

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ
РАБОТЫ

УДК 616.8-085.2/.3

**ИНДУКЦИЯ БЕЛКА-ТРАНСПОРТЕРА ГЛИКОПРОТЕИНА-Р
В ГЕМАТОЭНЦЕФАЛИЧЕСКОМ БАРЬЕРЕ КАК СПОСОБ
ПРОФИЛАКТИКИ ПАРКИНСОНИЧЕСКОГО СИНДРОМА**

© 2020 г. М. М. Градинарь¹, И. В. Черных¹, А. В. Щулькин¹, *, А. С. Есенина¹, Е. Н. Якушева¹

¹Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования
“Рязанский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова”
Министерства здравоохранения Российской Федерации, Рязань, Россия

Поступила в редакцию 12.12.2019 г.

После доработки 10.02.2020 г.

Принята к публикации 16.02.2020 г.

В работе оценена перспектива индукции белка-транспортера гликопротеина-Р (Pgp) в гематоэнцефалическом барьере для профилактики развития паркинсонического синдрома, вызванного введением нейротоксина – ротенона. Исследование выполнено на 48 крысах-самцах. 1-й серии подкожно вводили масло подсолнечное (1 мл/кг) курсом 28 дней; 2-й серии внутривенно вводили рифампицин (20 мг/кг) дважды в день в течение 14 суток для индукции функционирования Pgp; 3-й серии подкожно вводили ротенон (2.5 мг/кг) 1 раз в день в течение 28 дней для моделирования паркинсонического синдрома; 4-й серии вводили рифампицин (20 мг/кг) в течение 7 дней, а затем ротенон (2.5 мг/кг) совместно с рифампицином курсом 28 дней. У животных оценивали развитие признаков паркинсонизма, методом иммуноферментного анализа определяли содержание дофамина в среднем мозге и стриатуме и количество Pgp в среднем мозге. Установлено, что введение ротенона приводило к развитию признаков паркинсонизма и снижению концентрации дофамина в стриатуме и среднем мозге, при этом количество Pgp в среднем мозге достоверно не изменялось по сравнению с контрольными животными. При введении рифампицина отмечалось увеличение количества Pgp в среднем мозге, при этом признаки паркинсонизма отсутствовали, а концентрация дофамина в стриатуме и среднем мозге не изменялась по сравнению с серией контроля. Совместное введение рифампицина и ротенона приводило к уменьшению выраженности признаков паркинсонизма, повышению уровня дофамина в стриатуме и среднем мозге и увеличению количества Pgp в среднем мозге по сравнению с крысами, получавшими только ротенон. Результаты эксперимента свидетельствуют о способности рифампицина замедлять прогрессирование паркинсонизма, вызванного введением ротенона, что, вероятно, обусловлено снижением проникновения нейротоксина в головной мозг. Таким образом, индукция функционирования белка-транспортера Pgp может рассматриваться как способ профилактики развития паркинсонического синдрома нейротоксического генеза, однако требуются дальнейшие исследования с применением других нейротоксинов и индукторов Pgp.

Ключевые слова: гликопротеин-Р, паркинсонический синдром, ротенон, нейротоксины, рифампицин, гематоэнцефалический барьер

DOI: 10.31857/S1027813320030048

ВВЕДЕНИЕ

Болезнь Паркинсона – хроническое прогрессирующее нейродегенеративное заболевание центральной нервной системы, одной из причин которого является дисфункция гематоэнцефалического барьера (ГЭБ) с нарушением структуры плотных контактов и дисрегуляцией белков-транспортеров, приводящая к накоплению нейротоксинов в головном мозге [1].

Гликопротеин-Р (Pgp, ABCB1-белок) – один из переносчиков, локализованный в эндотелиоцитах ГЭБ, представляющий собой эффлюксный АТФ-зависимый трансмембранный белок, препятствующий проникновению из крови в головной мозг большого числа эндогенных и экзогенных веществ различной химической структуры, в том числе нейротоксинов [2, 3].

Ряд исследований продемонстрировал угнетение функционирования Pgp в ГЭБ и снижение его протекторной функции в качестве одного из патогенетических звеньев болезни Паркинсона [4–6]. Можно предположить, что индукция ак-

* Адресат для корреспонденции: 390026 Россия, Рязань, ул. Высоковольная, д. 9, тел.: 8-4912-460859, e-mail: aleksey-shulkin@rambler.ru.

тивности Pgr в ГЭБ позволит снизить проницаемость нейротоксинов-субстратов данного белка-транспортера в головной мозг и, соответственно, замедлить или предотвратить повреждение нейронов черной субстанции.

Целью исследования была оценка перспектив индукции белка-транспортера Pgr в ГЭБ среднего мозга крыс для профилактики развития паркинсонического синдрома, вызванного введением нейротоксина—ротенона.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование выполнено на 48 крысах-самцах Вистар массой 280–320 г в соответствии с правилами лабораторной практики (приказ МЗ РФ № 199н от 1 апреля 2016 г.).

Протокол исследования был рассмотрен и утвержден на заседании Комиссии по контролю за содержанием и использованием лабораторных животных № 11 от 29.01.2018 г.

Все животные были разделены на 2 группы. Первая группа включала животных, у которых в среднем мозге и стриатуме определяли концентрацию дофамина, вторая группа представлена крысами, у которых оценивали количество Pgr в среднем мозге.

Каждая группа была разделена следующим образом:

1) Контрольные животные ($n = 6$), которым подкожно вводили масло подсолнечное в дозе 1 мл/кг курсом 28 дней, которое фильтровали и стерилизовали через фильтрующую насадку из ацетата целлюлозы с префильтром с диаметром пор 0.2 мкм (“Corning”, США) и подогревали до температуры 35°C. Стерильное подсолнечное масло использовали также для приготовления масляного раствора ротенона.

2) Животные ($n = 6$), которым внутривентрикулярно вводили суспензию рифампицина (“Белмед-препараты”, Республика Беларусь) в дозе 20 мг/кг в крахмальном клейстере дважды в день в течение 14 сут [7] для индукции функционирования Pgr в ГЭБ.

3) Животные (контроль патологии, $n = 9$), которым подкожно вводили масляный раствор (содержащий 2% диметилсульфоксида) ротенона (“Sigma”, США) в дозе 2.5 мг/кг 1 раз в день в течение 28 дней для моделирования паркинсонического синдрома [8, 9].

4) Животные ($n = 8$), которым внутривентрикулярно вводили суспензию рифампицина в дозе 20 мг/кг в крахмальном клейстере дважды в день в течение 7 дней, а затем в течение 28 дней — ротенон подкожно в дозе 2.5 мг/кг один раз в сутки совместно с внутривентрикулярным введением рифампицина в дозе 20 мг/кг два раза в день.

Летальность при введении ротенона (в 3-й и 4-й сериях эксперимента) составила 29.4%, поэтому в итоговое исследование в каждую группу было включено по 6 животных из числа выживших.

У животных всех серий оценивали основные (наличие гипо-, бради- и олигокинезии, постуральная нестабильность, неустойчивая походка) и дополнительные (ригидность мышц, тремор покоя, нарушение равновесия) признаки паркинсонизма по трехбалльной шкале, где 1 балл соответствовал низкой степени выраженности признака, 2 балла — средней степени, 3 балла — высокой степени, после чего рассчитывали суммарную выраженность признаков паркинсонизма [10].

Крыс выводили из эксперимента декапитацией под внутривенным золегиловым наркозом в дозе 30 мг/кг массы (“Золетил 100”, “Virbac S.A.”, Франция).

У животных первой группы методом иммуноферментного анализа (ELISA kit “Cloud-Clone Corp”, Китай) определяли содержание дофамина в среднем мозге и стриатуме. Для этого образцы тканей гомогенизировали на гомогенизаторе DIAX 900 (“Heidolph”, Германия) при 26000 об./мин в фосфатном буфере (pH 7.2) на холоде в соотношении 1 : 10 в течение 1 мин, затем центрифугировали при 1750 g 10 мин. Анализировали надосадочный слой. Количество дофамина рассчитывали в пересчете на массу ткани, взятую для исследования.

У крыс второй группы методом иммуноферментного анализа (ELISA kit “BlueGene”, Китай) определяли количество Pgr в среднем мозге. Образцы тканей гомогенизировали на гомогенизаторе DIAX 900 при 26000 об./мин в фосфатном буфере (pH 7.2) на холоде в соотношении 1 : 1 в течение 1 мин, затем подвергали трехкратному замораживанию—размораживанию при –20°C для разрушения цитоплазматических мембран, а затем центрифугировали при 1500 g 15 мин. Анализировали надосадочный слой. Количество транспортера рассчитывали в пересчете на общую массу белка, которую определяли по методу Брэдфорда (“Themofisher” kit, Германия).

Статистическую обработку результатов проводили с использованием программы “Statsoft Statistica 7.0 (США)”. Характер распределения данных определяли по критерию Шапиро—Уилка. При нормальном распределении статистическую значимость различий оценивали с помощью теста ANOVA, попарные сравнения выполняли с помощью критерия Тьюки. При распределении данных, отличном от нормального, различия между сериями оценивали с помощью критерия Крускала—Уоллиса. При уровне значимости менее 0.05 проводили парное сравнение параметров с помощью критерия Манна—Уитни с поправкой Бонферонни. Данные представлены в виде среднего арифметического \pm стандартное отклонение при

Таблица 1. Признаки выраженности паркинсонизма

Серия/ показатель	Введение масла подсолнечного (серия 1)	Введение рифампицина (серия 2)	Введение ротенона (серия 3)	Введение рифампицина и ротенона (серия 4)
Гипо-, бради- и олигокинезия, баллы	0 (0; 0)	0 (0; 0)	1 (1; 2)*	0 (0; 0)#
Постуральная нестабильность, баллы	0 (0; 0)	0 (0; 0)	1 (1; 2)*	1 (1; 1)*
Неустойчивость походки, баллы	0 (0; 0)	0 (0; 0)	1 (0; 2)	1 (1; 1)*
Ригидность мышц, баллы	0 (0; 0)	0 (0; 0)	2 (1; 2)*	1 (0; 1)
Тремор покоя, баллы	0 (0; 0)	0 (0; 0)	1 (1; 2)*	1 (0; 1)
Оценка равновесия, баллы	0 (0; 0)	0 (0; 0)	2 (2; 3)*	1 (1; 1)*, #
Суммарное значение, баллы	0 (0; 0)	0 (0; 0)	8 (6; 10)*	4,5 (3,5;5)*, #

Примечание. * Достоверные различия с контрольной серией ($p < 0.05$); # достоверные различия с показателями серии 3 ($p < 0.05$).

нормальном распределении данных или медианы, нижнего и верхнего квартилей при распределении данных, отличном от нормального.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящем исследовании паркинсонический синдром моделировали подкожным введением ротенона. Ротенон является липофильным пестицидом из семейства изофлавоноидов, систематическое введение которого вызывает подавление активности митохондриального комплекса I. Данные биохимические изменения приводят к избирательной дегенерации дофаминергических нейронов nigrostriatum с последующим ограничением дофаминергической нейротрансмиссии в головном мозге и нарушениям двигательных функций, характерным для болезни Паркинсона [11].

Введение ротенона в дозе 2.5 мг/кг 1 раз в день в течение 28 сут приводило к развитию типичных признаков паркинсонизма (табл. 1): снижалась двигательная активность, появлялись постуральная неустойчивость, неустойчивость походки, ригидность мышц и тремор покоя, нарушалось равновесие. Суммарный балл выраженности признаков паркинсонизма составил 8 (6; 10) и достоверно превышал

показатели контрольных животных ($p < 0.05$) (табл. 1).

Концентрация дофамина в серии введения ротенона в стриатуме и среднем мозге снижалась на 92.8 и 67.2% ($p < 0.05$) соответственно по сравнению с показателями контроля (рис. 1). В то же время количество Pgr в среднем мозге достоверно не изменялось, что свидетельствует об отсутствии динамики экспрессии данного белка-транспортера при моделировании паркинсонизма введением ротенона (рис. 2).

Введение классического индуктора Pgr рифампицина в дозе 20 мг/кг в течение 14 суток приводило к увеличению количества белка-транспортера в среднем мозге на 230.2% ($p < 0.05$) по сравнению с показателями контрольных животных, что свидетельствует о повышении экспрессии Pgr (рис. 2). Признаки паркинсонизма у животных отсутствовали, а концентрация дофамина в среднем мозге и стриатуме достоверно не изменялась по сравнению с контрольными крысами (табл. 1, рис. 1). Таким образом, в данной серии было показано индуцирующее влияние рифампицина на Pgr в ГЭБ.

Предварительное введение рифампицина в дозе 20 мг/кг в течение 7 дней перед введением ротенона, а затем совместно с нейротоксином в

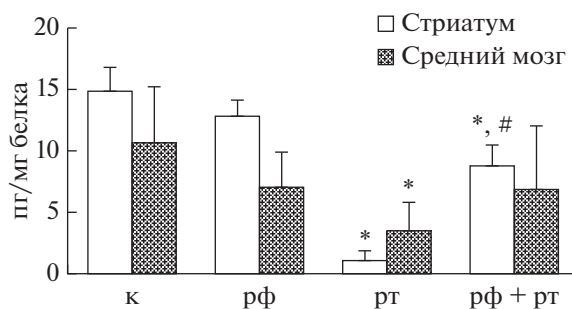


Рис. 1. Влияние ротенона и рифампицина на концентрацию дофамина в среднем мозге (среднее и стандартное отклонение). Примечание: к – контроль, рф – рифампицин, рт – ротенон; * достоверные различия с контрольной серией ($p < 0.05$); # достоверные различия с показателями животных, получавших ротенон ($p < 0.05$).

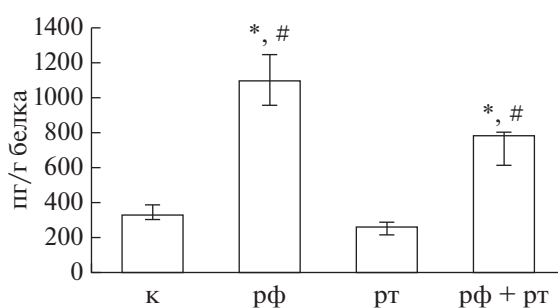


Рис. 2. Влияние ротенона и рифампицина на концентрацию гликопротеина-Р в среднем мозге (медиана, верхний и нижний квартили). Примечание: к – контроль, рф – рифампицин, рт – ротенон; * достоверные различия с контрольной серией ($p < 0.05$); # достоверные различия с показателями животных, получавших ротенон ($p < 0.05$).

течение 28 дней также приводило к повышению количества Pgr в среднем мозге по сравнению с показателями контрольных животных на 135.8% ($p < 0.05$), а по сравнению со значениями крыс, получавших только ротенон, – на 202.8% ($p < 0.05$) (рис. 2).

У экспериментальных животных данной серии уменьшалась выраженность признаков паркинсонизма по сравнению с крысами, получавшими только ротенон (табл. 1), суммарный балл выраженности признаков паркинсонизма снизился на 43.7% ($p < 0.05$) (табл. 1).

Уровень дофамина в стриатуме у животных четвертой серии составлял 8.77 ± 1.64 пг/мг ткани, что в 8.27 раза превосходило аналогичный показатель третьей серии (контроль патологии) ($p < 0.05$), однако оставался ниже значений нормы в 1.69 раза ($p < 0.05$) (рис. 1). В среднем мозге введение индуктора Pgr рифампицина совместно с ротеноном приводило к нормализации концентрации дофамина, значения данного показателя достоверно не отличались от показателей контроля (серия 1).

Известно, что ротенон является субстратом Pgr, как и ряд других нейротоксинов [12], т.е. степень его проникновения в головной мозг, а, следо-

вательно, и нейротоксичность зависят от интенсивности эффлюкса данным белком-транспортером. Снижение функционирования Pgr в ГЭБ может привести к аккумуляции в головном мозге нейротоксинов – субстратов белка-транспортера и, как следствие, способствовать развитию нейрогенеративных процессов [13].

Для оценки перспективности индукции Pgr в ГЭБ с целью профилактики развития паркинсонизма животным совместно с ротеноном вводили классический индуктор Pgr – рифампицин. Рифампицин является непрямым индуктором функционирования Pgr, активирующим экспрессию транскрипционного фактора – пре-гнан-Х-рецептора (PXR) [14, 15]. Поскольку воздействие данного индуктора на синтез транспортера развивается постепенно, введение рифампицина крысам начинали за 7 дней до использования ротенона и продолжали параллельно с ним.

Снижение выраженности признаков паркинсонизма и одновременное повышение уровня дофамина в стриатуме и среднем мозге крыс при совместном введении рифампицина и ротенона по сравнению с животными, получавшими только ротенон, свидетельствует о способности рифампицина замедлять прогрессирование паркинсо-

низма, обусловленного воздействием нейротоксина. Поскольку в серии совместного применения рифампицина и ротенона количество Pgp в среднем мозге увеличивается, по сравнению с серией изолированного введения ротенона, противопаркинсонический эффект рифампицина, вероятнее всего, обусловлен снижением проникновения субстрата Pgp ротенона в головной мозг.

Способность повышать активность белка-транспортера выявлена у ряда лекарственных средств (дексаметазона, карбамазепина, морфина, рифампицина, фенитоина, ретиноевой кислоты, фенотиазина), однако данные препараты обладают широким спектром фармакологических эффектов, а также нежелательных лекарственных реакций, что препятствует их применению в качестве индукторов Pgp. Таким образом, актуальным является поиск селективного индуктора белка-транспортера в ГЭБ и его исследование в качестве средства для профилактики паркинсонизма нейротоксического генеза, например, у лиц, по роду своей профессиональной деятельности, контактирующих с токсическими веществами.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Индукция функционирования белка-транспортера Pgp в ГЭБ может рассматриваться как способ профилактики развития паркинсонического синдрома нейротоксического генеза, однако требуются дальнейшие исследования с применением других нейротоксинов и индукторов Pgp.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа поддержана грантом РФФИ №18-415-620003 p_a.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ

Конфликт интересов. Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

Этическое одобрение. Все применимые международные, национальные и/или институциональные

принципы ухода и использования животных были соблюдены.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Desai B.S., Monahan A.J., Carvey P.M., Hendey B.* // Cell. Transplant. 2007. V. 16. P. 285–299.
2. *Abdullahi W., Davis T.P., Ronaldson P.T.* // AAPS J. 2017. V. 19. № 4. P. 931–939.
3. *Черных И.В., Шулькин А.В., Гацанова М.В., Попова Н.М., Есенина А.С., Градинарь М.М., Якушева Е.Н.* // Наука молодых (ERUDITIO JUVENTUM). 2019. Т. 7. № 3. С. 46–52.
4. *Черных И.В., Шулькин А.В., Мыльников П.Ю., Гацанова М.В., Есенина А.С., Градинарь М.М., Якушева Е.Н.* // Росс. мед.-биол. вестн. 2019. Т. 27. № 2. С. 150–160.
5. *Guhaniyogi J., Brewer G.* // Gene. 2001. V. 265. № 1–2. P. 11–23.
6. *Bauer M., Wulkersdorfer B., Karch R., Philippe C., Jager W., Stanek J.* // Br. J. Clin. Pharmacol. 2017. V. 83. № 9. P. 1991–1999.
7. *Rana S.V., Pal R., Vaiphie K., Singh K.* // Mol. Cell. Biochem. 2006. V. 289. № 1–2. P. 39–47.
8. *Воронков Д.Н., Дикалова Ю.В., Худоберков П.М.* // Анналы неврологии. 2013. Т. 7. № 2. С. 34–38.
9. *Миронов А.Н.* Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая. М.: Гриф и К, 2012. 944 с.
10. *Воронина Т.А., Вальдман Е.А., Неробкова Л.Н.* // Ведомости Научного центра экспертизы и государственного контроля лекарственных средств. 1999. № 1. Режим доступа: http://www.drugreg.ru/Doc/Vedomosti/0999-1/Vedomosti0999-1_4-3.htm. (дата обращения: 30.08.2019).
11. *Begley D.J.* // Curr. Pharm. Des. 2004. V. 10. № 12. P. 1295–1312.
12. *Lacher S.E., Skagen K., Veit J., Dalton R., Woodah E.L.* // J. Pharmacol. Exp. Ther. 2015. V. 355. № 1. P. 99–107.
13. *Erdo F., Krajcsi P.* // Front Aging Neurosci. 2019. V. 11. P. 196. Published online July 30, 2019.
14. *Черных И.В., Шулькин А.В., Мыльников П.Ю., Гацанова М.В., Попова Н.М., Якушева Е.Н.* // Нейрохимия. 2019. Т. 36. № 1. С. 1–5.
15. *Rasmussen M.K., Daujat-Chavanieu M., Gerbal-Chaloin S.* // Toxicol. Lett. 2017. V. 277. P. 1–8.

Induction of Transporter Protein Glycoprotein-P in the Blood-Brain Barrier as a Way to Prevent Parkinson's Syndrome

M. M. Gradinar^a, I. V. Chernykh^a, A. V. Shchulkin^a, A. S. Yesenina^a, and E. N. Yakusheva^a

^aRyazan State Medical University, Ministry of Health of the Russian Federation, Ryazan, Russia

In this study, we evaluated the prospect of induction of the transporter protein glycoprotein-P (Pgp) in the blood-brain barrier for the prevention of the development of the Parkinson's syndrome caused by the administration of neurotoxin rotenone. The study was performed with 48 male rats. The first group of animals was injected subcutaneously with sunflower oil (1 mL/kg) for 28 days; the second group was intragastrically administered with rifampicin (20 mg/kg) twice a day for 14 days to induce the functioning of Pgp; the third group was injected subcutaneously with rotenone (2.5 mg/kg) once a day for 28 days to simulate Parkinson's

syndrome; the group four 4 was administered with rifampicin (20 mg/kg) for 7 days, and, then, with rotenone (2.5 mg/kg) together with rifampicin for 28 days. We evaluated development of symptoms of parkinsonism; enzyme-linked immunosorbent assay was used to determine the content of dopamine in the midbrain and striatum and the amount of Pgp in the midbrain. It was found that the administration of rotenone led to the development of signs of parkinsonism and a decrease in the concentration of dopamine in the striatum and midbrain, while the amount of Pgp in the midbrain did not change significantly compared to the control animals. After rifampicin administration, an increase in the amount of Pgp in the midbrain was noted, with no signs of parkinsonism, and the dopamine concentration in the striatum and midbrain did not change compared to the control. The combined administration of rifampicin and rotenone led to a decrease in the signs of parkinsonism, an increase in the level of dopamine in the striatum and midbrain, and an increase in the amount of Pgp in the midbrain compared to rats treated with rotenone only. Experimental results indicate that rifampicin can slow parkinsonism progression caused by the administration of rotenone, which is, probably, due to a decrease in the penetration of neurotoxin into the brain. Thus, induction of the functioning of the Pgp transporter protein may be considered as a way to prevent the development of Parkinson's syndrome of neurotoxic origin, however, further studies using other neurotoxins and Pgp inducers are required.

Keywords: glycoprotein-P, parkinsonism syndrome, rotenone, neurotoxins, rifampicin, blood-brain barrier