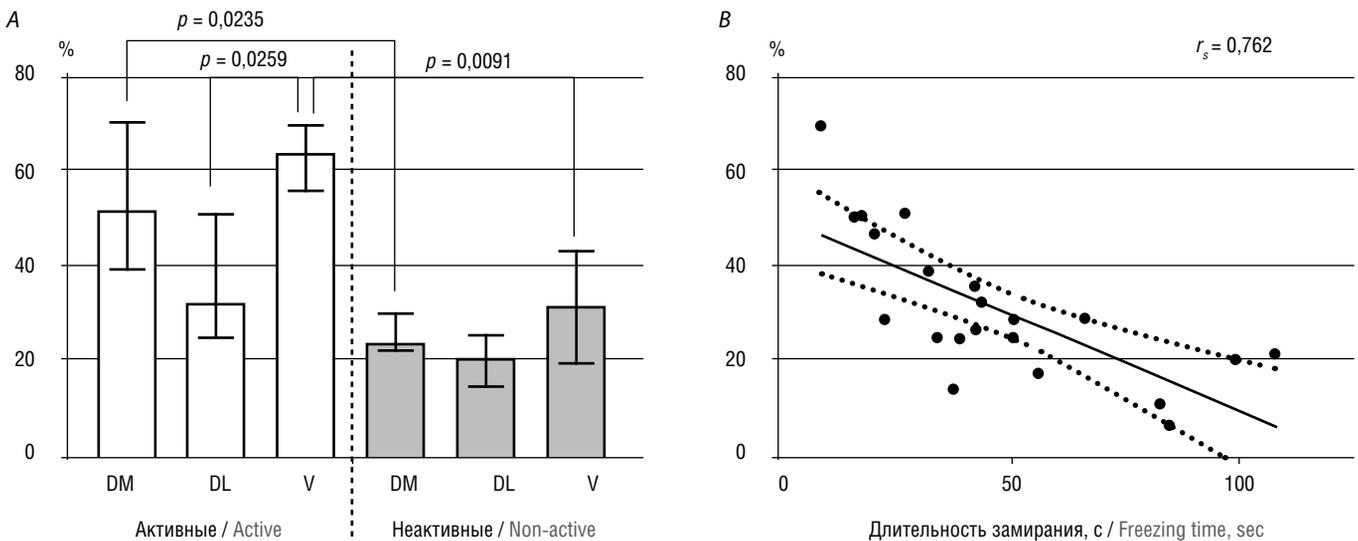


Рис. 3. Интенсивность иммуногистохимического окрашивания на тирозингидроксилазу (A) и её связь с длительностью замириания в тесте «открытое поле» (B).

A: данные представлены в виде Ме [LQ; HQ].

Fig. 3. Intensity of tyrosine hydroxylase immunohistochemical staining (A) and its correlation with freezing time in the open field test (B).

A: data are presented as Me [LQ; HQ].

ми и неактивными животными в DL-области стриатума не были статистически значимыми. В то же время группа неактивных животных статистически значимо отличалась от активных животных более выраженным повреждением ДА-окончаний в DM- ($p = 0,0235$) и V-областях ($p = 0,091$) стриатума (рис. 3, A). В целом в группе неактивных животных наблюдали общее снижение интенсивности окрашивания в трёх областях стриатума, тогда как у активных животных повреждение преимущественно локализовалось в DL-области.

Результаты корреляционного анализа по Спирмену показали значимую негативную связь ($r_s = -0,762$; $p < 0,0001$) между интенсивностью окрашивания на тирозингидроксилазу в DL-отделе и длительностью замираний в открытом поле (рис. 3, B). Связи между длительностью замираний и повреждением других областей стриатума не выявили.

Обсуждение

Первая модель БП на животных была индуцирована нейротоксином 6-ГДА — гидроксильрованным аналогом естественного нейротрансмиттера дофамина [22].

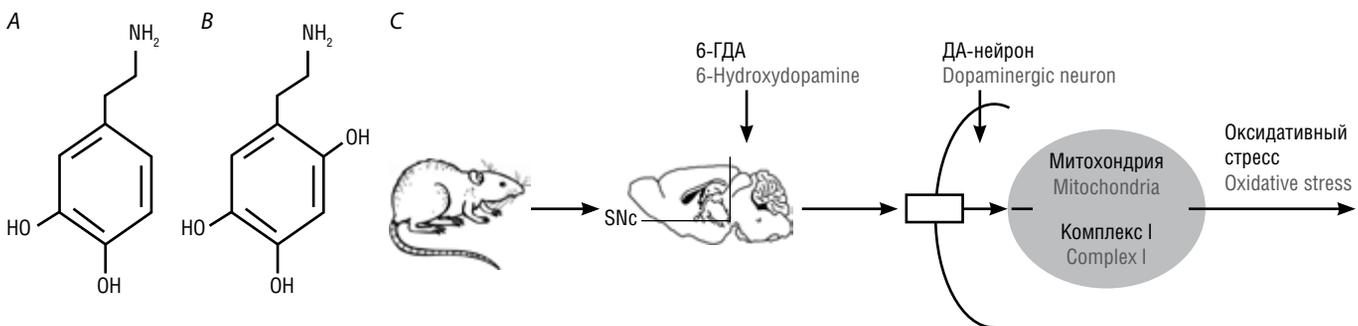


Рис. 4. Структурное сходство дофамина (A) и 6-ГДА (B) и схема действия токсина (C).

Fig. 4. Structural similarity of dopamine (A) and 6-hydroxydopamine (B), and a diagram showing the toxin's action (C).

После интрацеребрального введения (6-ГДА не пересекает гематоэнцефалический барьер) нейротоксин в SNc или стриатуме переносится транспортёром дофамина в ДА-нейроны, где накапливается в митохондриях, а затем подавляет активность комплекса I дыхательной цепи митохондрий (рис. 4). Попадая в клетки, 6-ГДА подвергается автоокислению или метаболической деградации и продуцирует перекись водорода, супероксид-анион и гидроксильные радикалы, тем самым вызывая перекисное окисление липидов, окисление белков и окисление ДНК, что, в конечном счёте, приводит к окислительному стрессу и митохондриальной дисфункции [23].

Большинство авторов называют апоптоз основным механизмом гибели нейронов SNc при введении 6-ГДА, однако показаны и другие типы гибели клеток — некроз и аутофагия [24]. Вопросы локальности повреждений, динамики развития патологии и роли различных патологических каскадов в развитии 6-ГДА-индуцированных повреждений остаются нерешёнными [25].

Дегенерация ДА-нейронов начинается через 24 ч после инъекции 6-ГДА в SNc или нигростриатный тракт, а истощение дофамина в стриатуме — спустя 2 или 3 сут. Обычно

потеря дофамина в стриатуме достигает 80–90% и соответствует специфичным поведенческим изменениям. Величина поражения зависит от количества введённого 6-ГДА, места введения и присущих различий в чувствительности между видами животных. Кроме того, в ряде работ подчеркивается неодинаковая устойчивость ДА-нейронов разных отделов SNc к повреждающим воздействиям [26, 27].

Функционально DL-область стриатума грызунов считают сенсомоторной, DM-область — ассоциативной, а V-область — лимбической. Анализ распределения возбуждающих входов из коры и таламуса подтверждает такое структурно-функциональное деление стриатума [28]. Согласно данным С.Р. Gerfen и соавт. [20], в DL-область стриатума посылают проекции преимущественно нейроны компактной части SNc, расположенные в её ростральном отделе, тогда как DM-область иннервируется нейронами каудального отдела компактной части SNc. В V-область стриатума проецируются ДА-нейроны вентрального поля покрышки. Работы на экспериментальных моделях демонстрируют участие ДА-иннервации регионов стриатума не только в двигательных, но и в различных когнитивных процессах. Например, показано, что повреждение дорсомедиального стриатума или ДА-окончаний в этой области нарушает некоторые аспекты пространственного обучения [29, 30]. Предполагают, что ДА-иннервация DM-стриатума грызунов участвует в регуляции целенаправленного поведения, а DL-стриатума — в осуществлении стереотипного поведения, тогда как ДА-проекция в вентральный отдел стриатума (прилежащее ядро) регулируют реакцию на подкрепление [31–33]. Помимо этого, в стриатуме выделяют два нейрохимически различающихся структурных компонента — матрикс и стриосомы [34], которые также иннервируются разными популяциями нейронов компактной части SNc [20]. Стриосомы формируют лабиринтоподобную систему и содержат нейроны, экспрессирующие DL-рецепторы, аксоны которых идут напрямую в SNc и замыкают нигростриональную петлю, тогда как нейроны (D2R) непрямого стрионигрального пути преимущественно локализованы в матриксе [35]. Согласно данным Y. Miyamoto, организация и нейрохимические особенности стриосом различны в DL-, DM- и V-областях стриатума [36].

Таким образом, разные группы ДА-нейронов SNc связаны с разными областями стриатума и участвуют в регуляции различных форм поведения.

Грызуны, мыши и крысы, как млекопитающие и простые в содержании животные, наиболее часто используются для моделирования БП. Основная причина более частого использования крыс, чем мышей, для 6-ГДА-индукции паркинсонизма — трудности в воздействии на мелкие структуры мозга, такие как SNc или медиальный пучок переднего мозга, во время стереотаксических операций. Однако и при моделировании на крысах невозможно добиться попадания строго в определённую часть SNc в 100% случаев, даже используя самые современные стереотаксические аппараты и обладая необходимыми навыками для проведения такого рода операций. Индивидуальные особенности анатомии животных, незначительные различия в величине головного мозга зачастую приводят к отклонениям от намеченного места введения нейтоксина или иного препарата. В результате возникают явные различия в поведении модельных крыс, которые трудно поддаются интерпретации. Известно, например, что двигательная активность таких животных обычно достигает минимума к 3–4-й неделе после операции [37], между тем у некоторых особей значительного снижения не наблюдается. Также иногда не наблюдается выраженная ригидность мышц, тремор или птоз. В связи с этим важно иметь относительно простой, но результативный способ, позволяющий определить наличие повреждения ДА-иннервации и, возможно, его локализации. В результате данного исследования было показано, что введение 6-ГДА в SNc мозга крыс может привести к нарушению ДА-иннервации стриатума в различных областях. Повреждение DM- и DL-областей вызывает двигательные и эмоциональные нарушения меньшей степени тяжести, чем повреждения, затрагивающие и вентральную область стриатума. Поведенческий тест «сужающаяся дорожка» не требует длительного обучения животных и больших временных затрат на проведение, при этом результаты данного теста могут использоваться для достоверной оценки наличия и степени повреждения стриатума.

Представленная работа является частью запланированного исследования по объективизации, в частности, более точной интерпретации результатов поведенческих тестов у животных с моделями нейродегенеративных заболеваний. Выявление взаимосвязи между ними и полученными в результате моделирования *in vivo* патобиохимическими и морфологическими изменениями мозга упростит проведение и повысит эффективность разработки и тестирования новых терапевтических подходов.

Список источников

- Wirdefeldt K., Adami H.O., Cole P. et al. Epidemiology and etiology of Parkinson's disease: a review of the evidence. *Eur J Epidemiol.* 2011; 26(S1): 1–58. DOI: 10.1007/s10654-011-9581-6. PMID: 21626386.
- Иллариошкин С.Н. Современные представления об этиологии болезни Паркинсона. *Неврологический журнал.* 2015; 20(4): 4–13.
- Savitt J.M., Dawson V.L., Dawson T.M. Diagnosis and treatment of Parkinson disease: molecules to medicine. *J Clin Invest.* 2006; 116(7): 1744–1754. DOI: 10.1172/JCI29178. PMID: 16823471.
- Chaudhuri K.R., Schapira A.H. Non-motor symptoms of Parkinson's disease: dopaminergic pathophysiology and treatment. *Lancet Neurol.* 2009; 8(5): 464–474. DOI: 10.1016/S1474-4422(09)70068-7. PMID: 19375664.
- Chung S.J., Yoo H.S., Oh J.S. et al. Effect of striatal dopamine depletion on cognition in de novo Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord.* 2018; 51: 43–48. DOI: 10.1016/j.parkreldis.2018.02.048. PMID: 29526657.
- Kübler D., Schroll H., Buchert R., Kuhn A.A. Cognitive performance correlates with the degree of dopaminergic degeneration in the associative part of the striatum in non-demented Parkinson's patients. *J Neural Transm.* 2017; 124(9): 1073–1081. DOI: 10.1007/s00702-017-1747-2. PMID: 28643101.

References

- Wirdefeldt K., Adami H.O., Cole P. et al. Epidemiology and etiology of Parkinson's disease: a review of the evidence. *Eur J Epidemiol.* 2011; 26(S1): 1–58. DOI: 10.1007/s10654-011-9581-6. PMID: 21626386.
- Illarioshkin S.N. [Modern view on etiology of Parkinson's disease]. *Neurologicheskii zhurnal.* 2015; 20(4): 4–13. (In Russ.)
- Savitt J.M., Dawson V.L., Dawson T.M. Diagnosis and treatment of Parkinson disease: molecules to medicine. *J Clin Invest.* 2006; 116(7): 1744–1754. DOI: 10.1172/JCI29178. PMID: 16823471.
- Chaudhuri K.R., Schapira A.H. Non-motor symptoms of Parkinson's disease: dopaminergic pathophysiology and treatment. *Lancet Neurol.* 2009; 8(5): 464–474. DOI: 10.1016/S1474-4422(09)70068-7. PMID: 19375664.
- Chung S.J., Yoo H.S., Oh J.S. et al. Effect of striatal dopamine depletion on cognition in de novo Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord.* 2018; 51: 43–48. DOI: 10.1016/j.parkreldis.2018.02.048. PMID: 29526657.
- Kübler D., Schroll H., Buchert R., Kuhn A.A. Cognitive performance correlates with the degree of dopaminergic degeneration in the associative part of the striatum in non-demented Parkinson's patients. *J Neural Transm.* 2017; 124(9): 1073–1081. DOI: 10.1007/s00702-017-1747-2. PMID: 28643101.

7. Weintraub D., Newberg A.B., Cary M.S. et al. Striatal dopamine transporter imaging correlates with anxiety and depression symptoms in Parkinson's disease. *J Nucl Med.* 2005; 46(2): 227–232. PMID: 15695780.
8. Chung S.J., Lee J.J., Ham J.H. et al. Striatal dopamine depletion patterns and early non-motor burden in Parkinson's disease. *PLoS One.* 2016; 11(8): e0161316. DOI: 10.1371/journal.pone.0161316. PMID: 27529171.
9. Park S.B., Kwon K.Y., Lee J.Y. et al. Lack of association between dopamine transporter loss and non-motor symptoms in patients with Parkinson's disease: a detailed PET analysis of 12 striatal subregions. *Neurol Sci.* 2019; 40: 311–317. DOI: 10.1007/s10072-018-3632-7. PMID: 30415448.
10. Blandini F., Armentero M.T. Animal models of Parkinson's disease. *FEBS J.* 2012; 279: 1156–1166. DOI: 10.1111/j.1742-4658.2012.08491.x. PMID: 22251459.
11. Schober A. Classic toxin-induced animal models of Parkinson's disease: 6-OHDA and MPTP. *Cell Tissue Res.* 2004; 318(1): 215–224. DOI: 10.1007/s00441-004-0938-y. PMID: 15503155.
12. Шток В.Н., Левин О.С. Клиническая синдромологическая классификация экстрапирамидных расстройств. М., 2014. 112 с.
13. Branchi I., D'Andrea I., Armida M. et al. Nonmotor symptoms in Parkinson's disease: Investigating early-phase onset of behavioral dysfunction in the 6-hydroxydopamine-lesioned rat model. *J Neurosci Res.* 2008; 86(9): 2050–2061. DOI: 10.1002/jnr.21642. PMID: 18335518.
14. Henderson J.M., Watson S., Halliday G.M. et al. Relationships between various behavioural abnormalities and nigrostriatal dopamine depletion in the unilateral 6-OHDA-lesioned rat. *Behav Brain Res.* 2003; 139: 105–113. DOI: 10.1016/S0166-4328(02)00087-6. PMID: 12642181.
15. Schleimer S.B., Johnston G.A., Henderson J.M. Novel oral drug administration in an animal model of neuroleptic therapy. *J Neurosci Methods.* 2005; 146: 159–164. DOI: 10.1016/j.jneumeth.2005.02.004. PMID: 16054505.
16. Allbutt H., Henderson J. Use of the narrow beam test in the rat, 6-hydroxydopamine model of Parkinson's disease. *J Neurosci Meth.* 2007; 159: 195–202. DOI: 10.1016/j.jneumeth.2006.07.006. PMID: 16942799.
17. Sweis B.M., Bachour S.P., Brekke J.A. et al. A modified beam-walking apparatus for assessment of anxiety in a rodent model of blast traumatic brain injury. *Behav Brain Res.* 2016; 296: 149–156. DOI: 10.1016/j.bbr.2015.09.015. PMID: 26367471.
18. Paxinos G., Watson C. The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates: Hard Cover Edition. Elsevier, 2006. P. 456.
19. Болотова В.И., Крауз В.А., Шустов Е.Б. Биологическая модель экспериментального невроза у лабораторных животных. *Биомедицина.* 2015; 1: 66–80.
20. Gerfen C.R., Herkenham M., Thibault J. The neostriatal mosaic: II. Patch- and matrix-directed mesostriatal dopaminergic and non-dopaminergic systems. *J. Neurosci.* 1987; 7(12): 3915–3934. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.07-12-03915.1987. PMID: 2891799.
21. Каркищенко Н.Н., Грачев С.В. Руководство по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских технологиях. М., 2010. 346 с.
22. Ungerstedt U., Ljungberg T., Steg G. Behavioral, physiological, and neurochemical changes after 6-hydroxy-dopamine-induced degeneration of the nigrostriatal dopamine neurons. *Adv Neurol.* 1974; 5: 421–426.
23. Hwang O. Role of oxidative stress in Parkinson's disease. *Exp Neurobiol.* 2013; 22: 11–17. DOI: 10.5607/en.2013.22.1.11. PMID: 23585717.
24. Hernandez-Baltazar D., Mendoza-Garrido M., Martinez-Fong D. Activation of GSK-3 β and caspase-3 occurs in Nigral dopamine neurons during the development of apoptosis activated by a striatal injection of 6-hydroxydopamine. *PLoS One.* 2013; 8(8): e70951. DOI: 10.1371/journal.pone.0070951. PMID: 23940672.
25. Hernandez-Baltazar D., Zavala-Flores L.M., Villanueva-Olivo A. The 6-hydroxydopamine model and parkinsonian pathophysiology: novel findings in an older model. *Neurologia.* 2017; 32(8): 533–539. DOI: 10.1016/j.nrleng.2015.06.019. PMID: 26304655.
26. Wywood P.T., Johnson S.M. Differential vulnerabilities of substantia nigra catecholamine neurons to excitatory amino acid-induced degeneration in rat mid-brain slices. *Exp Neurol.* 2000; 162(1): 180–188. DOI: 10.1006/exnr.2000.7310. PMID: 10716898.
27. Воронков Д.Н., Дикалова Ю.В., Худоерков Р.М., Ямщикова Н.Г. Изменения в nigrostriальных образованиях мозга при моделировании паркинсонизма, индуцированного ротеноном (количественное иммуноморфологическое исследование). *Анналы клинической и экспериментальной неврологии.* 2013; 7(2): 34–38.
28. Hunnicutt B.J., Jongbloets B.C., Birdsong W.T. et al. A comprehensive excitatory input map of the striatum reveals novel functional organization. *Elife.* 2016; 28; 5: e19103. DOI: 10.7554/eLife.19103. PMID: 27892854.
29. Yin H.H., Knowlton B.J. Contributions of striatal subregions to place and response learning. *Learn Mem.* 2004; 11(4): 459–463. DOI: 10.1101/lm.81004. PMID: 15286184.
30. Lex B., Sommer S., Hauber W. The role of dopamine in the dorsomedial striatum in place and response learning. *Neuroscience.* 2011; 172: 212–218. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2010.10.081. PMID: 21056091.
31. Keiflin R., Janak P.H. Dopamine prediction errors in reward learning and addiction: from theory to neural circuitry. *Neuron.* 2015; 88: 247–263. DOI: 10.1016/j.neuron.2015.08.037. PMID: 26494275.
7. Weintraub D., Newberg A.B., Cary M.S. et al. Striatal dopamine transporter imaging correlates with anxiety and depression symptoms in Parkinson's disease. *J Nucl Med.* 2005; 46(2): 227–232. PMID: 15695780.
8. Chung S.J., Lee J.J., Ham J.H. et al. Striatal dopamine depletion patterns and early non-motor burden in Parkinson's disease. *PLoS One.* 2016; 11(8): e0161316. DOI: 10.1371/journal.pone.0161316. PMID: 27529171.
9. Park S.B., Kwon K.Y., Lee J.Y. et al. Lack of association between dopamine transporter loss and non-motor symptoms in patients with Parkinson's disease: a detailed PET analysis of 12 striatal subregions. *Neurol Sci.* 2019; 40: 311–317. DOI: 10.1007/s10072-018-3632-7. PMID: 30415448.
10. Blandini F., Armentero M.T. Animal models of Parkinson's disease. *FEBS J.* 2012; 279: 1156–1166. DOI: 10.1111/j.1742-4658.2012.08491.x. PMID: 22251459.
11. Schober A. Classic toxin-induced animal models of Parkinson's disease: 6-OHDA and MPTP. *Cell Tissue Res.* 2004; 318(1): 215–224. DOI: 10.1007/s00441-004-0938-y. PMID: 15503155.
12. Shtock V.N., Levin O.S. [Clinical syndromological classification of extrapyramidal disorders]. Moscow, 2014. 112 с. (In Russ.)
13. Branchi I., D'Andrea I., Armida M. et al. Nonmotor symptoms in Parkinson's disease: Investigating early-phase onset of behavioral dysfunction in the 6-hydroxydopamine-lesioned rat model. *J Neurosci Res.* 2008; 86(9): 2050–2061. DOI: 10.1002/jnr.21642. PMID: 18335518.
14. Henderson J.M., Watson S., Halliday G.M. et al. Relationships between various behavioural abnormalities and nigrostriatal dopamine depletion in the unilateral 6-OHDA-lesioned rat. *Behav Brain Res.* 2003; 139: 105–113. DOI: 10.1016/S0166-4328(02)00087-6. PMID: 12642181.
15. Schleimer S.B., Johnston G.A., Henderson J.M. Novel oral drug administration in an animal model of neuroleptic therapy. *J Neurosci Methods.* 2005; 146: 159–164. DOI: 10.1016/j.jneumeth.2005.02.004. PMID: 16054505.
16. Allbutt H., Henderson J. Use of the narrow beam test in the rat, 6-hydroxydopamine model of Parkinson's disease. *J Neurosci Meth.* 2007; 159: 195–202. DOI: 10.1016/j.jneumeth.2006.07.006. PMID: 16942799.
17. Sweis B.M., Bachour S.P., Brekke J.A. et al. A modified beam-walking apparatus for assessment of anxiety in a rodent model of blast traumatic brain injury. *Behav Brain Res.* 2016; 296: 149–156. DOI: 10.1016/j.bbr.2015.09.015. PMID: 26367471.
18. Paxinos G., Watson C. The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates: Hard Cover Edition. Elsevier, 2006. P. 456.
19. Bolotova V.I., Krauz V.A., Shustov E.B. Biological model of experimental neurosis in laboratory animals. *Biomeditsina.* 2015; 1: 66–80. (In Russ.)
20. Gerfen C.R., Herkenham M., Thibault J. The neostriatal mosaic: II. Patch- and matrix-directed mesostriatal dopaminergic and non-dopaminergic systems. *J. Neurosci.* 1987; 7(12): 3915–3934. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.07-12-03915.1987. PMID: 2891799.
21. Karkischchenko N.N., Grachev S.V. [A guide to laboratory animals and alternative models in biomedical technology]. Moscow, 2010. 346 p. (In Russ.)
22. Ungerstedt U., Ljungberg T., Steg G. Behavioral, physiological, and neurochemical changes after 6-hydroxy-dopamine-induced degeneration of the nigrostriatal dopamine neurons. *Adv Neurol.* 1974; 5: 421–426.
23. Hwang O. Role of oxidative stress in Parkinson's disease. *Exp Neurobiol.* 2013; 22: 11–17. DOI: 10.5607/en.2013.22.1.11. PMID: 23585717.
24. Hernandez-Baltazar D., Mendoza-Garrido M., Martinez-Fong D. Activation of GSK-3 β and caspase-3 occurs in Nigral dopamine neurons during the development of apoptosis activated by a striatal injection of 6-hydroxydopamine. *PLoS One.* 2013; 8(8): e70951. DOI: 10.1371/journal.pone.0070951. PMID: 23940672.
25. Hernandez-Baltazar D., Zavala-Flores L.M., Villanueva-Olivo A. The 6-hydroxydopamine model and parkinsonian pathophysiology: novel findings in an older model. *Neurologia.* 2017; 32(8): 533–539. DOI: 10.1016/j.nrleng.2015.06.019. PMID: 26304655.
26. Wywood P.T., Johnson S.M. Differential vulnerabilities of substantia nigra catecholamine neurons to excitatory amino acid-induced degeneration in rat mid-brain slices. *Exp Neurol.* 2000; 162(1): 180–188. DOI: 10.1006/exnr.2000.7310. PMID: 10716898.
27. Voronkov D.N., Dikalova Yu.V., Khudoerkov R.M., Yamshchikova N.G. Brain nigrostriatal system changes in rotenone-induced parkinsonism (quantitative immune-morphological study). *Annals of clinical and experimental neurology.* 2013; 7(2): 34–38. (In Russ.)
28. Hunnicutt B.J., Jongbloets B.C., Birdsong W.T. et al. A comprehensive excitatory input map of the striatum reveals novel functional organization. *Elife.* 2016; 28; 5: e19103. DOI: 10.7554/eLife.19103. PMID: 27892854.
29. Yin H.H., Knowlton B.J. Contributions of striatal subregions to place and response learning. *Learn Mem.* 2004; 11(4): 459–463. DOI: 10.1101/lm.81004. PMID: 15286184.
30. Lex B., Sommer S., Hauber W. The role of dopamine in the dorsomedial striatum in place and response learning. *Neuroscience.* 2011; 172: 212–218. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2010.10.081. PMID: 21056091.
31. Keiflin R., Janak P.H. Dopamine prediction errors in reward learning and addiction: from theory to neural circuitry. *Neuron.* 2015; 88: 247–263. DOI: 10.1016/j.neuron.2015.08.037. PMID: 26494275.

32. Jiang H., Kim H.F. Anatomical inputs from the sensory and value structures to the tail of the rat striatum. *Front Neuroanat.* 2018; 12: 30. DOI: 10.3389/fnana.2018.00030. PMID: 29773980.
33. Parker N.F., Cameron C.M., Taliaferro J.P. et al. Reward and choice encoding in terminals of midbrain dopamine neurons depends on striatal target. *Nat Neurosci.* 2016; 19(6): 845–854. DOI: 10.1038/nn.4287. PMID: 27110917.
34. Brimblecombe K. The striosome and matrix compartments of the striatum: a path through the labyrinth from neurochemistry toward function. *ACS Chemical Neurosci.* 2017; 8: 235–242. DOI: 10.1021/acscchemneuro.6b00333. PMID: 27977131.
35. Crittenden R., Graybiel A.M. Disease-associated changes in the striosome and matrix compartments of the dorsal striatum. In: Steiner H., Tseng K.Y. (eds.) *Handbook of Behavioral Neuroscience.* Elsevier, 2016; 24: 783–802. DOI: 0.1016/B978-0-12-802206-1.00039-8.
36. Miyamoto Y., Katayama S., Shigematsu N. et al. Striosome-based map of the mouse striatum that is conformable to both cortical afferent topography and uneven distributions of dopamine D1 and D2 receptor-expressing cells. *Brain Struct Funct.* 2018; 223: 4275–4291. DOI: 10.1007/s00429-018-1749-3. PMID: 30203304.
37. Ставровская А.В., Воронков Д.Н., Ямщикова Н.Г. и др. Морфохимическая оценка результатов нейротрансплантации при экспериментальном паркинсонизме. *Анналы клинической и экспериментальной неврологии.* 2015; 9(2): 28–32.

Информация об авторах

Ставровская Алла Вадимовна — к.б.н., в.н.с. лаб. экспериментальной патологии нервной системы ФГБНУ НЦН, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-8689-0934>

Воронков Дмитрий Николаевич — к.б.н., с.н.с. лаб. нейроморфологии ФГБНУ НЦН, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-5222-5322>

Ольшанский Артем Сергеевич — к.б.н., с.н.с. лаб. экспериментальной патологии нервной системы ФГБНУ НЦН, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-5696-8032>

Гущина Анастасия Сергеевна — н.с. лаб. экспериментальной патологии нервной системы ФГБНУ НЦН, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-3026-0279>

Ямщикова Нина Гавриловна — к.б.н., в.н.с. лаб. экспериментальной патологии нервной системы ФГБНУ НЦН, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-4387-2266>

Вклад авторов. Ставровская А.В. — создание концепции исследования, курирование и анализ данных, проведение исследования, руководство научно-исследовательской работой, подготовка черновика рукописи, доработка и редактирование рукописи. Воронков Д.Н. — создание концепции исследования, курирование и анализ данных, проведение исследования, визуализация и представление данных, подготовка черновика рукописи, доработка и редактирование рукописи. Ольшанский А.С. — проведение исследования. Гущина А.С. — курирование данных, проведение исследования. Ямщикова Н.Г. — проведение исследования.

32. Jiang H., Kim H.F. Anatomical inputs from the sensory and value structures to the tail of the rat striatum. *Front Neuroanat.* 2018; 12: 30. DOI: 10.3389/fnana.2018.00030. PMID: 29773980.

33. Parker N.F., Cameron C.M., Taliaferro J.P. et al. Reward and choice encoding in terminals of midbrain dopamine neurons depends on striatal target. *Nat Neurosci.* 2016; 19(6): 845–854. DOI: 10.1038/nn.4287. PMID: 27110917.

34. Brimblecombe K. The striosome and matrix compartments of the striatum: a path through the labyrinth from neurochemistry toward function. *ACS Chemical Neurosci.* 2017; 8: 235–242. DOI: 10.1021/acscchemneuro.6b00333. PMID: 27977131.

35. Crittenden R., Graybiel A.M. Disease-associated changes in the striosome and matrix compartments of the dorsal striatum. In: Steiner H., Tseng K.Y. (eds.) *Handbook of Behavioral Neuroscience.* Elsevier, 2016; 24: 783–802. DOI: 0.1016/B978-0-12-802206-1.00039-8.

36. Miyamoto Y., Katayama S., Shigematsu N. et al. Striosome-based map of the mouse striatum that is conformable to both cortical afferent topography and uneven distributions of dopamine D1 and D2 receptor-expressing cells. *Brain Struct Funct.* 2018; 223: 4275–4291. DOI: 10.1007/s00429-018-1749-3. PMID: 30203304.

37. Stavrovskaya A.V., Voronkov D.N., Yamshchikova N.G. et al. Morphochemical evaluation of neurotransplantation outcomes in experimental parkinsonism. *Annals of clinical and experimental neurology.* 2015; 9(2): 28–32. (In Russ.)

Information about the authors

Alla V. Stavrovskaya — Cand. Sci. (Biol.), leading researcher, Laboratory of experimental pathology of the nervous system, Research Center of Neurology, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-8689-0934>

Dmitry N. Voronkov — Cand. Sci. (Biol.), senior researcher, Laboratory of neuro-morphology, Research Center of Neurology, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-5222-5322>

Artem S. Olshansky — Cand. Sci. (Biol.), senior researcher, Laboratory of experimental pathology of the nervous system, Research Center of Neurology, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-5696-8032>

Anastasia S. Gushchina — researcher, Laboratory of experimental pathology of the nervous system, Research Center of Neurology, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-3026-0279>

Nina G. Yamshikova — Cand. Sci. (Biol.), leading researcher, Laboratory of experimental pathology of the nervous system, Research Center of Neurology, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-4387-2266>

Author contribution. Stavrovskaya A.V. — creation of a research concept, curation and analysis of data, research, management of research work, preparation of a draft manuscript, revision and editing of a manuscript. Voronkov D.N. — creation of a research concept, curation and analysis of data, research, visualization and presentation of data, preparation of a draft manuscript, revision and editing of a manuscript. Olshansky A.S. — conducting of research. Gushchina A.S. — data curation, conducting of research. Yamshikova N.G. — conducting of research.