

Моделирование моторных и немоторных проявлений ранней стадии болезни Паркинсона

М.В. Иванов, К.А. Кутукова

ФГБНУ «Научный центр неврологии», Москва, Россия

Аннотация

Введение. При развитии болезни Паркинсона (БП) появлению моторной симптоматики предшествуют немоторные проявления, включая нарушения функций желудочно-кишечного тракта (ЖКТ). Моделирование ранней стадии БП с целью комплексной оценки закономерностей морфофункциональных изменений в ЖКТ имеет большое значение для разработки методов ранней диагностики заболевания, более эффективного лечения характерных для БП вегетативных расстройств и повышения качества жизни пациентов.

Цель работы — предложить модель ранней стадии БП с длительным пероральным введением крысам нейротоксина ротенона в малых дозах и исследовать на этой модели функциональные и иммуногистохимические изменения ЖКТ экспериментальных животных и изменения нигральных стволовых структур.

Материалы и методы. Опыты проведены на самцах крыс Вистар в возрасте 3,0–3,5 мес. Крысам опытной группы ($n = 10$) перорально вводили ротенон в виде суспензии в 4% растворе карбоксиметилцеллюлозы в дозе 5 мг/кг через день в течение 7 мес; крысы контрольной группы ($n = 10$) получали только 4% карбоксиметилцеллюлозу. В начале и в конце эксперимента оценивали двигательную активность животных с помощью тестов «открытое поле» и «сужающаяся дорожка», исследовали моторику ЖКТ путём измерения пути прохождения красителя от привратника желудка в каудальном направлении по тонкой кишке. После декапитации крыс иммуногистохимическими методами оценивали плотность расположения дофаминовых нейронов в чёрном веществе головного мозга, нервных волокон и глии в межмышечном сплетении тонкой кишки, локализацию общего и фосфорилированного α -синуклеина в структурах нервной системы кишечника.

Результаты. У крыс опытной группы выявлено статистически значимое снижение количества дофаминовых нейронов в чёрном веществе. В межмышечном сплетении тонкой кишки было значимо меньше нервных волокон и глии и повышена интенсивность флуоресцентного окрашивания на α -синуклеин. Фосфорилированный α -синуклеин выявлен в холинергических и адренергических волокнах межмышечного сплетения. У экспериментальных животных по сравнению с контролем были статистически значимо снижены скорость эвакуации содержимого желудка и моторика тонкой кишки.

Заключение. Предложенная модель ранней стадии БП позволяет воспроизводить физиологические и иммуногистохимические симптомы поражения ЖКТ, сходные с таковыми у пациентов с БП. В их основе лежат денервационные изменения кишечника и накопление в структурах энтеральной нервной системы патологической формы α -синуклеина.

Ключевые слова: болезнь Паркинсона; ротенон; α -синуклеин; энтеральная нервная система; желудочно-кишечный тракт

Источник финансирования. Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант № 19-15-00320).

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: ivanov@neurology.ru. Иванов М.В.

Для цитирования: Иванов М.В., Кутукова К.А. Моделирование моторных и немоторных проявлений ранней стадии болезни Паркинсона. *Анналы клинической и экспериментальной неврологии*. 2022; 16(2): 50–57.

DOI: <https://doi.org/10.54101/ACEN.2022.2.6>

Поступила 04.04.2022 / Одобрена после рецензирования 15.04.2022 / Принята в печать 25.04.2022

Modelling motor and non-motor signs of early-stage Parkinson's disease

Mikhail V. Ivanov, Kristina A. Kutukova

Research Center of Neurology, Moscow, Russia

Abstract

Introduction. As Parkinson's disease (PD) develops, a number of non-motor signs precede motor symptoms, including gastrointestinal tract dysfunction. Modelling early-stage PD to comprehensively assess the pattern of morphofunctional changes in the gastrointestinal tract is important in order to develop methods of early disease diagnosis and more effective treatment of autonomic disturbances that are typical in PD, and to increase the patients' quality of life.

Study aim — to offer a model of early-stage PD through long-term oral administration of small doses of the neurotoxin rotenone to rats, and to study the functional and immunohistochemical changes in the gastrointestinal tract of the experimental animals, as well as changes in the substantia nigra.

Materials and methods. The experiment was conducted in male Wistar rats aged 3.0–3.5 months. The study group rats ($n = 10$) were given rotenone orally at a dose of 5 mg/kg, as a suspension in a 4% carboxymethyl cellulose solution, every second day for 7 months. The control group rats ($n = 10$) received only the 4% carboxymethyl cellulose solution.

The animals' mobility was assessed at the start and end of the experiment using the open field and narrowing beam-walking test. Gastrointestinal motility was assessed by measuring the passage of dye from the pylorus in a caudal direction along the small intestine. The rats were decapitated and immunohistochemistry was used to assess the density of dopamine neurons in the substantia nigra, nerve fibres, and glia in the Auerbach's plexus of the small intestine, and the location of the total and phosphorylated alpha-synuclein in the enteric nervous system.

Results. Rats in the study group had a statistically significant reduction in the number of dopamine neurons in the substantia nigra. Auerbach's plexus of the small intestine contained significantly less nerve fibres and glia, while fluorescence intensity for alpha-synuclein was increased. Phosphorylated alpha-synuclein was identified in the cholinergic and adrenergic fibres of Auerbach's plexus. Experimental animals had a statistically significant reduction in the gastric emptying rate and small intestine motility compared to the control group.

Conclusion. The presented model of early-stage PD enables the physiological and immunohistochemical symptoms of gastrointestinal dysfunction, similar to that of patients with PD, to be replicated. They are based on intestinal denervation changes and accumulation of abnormal forms of alpha-synuclein in the enteric nervous system.

Keywords: Parkinson's disease; rotenone; alpha-synuclein; enteric nervous system; gastrointestinal tract

Source of funding. The work was supported by the Russian Science Foundation (grant no. 19-15-00320).

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

For correspondence: 125367, Russia, Moscow, Volokolamskoye shosse, 80. Research Center of Neurology. E-mail: ivanov@neurology.ru.

For citation: Ivanov M.V., Kutukova K.A. Modelling motor and non-motor signs of early-stage Parkinson's disease. *Annals of Clinical and Experimental Neurology*. 2022; 16(2): 50–57. (In Russ.)

DOI: <https://doi.org/10.54101/ACEN.2022.2.6>

Received 04.04.2022 / Approved after peer review 15.04.2022 / Accepted 25.04.2022

Введение

На ранних стадиях развития болезни Паркинсона (БП) до проявления моторных нарушений наблюдаются признаки дисфункции вегетативной нервной системы, включающие разнообразные нарушения со стороны пищеварительной системы: гиперсаливацию, замедление скорости эвакуации содержимого желудка и моторики кишки, запоры и затруднённую дефекацию [1, 2]. Патоморфологически БП характеризуется патологической агрегацией и распространением белка α -синуклеина в структурах ЦНС и периферической нервной системы. Накопление патологического белка и нарастание симптомов болезни вовлекает на ранних стадиях заболевания желудочно-кишечный тракт (ЖКТ) и ядра продолговатого мозга, а затем чёрное вещество и высшие отделы головного мозга [3]. Согласно гипотезе Н. Braak [4], распространение патологических форм α -синуклеина из структур периферической нервной системы происходит по эфферентным холинергическим вагальным волокнам в дорсальные моторные ядра блуждающего нерва. Эта гипотеза подтверждается данными патоморфологических исследований больных БП [5, 6] и экспериментальными исследованиями на животных [7].

В моделировании БП *in vivo* применяют два основных подхода: создание генетических моделей на основе известных мутаций, ассоциированных с паркинсонизмом, и введение лабораторным животным различных нейротоксинов, оказывающих селективное воздействие на дофаминовую nigrostriatalную систему головного мозга. Особый интерес представляют модели с использованием гербицида параквата и пестицида ротенона.

Ротенон является специфическим ингибитором комплекса I митохондриальной электронно-транспортной цепи [8]. Данные эпидемиологических исследований свидетельствуют о повышении риска развития БП при длительном контакте с ротеноном [9]. При системном введении ротенона грызунам удаётся воспроизвести основные симптомы БП: моторные

нарушения, нейродегенерацию в nigrostriatalной системе и накопление в нейронах патологической формы α -синуклеина [10, 11]. Длительное интрагастральное введение ротенона мышам позволяет моделировать периферическое начало развития БП (поражение структур нервной системы кишечника) с последующим распространением патологического процесса в ЦНС [12, 13]. Однако в литературе не описана аналогичная модель на крысах, позволяющая воспроизводить раннюю стадию БП с длительным развитием заболевания. Использование крыс в качестве модельных животных имеет ряд преимуществ, в том числе удобство манипуляций, более крупные размеры животного и, соответственно, исследуемых анатомических структур, потенциальную возможность исследования более сложных паттернов поведения.

БП прогрессирует годами и десятилетиями, но уже на самых ранних этапах этого заболевания более чем у половины пациентов наблюдаются вегетативные расстройства, в том числе различные нарушения функций ЖКТ. Воспроизведение на животных длительного прогрессирования БП позволяет провести комплексную оценку закономерностей морфофункциональных изменений в ЖКТ на начальных этапах патологического процесса, что имеет большое значение для разработки методов ранней диагностики БП, лечения вегетативных расстройств, ассоциированных с паркинсонизмом, а также повышения качества жизни пациентов.

Цель работы: на модели ранней стадии БП с длительным пероральным введением крысам нейротоксина ротенона в малых дозах исследовать функциональные и иммуногистохимические изменения ЖКТ экспериментальных животных и изменения нигральных стволовых структур.

Материалы и методы

Ротеноновая модель

Самцам крыс Вистар в возрасте 3,0–3,5 мес ($n = 10$) вводили перорально ротенон («Sigma») в виде суспензии в 4%

растворе карбоксиметилцеллюлозы в дозе 5 мг/кг через день в течение 7 мес (опытная группа). Крысы контрольной группы ($n = 10$) получали только 4% карбоксиметилцеллюлозу. Была выбрана доза 5 мг/кг, поскольку такая дозировка использовалась в аналогичной модели на мышках [12, 13].

Физиологические исследования

В начале и в конце эксперимента (перед выведением животных из эксперимента) проводили оценку двигательной активности животных с помощью тестов «открытое поле» и «сужающаяся дорожка». В тесте «открытое поле» с помощью установки «Opto-Varimex» («Columbus Instruments») измеряли общую длину дистанции пробега за 5 мин. В тесте «сужающаяся дорожка» оценивали количество нарушений прохождения сужающейся дорожки (груминг, изменение направления движения, остановка на дорожке, свешивание, фризинг, срыв с дорожки), выраженное в баллах, и процент оступаний правыми и левыми конечностями животных от общего количества шагов.

Скорость эвакуации содержимого желудка и моторики тонкой кишки исследовали путём введения животным за 20 мин до декапитации 5% раствора красителя Evans blue на 4% растворе карбоксиметилцеллюлозы с последующим замером дистанции распространения красителя от привратника в каудальном направлении.

Иммуногистохимическое исследование

Контрольных и экспериментальных крыс наркотизировали эфиром и декапитировали. Для оценки плотности расположения дофаминовых нейронов в чёрном веществе, плотности расположения нервных волокон в мышечной оболочке, содержания общего α -синуклеина и GFAP-позитивной глии в миэнтеральных ганглиях использовали криостатные срезы головного мозга, содержащие чёрное вещество, и срезы тонкой кишки толщиной 10 мкм, приготовленные на криостате «Tissue-Tek Cryo3 Flex» («Sakura») с последующей иммунофлюоресцентной реакцией. Для выявления фосфорилированного α -синуклеина в структурах энтеральной нервной системы использовали тотальные препараты тонкой кишки, состоящие из серозной оболочки, внутреннего и наружного слоёв мышечной оболочки и межмышечного нервного сплетения, расположенного между ними.

Тотальные препараты готовили следующим образом: фрагмент кишки длиной 4–5 см разрезали в продольном направлении, закрепляли его в растянутом состоянии при помощи энтомологических игл на дне чашки Петри с фосфатным буфером (рН 7,3–7,4), покрытом парафином, слизистой оболочкой вверх, затем под лупой удаляли слизистую оболочку при помощи глазного пинцета. Иммунофлюоресцентные реакции проводили на кусочках полученных тотальных препаратов размером приблизительно $1 \times 1,5$ см методом «плавающих срезов» в микропробирках.

Для иммунофлюоресцентных реакций использовали первичные антитела к β -III-тубулину (мышинные антитела, «Biolegend»), тирозингидроксилазе (ТН) (кроличьи антитела, Sigma), ацетилхолинтрансферазе (Chat) (козы антитела, «Chemicon»), вазинтестинальному пептиду (VIP) (кроличьи антитела, «Abscam»), глияльному кислому фи-

брилярному белку (GFAP) (мышинные антитела, «Sigma»), общему α -синуклеину (кроличьи антитела, «Sigma») и α -синуклеину, фосфорилированному по серину-129 (мышинные антитела клона Psyn/81A, «Abscam») в разведении 1 : 250, а также вторичные антитела («Sigma»), меченные флюорохромами CF448 и Cy3 в разведении 1 : 100. Препараты исследовали и фотографировали под микроскопом «NikonEclipse NiU» с цифровой камерой «Nikon DS-Qi». Морфометрию выполняли на фотографиях в программах «NIS Elements» и «ImageJ», производя не менее 30–40 измерений на животное для каждого из количественно определяемых параметров.

Оценивали количество β -III-тубулин-позитивных нервных волокон в мышечной оболочке на площади среза 100 мкм^2 . Количество ТН-позитивных нервных волокон на 100 мкм^2 в межмышечном сплетении определяли на тотальных препаратах. Содержание общего α -синуклеина и GFAP-позитивной глии в миэнтеральных ганглиях оценивали косвенно, выделяя на фотографии область ганглия вручную, путём измерения средней интенсивности флюоресцентного окрашивания при помощи параметра «mean gray value» в программе «ImageJ» (с коррекцией на фоновое окрашивание). В чёрном веществе головного мозга животных на срезах оценивали плотность распределения тел ТН-позитивных нейронов, подсчитывая количество нейронов на $0,01 \text{ мм}^2$ площади чёрного вещества. На тотальных препаратах при помощи двойного иммуномечения выявляли наличие колокализации фосфо- α -синуклеина в основных популяциях миэнтеральных нейронов (возбуждающих и тормозных), выявляемых с помощью антител к Chat и VIP соответственно, а также в адренергических симпатических волокнах, выявляемых с помощью антител к ТН.

Статистический анализ проводили в программе «Statistica 6.0». Результаты представлены в виде среднего и стандартной ошибки среднего ($M \pm m$). Сравнение исследуемых параметров между контрольной и экспериментальной группами проводили при помощи критерия Манна–Уитни. Различия признавали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты исследования

Физиологические тесты

У крыс опытной группы в тесте «открытое поле» не выявлено статистически значимого снижения двигательной активности, однако в тесте «сужающаяся дорожка» процент оступаний (соскальзываний на нижнюю планку установки) левыми конечностями у них был достоверно выше, чем у крыс контрольной группы ($46 \pm 9,1$ и $26 \pm 5,1\%$; $p < 0,05$; рис. 1, А); также в этой группе было увеличено по сравнению с контролем количество нарушений прохождения сужающейся дорожки ($10 \pm 1,2$ и $2 \pm 0,8$ балла; $p < 0,05$; рис. 1, В).

Оценка скорости эвакуации содержимого желудка и моторики тонкой кишки путём измерения дистанции прохождения красителя Evans Blue от привратника желудка в каудальном направлении по тонкой кишке через 20 мин после перорального введения красителя показала достоверное снижение этого показателя у крыс опытной группы по сравнению с контролем ($61,5 \pm 2,7$ и $87,8 \pm 8,7$ см; $p < 0,05$; рис. 1, С).

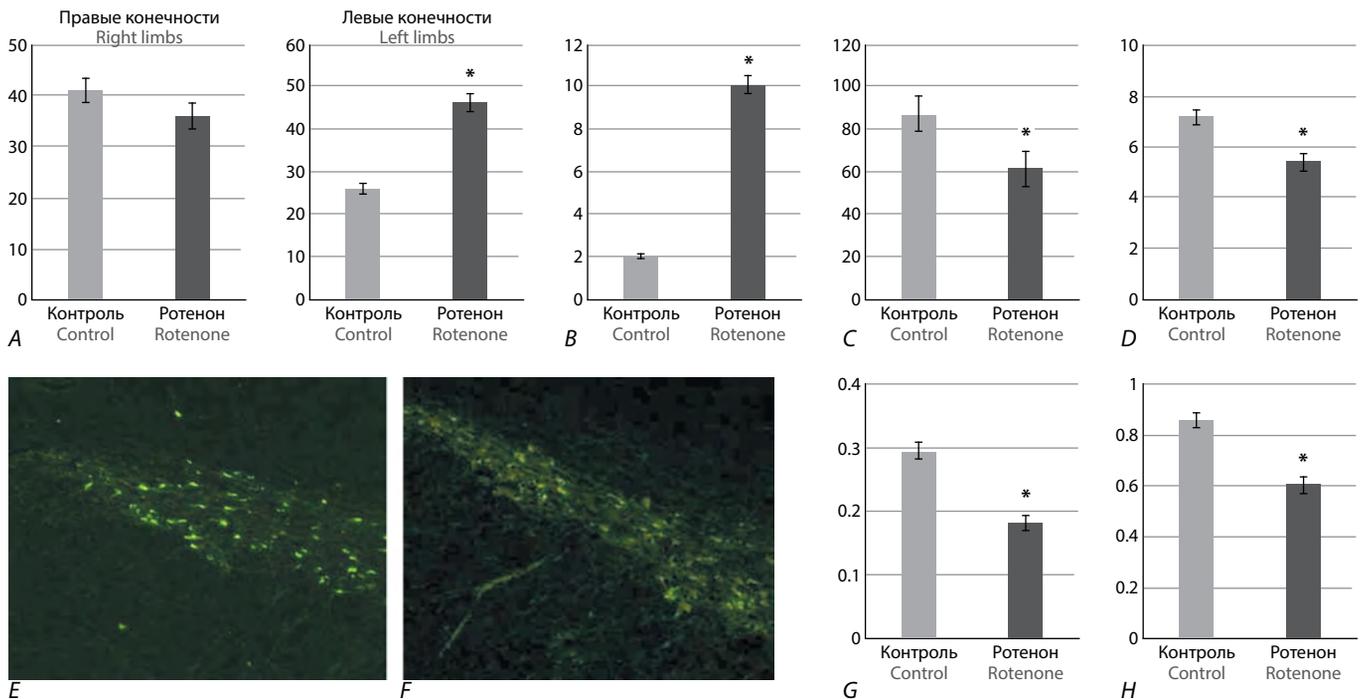


Рис. 1. Моторные и нейродегенеративные изменения у крыс при длительном введении ротенона.

A — количество оступаний правыми и левыми конечностями (% от общего количества шагов) животных контрольной и опытной групп в тесте «сужающаяся дорожка»;
B — количество нарушений прохождения сужающейся дорожки, баллы;
C — дистанция распространения красителя Evans Blue от привратника желудка в каудальном направлении по тонкой кишке через 20 мин после перорального введения красителя, см;
D — количество TH-положительных нейронов в компактной части чёрного вещества на поле зрения;
E — TH-положительные нейроны в компактной части чёрного вещества крысы контрольной группы, × 10;
F — TH-положительные нейроны в компактной части чёрного вещества крысы опытной группы, × 10;
G — количество β-III-тубулин-положительных нервных волокон в межмышечном сплетении тонкой кишки на поле зрения;
H — количество TH-положительных нервных волокон в межмышечном сплетении тонкой кишки на 100 мкм².
 * — $p < 0,05$.

Fig. 1. Motor and neurodegenerative changes in rats after long-term administration of rotenone.

A — number of paw slips with right and left limbs (% of total number of steps) in the control group and the rotenone group in the narrowing beam-walking test;
B — number of errors in the narrowing beam-walking test, points;
C — spread of Evans Blue dye from the pylorus caudally along the small intestine, 20 minutes after oral dye administration, cm;
D — number of TH-positive neurons in pars compacta of the substantia nigra per field of view;
E — TH-positive neurons in pars compacta of the substantia nigra of control animals, × 10;
F — TH-positive neurons in pars compacta of the substantia nigra of experimental animals, × 10;
G — number of β-III-tubulin positive nerve fibres in the Auerbach's plexus of the small intestine per field of view;
H — number of TH-positive nerve fibres in the Auerbach's plexus of the small intestine per 100 μm².

Имуногистохимическое исследование

В чёрном веществе количество TH-положительных нейронов на 0,01 мм² площади среза компактной части чёрного вещества у крыс опытной группы было достоверно ниже, чем в контроле ($5,42 \pm 0,3$ и $7,21 \pm 0,3$; $p < 0,05$, рис. 1, *D–F*).

При общем гистологическом исследовании образцов тонкой кишки крыс опытной группы не обнаружено атрофических, некротических изменений, явных признаков воспаления слизистой оболочки. В межмышечном сплетении тонкого кишечника у крыс опытной группы по сравнению с контролем было достоверно снижено количество и β-III-тубулин-положительных ($0,18 \pm 0,01$ и $0,29 \pm 0,01$; $p < 0,05$; рис. 1, *G*), и TH-положительных ($0,61 \pm 0,03$ и $0,86 \pm 0,03$; $p < 0,05$; рис. 1, *H*) нервных волокон на 100 мкм².

Общий α-синуклеин обнаружен в элементах межмышечного и подслизистого сплетений, нервных волокнах в слизи-

стой оболочке, волокнах, оплетающих сосуды артериального русла, у крыс как контрольной, так и опытной группы (рис. 2, *A–D*). В ганглиях он локализовался преимущественно претерминально, в варикозностях, окружающих тела ганглионарных нейронов, а также в телах небольшого количества нейронов. В опытной группе выявлено значительное повышение интенсивности иммунофлуоресцентного окрашивания на общий α-синуклеин в ганглиях межмышечного сплетения тонкой кишки по сравнению с контролем ($11,05 \pm 0,5$ и $4,22 \pm 0,5$ усл. ед.; $p < 0,05$; рис. 2, *E*), что позволяет предположить увеличение экспрессии этого белка в нервных элементах кишечника на этой модели.

Имунофлуоресцентное окрашивание с помощью антител к фосфорилированному α-синуклеину клона Psyn/81A локализовалось с Chat-положительными (рис. 3, *A–C*) и TH-положительными (рис. 3, *F*), но не с VIP-положительными элементами энтеральной нервной системы (рис. 3, *D, E*).

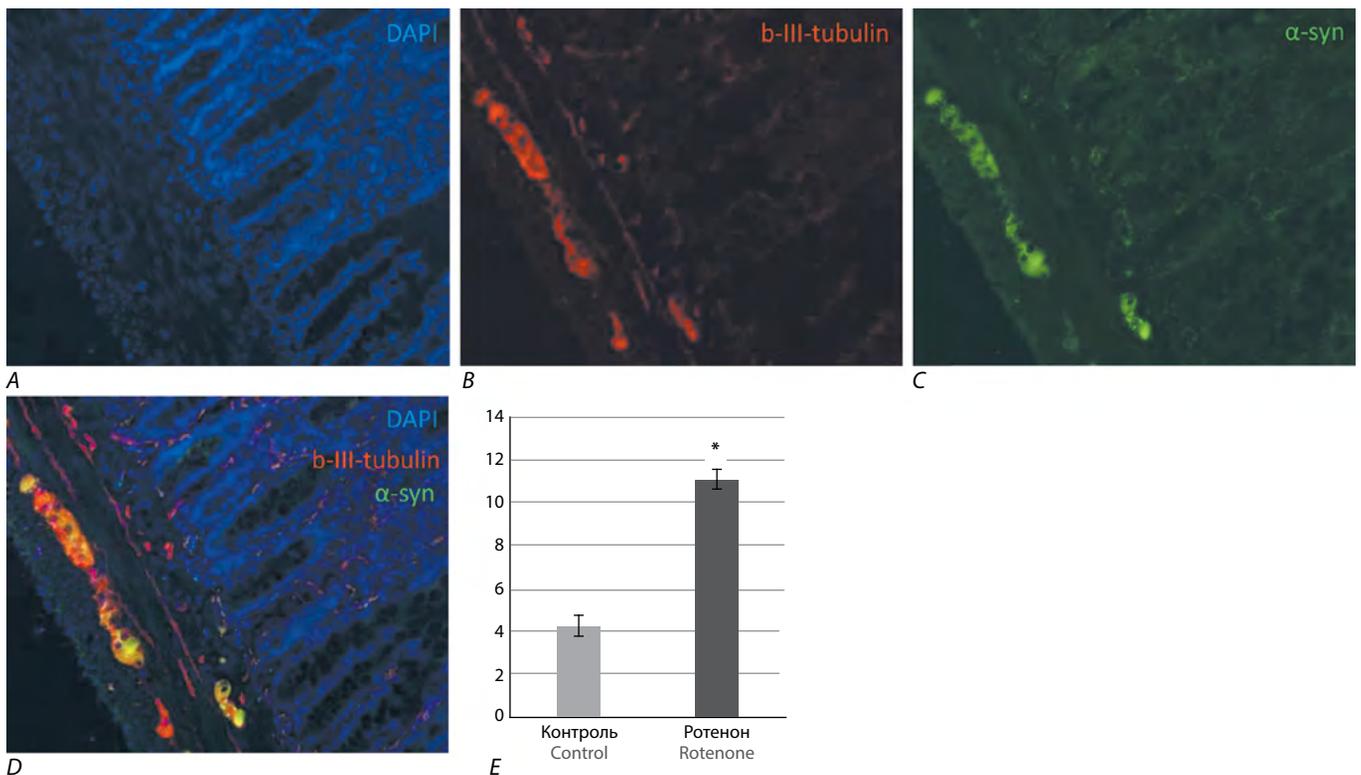


Рис. 2. Общий α -синуклеин (α -syn) в нервной системе кишечника крыс при длительном введении ротенона.
A–D — локализация общего α -синуклеина в β -III-тубулин-позитивных структурах нервной системы кишечника крысы опытной группы, $\times 20$;
A — иммунофлуоресцентное окрашивание на ядра клеток (DAPI, синий);
B — иммунофлуоресцентное окрашивание на β -III-тубулин (красный);
C — иммунофлуоресцентное окрашивание на общий α -синуклеин (красный);
D — результат наложения изображений *A–C*. Области колокализации маркеров β -III-тубулина и общего α -синуклеина — жёлтый, оранжевый;
E — интенсивность иммунофлуоресцентного окрашивания на общий α -синуклеин в ганглиях межмышечного сплетения, усл. ед.
 * $p < 0,05$.

Fig. 2. Total alpha-synuclein (α -syn) in the enteric nervous system of rats after long-term administration of rotenone.
A–D — the location of total alpha-synuclein in the β -III-tubulin positive structures of the enteric nervous system in an experimental animal, $\times 20$;
A — immunofluorescence staining of cell nuclei (DAPI, blue);
B — immunofluorescence staining of β -III-tubulin (red);
C — immunofluorescence staining of total alpha-synuclein (red);
D — the result of overlaying images *A–C*. Areas of β -III-tubulin and total alpha-synuclein colocalization are yellow and orange.
E — intensity of immunofluorescence staining of total alpha-synuclein in the Auerbach's plexus ganglion cells, C.U.
 * $p < 0.05$.

GFAP-позитивная глия выявлялась в межмышечном сплетении крыс и контрольной, и опытной группы. Она располагалась между нейронами, и её отростки, окружая тела нейронов, образовывали слой по периферии ганглия. Плотность расположения GFAP-позитивной глии в мезентеральных ганглиях тонкой кишки, вычисленная путём измерения интенсивности флуоресценции, была ниже у крыс опытной группы по сравнению с контролем ($27 \pm 1,2$ и $36 \pm 1,2$ усл. ед.; $p < 0,05$; рис. 3, *Г*). Двойное мечение на общий α -синуклеин и GFAP не выявило колокализации этих маркеров ни в контроле, ни в эксперименте (рис. 3, *Н*).

Обсуждение

Описанная в настоящей работе модель паркинсонизма с длительным введением крысам ротенона в малых дозах позволяет воспроизвести основные нарушения, характерные для БП: моторный дефицит и дегенерацию нейронов в чёрном веществе головного мозга. У экспериментальных животных выявлено нарушение координации движений,

выражающееся в более частом, по сравнению с контролем, оступании левыми конечностями. Латерализация моторных симптомов характерна для пациентов на ранних стадиях БП, при этом по мере прогрессирования заболевания она может становиться менее выраженной [14]. Двигательная асимметрия имеет большую клиническую значимость для дифференциальной диагностики БП и других сходных паркинсонических синдромов. Вместе с тем общая двигательная активность, определяемая путём измерения средней дистанции пробега в тесте «открытое поле», не была снижена. Не выявлено и других симптомов, характерных для развернутой стадии БП (ригидность, характерная сгорбленная поза, снижение массы тела) и наблюдаемых обычно на «острых» моделях с введением больших доз нейротоксинов [15]. Таким образом, описанная в нашей работе модель воспроизводит начальную стадию БП.

Важно подчеркнуть, что данная модель воспроизводит функциональные и патоморфологические нарушения в ЖКТ, характерные для больных БП (в том числе в ранней

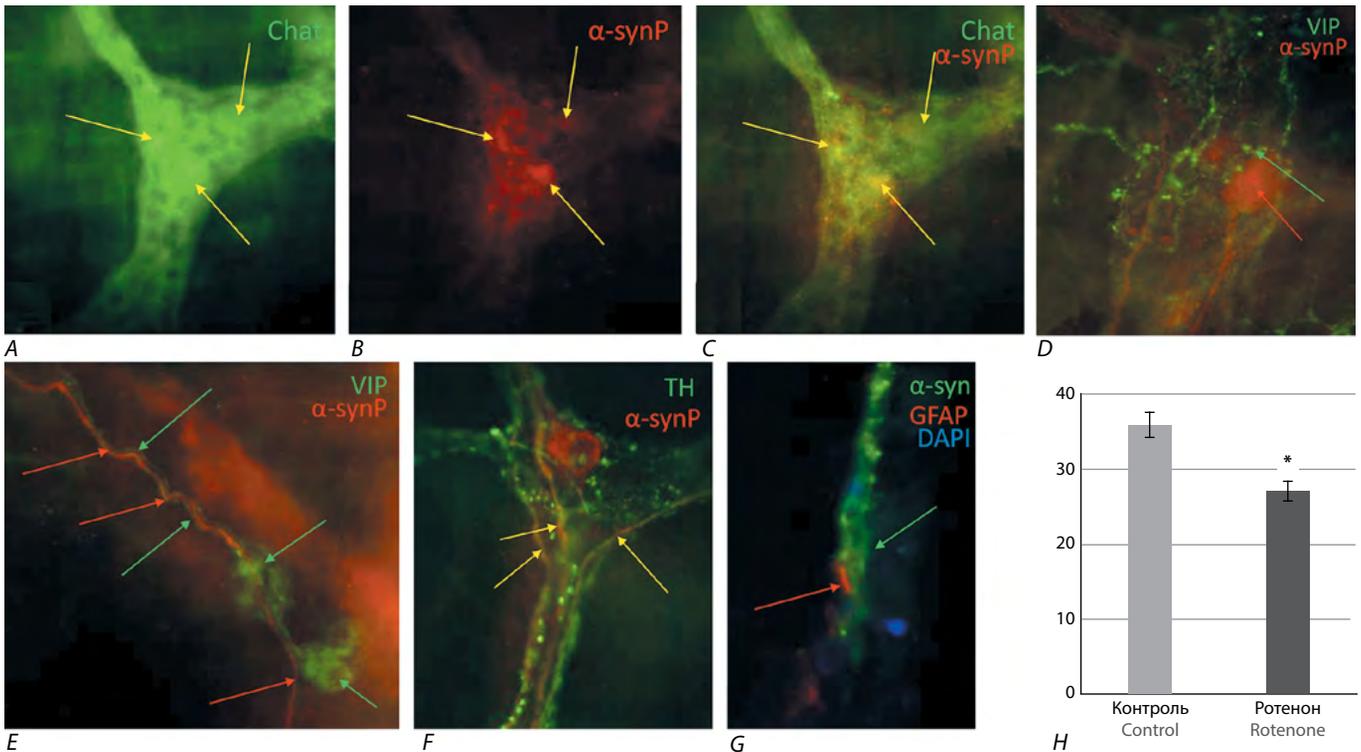


Рис. 3. Локализация фосфорилированного α -синуклеина (α -synP) в структурах межмышечного сплетения тонкой кишки.
A–C — колокализация фосфорилированного α -синуклеина в холинергических нейронах межмышечного сплетения (жёлтые стрелки указывают на тела нейронов, в которых наблюдается колокализация), $\times 20$;
D, E — иммунофлуоресцентное окрашивание на VIP (зелёный цвет, зелёные стрелки) и фосфорилированный α -синуклеин (красный цвет, красные стрелки) в межмышечном сплетении: отсутствие колокализации, $\times 40$;
F — иммунофлуоресцентное окрашивание на TH (зелёный) и фосфорилированный α -синуклеин (красный) в межмышечном сплетении: колокализация в отдельных волокнах (жёлтые стрелки), $\times 40$;
G — иммунофлуоресцентное окрашивание на GFAP (красный, красная стрелка) и общий α -синуклеин (зелёный, зелёная стрелка) в ганглиях межмышечного сплетения: отсутствие колокализации, $\times 40$;
H — интенсивность иммунофлуоресцентного окрашивания на GFAP в ганглиях межмышечного сплетения, усл. ед.
 * — $p < 0,05$.

Fig. 3. Location of phosphorylated α -synuclein (α -synP) in the Auerbach's plexus of the small intestine.
A–C — colocalization of phosphorylated α -synuclein in cholinergic neurons of the Auerbach's plexus (yellow arrows indicate cell bodies with colocalization), $\times 20$;
D, E — immunofluorescence staining for VIP (green colour, green arrows) and phosphorylated α -synuclein (red colour, red arrows) in the Auerbach's plexus: no colocalization, $\times 40$;
F — immunofluorescence staining for TH (green) and phosphorylated α -synuclein (red) in the Auerbach's plexus: colocalization in individual fibres (yellow arrows), $\times 40$;
G — immunofluorescence staining for GFAP (red, red arrow) and total α -synuclein (green, green arrow) in the Auerbach's plexus ganglion cells: no colocalization, $\times 40$;
H — intensity of immunofluorescence staining for GFAP in the Auerbach's plexus ganglion cells, C.U.
 * — $p < 0.05$.

моторной и премоторной её стадиях). Так, симптомы замедления опорожнения желудка и снижения моторики тонкой кишки, выявленные у животных после длительного введения ротенона, описаны у пациентов с БП [16, 17]; это же относится и к повышению интенсивности окрашивания на α -синуклеин в межмышечном сплетении [18].

Длительное введение ротенона вызывало снижение плотности расположения и общего количества нервных волокон, выявляемых с помощью β -III-тубулина, и TH-позитивных нервных волокон в стенке тонкого кишечника. Ранее в пилотном исследовании мы выявили у крыс после 1 мес введения ротенона в той же дозировке снижение количества TH-позитивных волокон в миеэнтеральном сплетении, но не общего количества волокон [19]. TH-позитивные волокна в тонкой кишке крыс представляют собой симпатические эфферентные волокна [20].

Таким образом, выявленная симпатическая денервация тонкой кишки предшествует дегенерации нервных волокон собственных энтеральных сплетений тонкой кишки, образующих основную массу β -III-тубулин-позитивных волокон.

При моделировании периферического развития паркинсонизма особый интерес представляет выявление уязвимых популяций нейронов и нервных волокон, которые могут являться первоначальным звеном в цепи патологических изменений и распространения в структуры ЦНС α -синуклеина. В нашем исследовании общий α -синуклеин был выявлен и у экспериментальных, и у контрольных животных, преимущественно в секреторных окончаниях аксонов, что согласуется с данными литературы [21], однако его содержание в ганглиях экспериментальных животных было значительно выше.

Для уточнения накопления и локализации фосфорилированной формы белка, ассоциированного с развитием БП, дополнительно на тотальных препаратах проведено двойное иммуномечение на фосфо- α -синуклеин и маркеры основных популяций миэнтеральных нейронов — возбуждающих и тормозных. Фосфорилированный α -синуклеин был выявлен в возбуждающих (Chat-позитивных), но не в тормозных (VIP-позитивных) элементах энтеральной нервной системы. Это указывает на уязвимость холинергических структур при развитии патологического процесса, связанного с повышением экспрессии, модификацией, агрегацией и распространением α -синуклеина, и, возможно, их поражение приводит к нарушению моторики тонкой кишки и замедлению кишечного транзита, наблюдаемого на данной ротеноновой модели.

Несмотря на то, что в нервных сплетениях кишечника имеются собственные холинергические нейроны, согласно данным литературы, лишь небольшое количество (13–22%) миэнтеральных нейронов позитивны к общему α -синуклеину, в то время как все преганглионарные волокна блуждающего нерва и их аксональные терминалы содержат α -синуклеин [21]. Кроме того, было продемонстрировано, что после ваготомии количество α -синуклеин-позитивных аксонов и аксональных варикозностей в межмышечном сплетении снижалось вдвое [22]. Взятые вместе, эти данные позволяют полагать, что часть выявленных в нашем исследовании фосфо- α -синуклеин-позитивных холинергических волокон энтеральных сплетений тонкой кишки, вероятно, являются эфферентными волокнами блуждающего нерва. Это косвенно указывает на возможную роль блуждающего нерва в патологическом процессе, связанном с накоплением и распространением патологических форм α -синуклеина в структуры ЦНС. Кроме того, фосфорилированный α -синуклеин был выявлен и в некоторых TH-позитивных волокнах, что, возможно, свидетельствует о вовлечении на ранней стадии в патологический процесс симпатической нервной системы, что требует дальнейшего изучения, в том числе исследования симпатических ядер спинного мозга. Необходимо также на данной модели провести количественную оценку содержания фосфо- α -синуклеина в нервных структурах различной эргичности,

которая в настоящем исследовании была затруднена в связи с использованием тотальных препаратов кишки, имеющих слишком большую толщину и содержащих, помимо нервных элементов, серозную и мышечную оболочки, создающие значительное фоновое окрашивание.

Длительное оральное введение крысам ротенона в низкой дозе не вызвало реактивного глиоза в миэнтеральных ганглиях. Более того, интенсивность иммунофлюоресцентного окрашивания на GFAP у экспериментальных животных была снижена по сравнению с контролем, что согласуется с результатами, полученными на мышах при длительном подкожном введении им ротенона в малых дозах [23]. Вероятно, это снижение является следствием токсического воздействия ротенона на клетки ганглионарной глии. Однако одного снижения интенсивности иммунофлюоресцентного окрашивания на GFAP не достаточно для того, чтобы предполагать снижение количества глиальных клеток. Отсутствие реактивного глиоза также не позволяет утверждать об отсутствии нейродегенерации в миэнтеральных ганглиях, поскольку в рамках настоящего исследования специально не проводились количественные исследования нейронов. На предложенной модели клетки глии в ганглиях, по-видимому, не играют роли в процессах поглощения, накопления, распространения патологических форм α -синуклеина в структурах межмышечного сплетения, поскольку двойное иммуномечение на общий α -синуклеин (включающий нативную форму и посттрансляционно изменённые формы этого белка) и GFAP не выявило колокализации этих маркеров ни в контроле, ни в эксперименте. Эти результаты согласуются с данными работы [24], в которой авторы на модели с оральным введением мышам другого широко используемого токсина — параквата — не выявили в GFAP-позитивной глии включений фосфорилированной формы α -синуклеина.

Таким образом, в настоящей работе на предложенной модели ранней стадии паркинсонизма воспроизведены нарушения со стороны ЖКТ, сходные с таковыми у пациентов с БП. Их морфологическим субстратом является денервация кишечника с накоплением в структурах энтеральной нервной системы α -синуклеина.

Список источников / References

1. Klingelhofer L., Reichmann H. The gut and nonmotor symptoms in Parkinson's disease. *Int. Rev. Neurobiol.* 2017; 134: 787–809. DOI: 10.1016/bs.irn.2017.05.027
2. Pfeiffer R.F. Non-motor symptoms in Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat. Disord.* 2016;22(Suppl 1): S119–S122. DOI: 10.1016/j.parkreldis.2015.09.004
3. Jellinger K.A. Synuclein deposition and non-motor symptoms in Parkinson disease. *J. Neural. Sci.* 2011; 310(1–2): 107–111. DOI: 10.1016/j.jns.2011.04.012
4. Braak H., Rub U., Gai W.P., Del Tredici K. Idiopathic Parkinson's disease: possible routes by which vulnerable neuronal types may be subject to neuroinvasion by an unknown pathogen. *J. Neural. Transm.* 2003; 110(5): 517–536. DOI: 10.1007/s00702-002-0808-2
5. Del Tredici K., Rub U., De Vos R.A. et al. Where does Parkinson disease pathology begin in the brain? *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 2002; 61(5): 413–426. DOI: 10.1093/jnen/61.5.413
6. Del Tredici K., Braak H. A not entirely benign procedure: progression of Parkinson's disease. *Acta Neuropathol.* 2008; 115(4): 379–384. DOI: 10.1007/s00401-008-0355-5
7. Rietdijk C.D., Perez-Pardo P., Garssen J. et al. Exploring Braak's hypothesis of Parkinson's disease. *Front. Neurol.* 2017; 8: 37. DOI: 10.3389/fneur.2017.00037
8. Innos J., Hickey M.A. Using rotenone to model Parkinson's Disease in mice: a review of the role of pharmacokinetics. *Chem. Res. Toxicol.* 2021; 34(5): 1223–1239. DOI: 10.1021/acs.chemrestox.0c00522
9. Tanner C.M., Kamel F., Ross G.W. et al. Rotenone, paraquat, and Parkinson's disease. *Environ. Health Perspect.* 2011; 119(6): 866–872. DOI: 10.1289/ehp.1002839
10. Betarbet R., Sherer T.B., MacKenzie G. et al. Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson's disease. *Nat. Neurosci.* 2000; 3(12): 1301–136. DOI: 10.1038/81834
11. Miyazaki I., Isooka N., Imafuku F. et al. Chronic systemic exposure to low-dose rotenone induced central and peripheral neuropathology and motor deficits in mice: reproducible animal model of Parkinson's disease. *Int. J. Mol. Sci.* 2020; 21(9): 3254. DOI: 10.3390/ijms21093254
12. Pan-Montojo F., Anichtchik O., Dening Y. et al. Progression of Parkinson's disease pathology is reproduced by intragastric administration of rotenone in mice. *PLoS One.* 2010; 5(1): e8762. DOI: 10.1371/journal.pone.0008762
13. Pan-Montojo F., Schwarz M., Winkler C. et al. Environmental toxins trigger PD-like progression via increased alpha-synuclein release from enteric neurons in mice. *Sci. Rep.* 2012; 2: 898. DOI: 10.1038/srep00898

14. Riederer P., Jellinger K.A., Kolber P. et al. Lateralisation in Parkinson disease. *Cell Tissue Res.* 2018; 373(1): 297–312.
DOI: 10.1007/s00441-018-2832-z
15. Johnson M.E., Bobrovskaya L. An update on the rotenone models of Parkinson's disease: their ability to reproduce the features of clinical disease and model gene-environment interactions. *Neurotoxicology.* 2015; 46: 101–116.
DOI: 10.1016/j.neuro.2014.12.002
16. Dutkiewicz J., Szlufik S., Nieciecki M. et al. Small intestine dysfunction in Parkinson's disease. *J. Neural. Transm.* 2015; 122(12): 1659–1661.
DOI: 10.1007/s00702-015-1442-0
17. Marrinan S., Emmanuel A.V., Burn D.J. Delayed gastric emptying in Parkinson's disease. *Mov. Disord.* 2014; 29(1): 23–32.
DOI: 10.1002/mds.25708
18. Yan F., Chen Y., Li M. et al. Gastrointestinal nervous system α -synuclein as a potential biomarker of Parkinson disease. *Medicine (Baltimore).* 2018; 97(28): e11337.
DOI: 10.1097/MD.00000000000011337
19. Иванов М.В., Кутукова К.А., Художерков Р.М. Морфохимические изменения в нервной системе тонкого кишечника крыс при длительном пероральном введении ротенона. *Асимметрия.* 2018; 12(4): 217–222.
Ivanov M.V., Kutukov K.A., Khudoerkov R.M. Morphochemical changes in the nervous system of the small intestine in rats with prolonged oral administration of

- rotenone. *Journal of asymmetry.* 2018; 12(4): 217–222. (In Russ.)
DOI: 10.18454/ASY.2018.12.4.009
20. Phillips R.J., Hudson C.N., Powley T.L. Sympathetic axonopathies and hyperinnervation in the small intestine smooth muscle of aged Fischer 344 rats. *Auton. Neurosci.* 2013; 179(1–2): 108–121.
DOI: 10.1016/j.autneu.2013.09.002
21. Phillips R.J., Walter G.C., Wilder S.L. et al. Alpha-synuclein-immunopositive myenteric neurons and vagal preganglionic terminals: autonomic pathway implicated in Parkinson's disease? *Neuroscience.* 2008; 153: 733–750.
DOI: 10.1016/j.neuroscience.2008.02.074
22. Schmid W., van der Zypen E., Keller H. Die Wirkung einer subtotalen Vagotomie auf den Plexus myentericus (Auerbach) verschiedener Darmabschnitte. *Acta Anat.* 1979; 104: 36–51.
23. Miyazaki I., Isooka N., Wada K. et al. Effects of enteric environmental modification by coffee components on neurodegeneration in rotenone-treated mice. *Cells.* 2019; 8(3): 221.
DOI: 10.3390/cells8030221
24. Naudet N., Antier E., Gaillard D. et al. Oral exposure to paraquat triggers earlier expression of phosphorylated α -synuclein in the enteric nervous system of A53T mutant human α -synuclein transgenic mice. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 2017; 76(12): 1046–1057.
DOI: 10.1093/jnen/nlx092

Информация об авторах

Иванов Михаил Викторович — м.н.с. лаб. нейроморфологии ФГБНУ «Научный центр неврологии», Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-5947-9093>
Кутукова Кристина Александровна — м.н.с. лаб. нейроморфологии ФГБНУ «Научный центр неврологии», Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-5483-9157>

Вклад авторов. Иванов М.В., Кутукова К.А. внесли равный вклад в написание статьи. Все соавторы внесли существенный вклад в разработку концепции, проведение исследования и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию перед публикацией.

Information about the authors

Mikhail V. Ivanov — junior researcher, Laboratory of neuromorphology, Research Center of Neurology, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-5947-9093>
Kristina A. Kutukova — junior researcher, Laboratory of neuromorphology, Research Center of Neurology, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-5483-9157>

Author contribution. Ivanov M.V., Kutukova K.A. contributed equally to the writing of the article. All authors made a substantial contribution to the conception of the work, acquisition, analysis, interpretation of data for the work, drafting and revising the work, final approval of the version to be published.