



Оригинальная статья

Продепрессивный эффект леводопы в модели 6-ОНДА-индуцированного гемипаркинсонизма у крыс

Каримова О.С.¹ • Морозова А.Ю.¹ • Зоркина Я.А.¹ • Зубков Е.А.¹ • Ушакова В.М.^{1,2} •
Абрамова О.В.¹ • Чехонин В.П.^{1,3}

Каримова Ольга Сергеевна – лаборант-исследователь лаборатории иммунохимии отдела фундаментальной и прикладной нейробиологии¹; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6377-3356>
✉ 119034, г. Москва, Кропоткинский переулок, 23/1, Российская Федерация. Тел.: +7 (985) 988 13 73.
E-mail: karimovaos@yandex.ru

Морозова Анна Юрьевна – канд. мед. наук, ст. науч. сотр. лаборатории нейрохимии отдела фундаментальной и прикладной нейробиологии¹; ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-8681-5299>.
E-mail: hakurate77@gmail.com

Зоркина Яна Александровна – канд. биол. наук, науч. сотр. лаборатории иммунохимии отдела фундаментальной и прикладной нейробиологии¹; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0247-2717>.
E-mail: zorkina.ya@serbsky.ru

Зубков Евгений Андреевич – канд. биол. наук, ст. науч. сотр. лаборатории нейрохимии отдела фундаментальной и прикладной нейробиологии¹; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6133-3421>.
E-mail: zubkov@ngs.ru

Ушакова Валерия Михайловна – канд. биол. наук, мл. науч. сотр. лаборатории иммунохимии отдела фундаментальной и прикладной нейробиологии¹; учебный мастер 1-й категории кафедры высшей нервной деятельности биологического факультета²; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3480-910X>.
E-mail: ushakovavm@yandex.ru

Абрамова Ольга Вячеславовна – мл. науч. сотр. лаборатории нейрохимии отдела фундаментальной и прикладной нейробиологии¹; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8793-1833>.
E-mail: abramova1128@gmail.com

Чехонин Владимир Павлович – д-р мед. наук, профессор, академик РАН, руководитель отдела фундаментальной и прикладной нейробиологии¹; заведующий кафедрой медицинских нанобиотехнологий медико-биологического факультета³; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4386-7897>. E-mail: checkhoninnew@yandex.ru

Актуальность. Лечение болезни Паркинсона до сих пор является симптоматическим. В литературе встречаются противоречивые данные об эффективности и побочных эффектах леводопы. Одни авторы говорят об антидепрессивном действии препарата, другие полагают, что именно леводопа приводит со временем к появлению симптомов депрессии. **Цель** – воспроизведение модели ОНДА-гемипаркинсонизма у крыс с последующим исследованием как внешних, так и структурных проявлений патологии, а также изучение эффективности леводопы в направлении нивелирования моторных и немоторных проявлений симптомов паркинсонизма. **Материал и методы.** Исследование проведено на 52 самцах крыс линии Wistar. Моделирование патологии осуществлено путем стереотаксического введения нейротоксина 6-ОНДА в компактную часть черной субстанции. Через 2 месяца после стереотаксического введения животные были подвергнуты тестам на моторные («Ротарод», «Цилиндр», «Кетамин-индуцированное вращение в ротаметре») и немоторные нарушения («Открытое поле», «Социальный интерес», «Условная реакция пассивного избегания», «Ангедония»). **Результаты.** У 18% животных отсутствовали

какие-либо симптомы гемипаркинсонизма, у 32% отмечены только моторные симптомы, у 50% животных обнаружены как моторные, так и немоторные симптомы. Леводопа частично нивелировала моторные нарушения, но при этом усилила депрессивно-подобное поведение. **Заключение.** Леводопа показала свою частичную эффективность в нивелировании моторных нарушений, вызванных введением нейротоксина 6-ОНДА, однако оказала побочные эффекты, выражающиеся в усилении депрессивно-подобного поведения и тревоги.

Ключевые слова: нейродегенеративные заболевания, болезнь Паркинсона, 6-ОНДА, леводопа

Для цитирования: Каримова ОС, Морозова АЮ, Зоркина ЯА, Зубков ЕА, Ушакова ВМ, Абрамова ОВ, Чехонин ВП. Продепрессивный эффект леводопы в модели 6-ОНДА-индуцированного гемипаркинсонизма у крыс. Альманах клинической медицины. 2020;48(1):22–33. doi: 10.18786/2072-0505-2020-48-005.

Поступила 23.09.2019; доработана 29.01.2020; принята к публикации 31.01.2020; опубликована онлайн 17.02.2020

¹ ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр психиатрии и наркологии имени В.П. Сербского» Минздрава России; 119034, г. Москва, Кропоткинский переулок, 23, Российская Федерация

² ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»; 119991, г. Москва, Ленинские горы, 1, Российская Федерация

³ ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Минздрава России; 117997, г. Москва, ул. Островитянова, 1, Российская Федерация



Блезнь Паркинсона – хроническое прогрессирующее нейродегенеративное заболевание, поражающее людей пожилого возраста. Ежегодно в мире регистрируют 180–200 новых случаев на 100 тыс. населения [1]. Если для возрастной категории 50–59 лет этот показатель составляет от 100 человек на 100 тыс. населения, то для 70–79 лет – 1087 на 100 тыс. Мужчин болезнь Паркинсона поражает в 1,5 раза чаще, чем женщин [2]. По прогнозу Всемирной организации здравоохранения, к 2030 г. число больных может достичь 9 млн [3]. Этиология болезни Паркинсона остается дискуссионной, лечение направлено на устранение или уменьшение проявлений моторных симптомов. В основе патогенеза лежит гибель дофаминергических нейронов в черной субстанции и отложение белка α -синуклеина с формированием интранейрональных телец Леви. Возникновению и развитию заболевания способствуют факторы внешней среды (пестициды, тяжелые металлы), старение и генетические мутации [4].

Длительное время исследования болезни Паркинсона акцентировались только на моторных симптомах. Однако в последнее время заболевание описывается широким спектром как моторных (тремор покоя, постуральная неустойчивость, брадикинезия), так и немоторных проявлений (нарушения сна, депрессия, когнитивные нарушения) [5, 6]. Немоторные симптомы могут давать о себе знать за несколько лет до дебюта первых моторных нарушений. Особое внимание уделяют депрессии, одному из главных симптомов продромальной стадии болезни Паркинсона. К признакам депрессии при болезни Паркинсона относят раздражительность, недостаток энергии, нерешительность, печаль, ангедонию и другие, при этом данные симптомы часто недооцениваются самими больными [7, 8].

Остается актуальным вопрос о своевременной лабораторной диагностике заболевания. Перспективным представляется поиск биомаркеров для ранней диагностики продромальной стадии болезни Паркинсона. К таковым относят нейротрофические факторы [9, 10], в том числе нейротрофический фактор мозга – BDNF (англ. brain-derived neurotrophic factor). Он считается ключевым фактором нейропротекции и восстановления функции мозга при различных патологических состояниях [11]. В многочисленных исследованиях установлена взаимосвязь между содержанием BDNF в сыворотке крови и депрессией [12–14].

Существующая симптоматическая фармакотерапия часто сопряжена с побочными эффектами. Препарат леводопы – золотой стандарт лечения болезни Паркинсона – впервые успешно применен в 1960-х гг., однако при длительной терапии отмечается снижение ее эффективности и развитие инвалидизирующих моторных осложнений [15, 16]. В последнее время стали обсуждаться такие побочные действия леводопы, как депрессия, синдром отмены, синдром «включения – выключения» и синдром беспокойных ног [17, 18]. При этом в ряде исследований, в том числе на лабораторных животных, было показано обратное [19].

Целью нашего исследования стала экспериментальная проверка противоречивых данных о побочных действиях леводопы на немоторную симптоматику в модели гемипаркинсонизма у крыс.

Материал и методы

Работа по экспериментальному моделированию выполнена на базе ФГБУ «НМИЦ ПН им. В.П. Сербского» на 52 самцах крыс (*Rattus norvegicus*) линии Wistar массой 184–245 г. Животных содержали в условиях лабораторного вивария в клетках по 8 особей в каждой при режиме день/ночь, равном 12 часам, на стандартной диете со свободным доступом к пище и воде (*ad libitum*). Температура в помещении составляла 22 °С. Все манипуляции с животными проводились в соответствии с правилами лабораторной практики в Российской Федерации (Федеральный закон от 12.04.2010 № 61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств», Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации № 267 от 19.06.2003), а также правилами, принятыми Европейской конвенцией о защите позвоночных животных, используемых в экспериментальных и иных научных целях (Directive 2010/63/EU от 22.09.2010).

Из 52 самцов крыс линии Wistar 10 вводился растворитель – 0,05% раствор аскорбиновой кислоты (ложнооперированные – группа Л/о), 42 – нейротоксин 6-ОНДА (6-ОНДА-индуцированный гемипаркинсонизм – группа 6-ОНДА).

Стереотаксическое введение нейротоксина
Для операции по стереотаксическому введению нейротоксина 6-ОНДА предварительно подготавливали навеску: 100 мкг нейротоксина в 25 мкл растворителя. 5% раствор аскорбиновой кислоты разводили в 100-кратном объеме воды для инъекций с целью получения 0,05% раствора. Непосредственно перед операцией по стереотаксическому введению крысы были наркотизированы



внутрибрюшинно смесью растворов кетамина (50 мг/кг) и диазепама (125 мг/кг) в соотношении 1:1. Введение нейротоксина и растворителя осуществлялось унилатерально по координатам из атласа мозга крыс [20]: AP: -5; L: -1,8; V: -8,0 с помощью шприца Гамильтона объемом 10 мкл, установленного на автоматическом инжекторе Razel (США), со скоростью введения 0,6 мкл/мин в количественном соотношении 12 мкг 6-ОНДА в 3 мкл растворителя. В течение 2–3 минут после введения нейротоксина иглу не вынимали для предотвращения попадания токсина в другие структуры мозга.

Магнитно-резонансная томография (МРТ) головного мозга крыс

МРТ головного мозга крыс проводили на томографе Bruker BioSpin ClinScan 7T в режиме T2 и T2 с внутривенным введением контрастного вещества – гадопентетовой кислоты (препарат Магневист).

Терапия препаратом леводопы

Через 2 месяца после стереотаксического введения нейротоксина 6-ОНДА 16 животным была проведена терапия препаратом леводопы и бенсеразида – Мадопар («Ф. Хоффманн-Ля Рош Лтд.», Швейцария). Препарат вводился перорально через желудочный зонд в количестве 50 мг/кг ежедневно в течение 14 суток.

Тесты на моторные симптомы

Моторная дисфункция исследована с помощью следующих тестов: «Ротарод», «Регистрация спонтанной активности передних конечностей» («Цилиндр»), «Кетамин-индуцированное вращение в ротаметре».

Тест «Ротарод» предназначен для оценки силы и выносливости животного, проводится в установке Ротарод (Neurobotics, Россия). Перед тестом каждое животное было обучено удержанию на вращающемся стержне (скорость: 7 об./мин) в течение 1 минуты. Через 30 минут после обучения проводился тест, где измерялась длительность удержания (скорость: 21 об./мин).

В тесте «Регистрация спонтанной активности передних конечностей» («Цилиндр») подсчитывали количество первых касаний стенок прозрачного цилиндра в каждой стойке животного в течение 5 минут. Результаты были представлены в виде процентного соотношения между количеством касаний правой лапки и суммой касаний левой и правой лапки.

В тесте «Кетамин-индуцированное вращение в ротаметре» измеряли количество вращений

по часовой стрелке и против часовой стрелки в установке Ротаметр с прозрачной полусферой (TSE Systems, США) за 1 минуту в течение 7 минут. Результаты представлены в виде процентного соотношения между разностью вращений влево и вправо и общей суммой вращений.

Тесты на немоторные симптомы

В качестве тестов на немоторную функцию были выбраны: тест «Предпочтение раствора сахарозы» («Ангедония»), «Социальный интерес», «Открытое поле», «Условная реакция пассивного избегания».

Для оценки депрессивно-подобных черт поведения проведен тест предпочтения раствора сахарозы («Ангедония»), где измеряли количество выпитой животными воды и раствора сахарозы. Перед проведением теста животные были рассажены в индивидуальные клетки. В них были помещены две предварительно взвешенные поилки объемом 50 мл каждая с водой и 1% раствором сахарозы. Через 24 часа поилки изымались и взвешивались повторно. Процент предпочтения раствора сахарозы рассчитывали по формуле: $V_{\text{сахар.}} / (V_{\text{сахар.}} + V_{\text{вода}}) \times 100\%$.

С помощью теста «Социальный интерес» изучали депрессивно-подобные черты поведения и социальные функции. В тесте измеряли длительность социальных контактов предварительно изолированного в индивидуальную клетку животного с ювенильным самцом на протяжении 10 минут. Результаты представлены в виде суммарной длительности социальных контактов.

Тест «Открытое поле» предназначен для определения двигательной, ориентировочно-исследовательской активности и тревоги. Измеряли суммарное количество пересеченных квадратов (горизонтальная активность) и стоек животного (вертикальная активность), суммарную длительность замираний и груминга в течение 5 минут.

Оценить долговременную рабочую память позволил тест «Условная реакция пассивного избегания», во время которого определяли длительность нахождения животного в светлом отсеке установки. Перед тестом проводили обучение: животное, помещенное в светлый отсек, при переходе в темный отсек (норковый рефлекс) получало разряд тока (1,5 мА) через электродный пол. Через 48 часов животное повторно помещали в светлый отсек, измеряли время нахождения в нем.

Иммуногистохимический анализ продукции белка тирозингидроксилазы

Для оценки повреждения *substantia nigra* был проведен иммуногистохимический анализ



продукции белка тирозингидроксилазы, ключевого фермента синтеза катехоламинов, в частности дофамина. После поведенческих тестов для иммуногистохимического анализа были отобраны 5 животных из группы 6-ОНДА и 5 контрольных животных, для чего была выполнена наркотизация крыс парами диэтилового эфира с последующей прижизненной фиксацией органов 4% формальдегидом и декапитацией с извлечением головного мозга с целью дальнейшей постфиксации в 4% растворе параформальдегида при +4 °С. Срезы головного мозга толщиной 30 мкм были сделаны с помощью криотома MICROM HM 560 (Thermo Fisher Scientific Microm International GmbH, Германия) и обработаны первичными антителами RabTyтH (1:1000, Invitrogen, США) и антивидовыми антителами козы к иммуноглобулинам кролика, мечеными Alexa 488 (1:500, Invitrogen, США). Ядра клеток докрашивали DAPI (Invitrogen), затем монтировали срезы на предметные стекла и проводили лазерную сканирующую конфокальную микроскопию (Nicon, Япония).

Количественная полимеразная цепная реакция (ПЦР) – анализ экспрессии гена *BDNF*

Для количественного ПЦР-анализа экспрессии гена *BDNF* были взяты 5 животных из группы 6-ОНДА и 5 контрольных животных. Для пробоподготовки проводили декапитацию и выделение стригатума согласно атласу мозга крыс [19].

Тотальную РНК из тканей мозга выделяли при помощи TRIzol Reagent (Invitrogen, США) по протоколу фирмы-производителя. Концентрацию РНК в аликвотах по 5 мкл измеряли с помощью прибора Nanovue Plus (Biochrom, Великобритания). ДНКазную обработку осуществляли буфером, содержащим MgCl₂ (Thermo Scientific, США), прогревали при температуре 37 °С в течение 30 минут, затем добавляли 1 мкл ЭДТА и прогревали 10 минут при +65 °С.

Реакцию обратной транскрипции осуществляли для синтеза первой цепи кДНК на матрице РНК по протоколу фирмы-производителя (MMLV kit, «Евроген», Россия). ПЦР в реальном времени проводили на амплификаторе Step One Plus (Applied Biosystems, США) с использованием готовой смеси для ПЦР qPCRmix-HS SYBR+HighROX («Евроген», Россия).

Референсным геном при анализе экспрессии *BDNF* в тканях мозга крысы был выбран β-актин. Последовательность праймеров («Евроген», Россия), подобранных при помощи программы Primer Blast (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>), приведена в табл. 1.

Таблица 1. Нуклеотидные последовательности праймеров для постановки полимеразной цепной реакции в реальном времени

Праймер	Нуклеотидная последовательность
β-актин прямой	AACCCCTAAGGCCAACCGTGAAAAG
β-актин обратный	CGACCAGAGGCATACAGGGACAAC
BDNF прямой	TCATACTTCGGTTGCATGAAGG
BDNF обратный	AGACCTCTCGAACCTGCC

При проведении ПЦР в реальном времени использовали следующий протокол: предварительная денатурация при температуре 95 °С 5 минут, далее 40 циклов амплификации: денатурация при температуре 95 °С 20 секунд, отжиг праймеров при температуре 55 °С 30 секунд, элонгация при температуре 72 °С 30 секунд. Относительный уровень экспрессии генов рассчитывали по следующей формуле: $2^{-\Delta\Delta Ct} \pm SD$ [21].

Статистическая обработка данных

Статистическую обработку данных проводили с использованием программы STATISTICA 7.0. В каждом тесте значения были проанализированы на определение нормальности распределения при помощи критерия Шапиро – Уилка. Данные в тестах «Регистрация спонтанной активности передних конечностей» («Цилиндр»), «Предпочтение раствора сахарозы» («Ангедония»), «Кетамин-индуцированное вращение в ротаметре», стойки и квадраты в тесте «Открытое поле», «Социальный интерес», иммуногистохимический анализ продукции белка тирозингидроксилазы имели нормальное распределение (данные представлены как среднее ± стандартное отклонение ($M \pm SD$)). У данных групп был проведен дисперсионный анализ ANOVA с последующим post hoc анализом при помощи критерия Фишера. Критерий Краскела – Уоллиса был применен для непараметрического сравнения исследуемых групп (длительности замираний и груминга в тесте «Открытое поле»). Критерий Манна – Уитни применили в тестах, где распределение было ненормальным («Ротарод», длительность замираний и груминга в тесте «Открытое поле», количественный ПЦР-анализ экспрессии гена *BDNF*); данные представлены как медиана [нижний квартиль; верхний квартиль] ($Me [LQ; UQ]$). Для анализа повторных изменений был применен непараметрический критерий знаков. Данные теста «Условная реакция пассивного избегания» обсчитывали при помощи критерия

Хи-квадрат (χ^2). Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты

Схема проведенных экспериментов приведена на рис. 1.

Через 1 месяц после операции крысам была выполнена МРТ с контрастированием. На снимках видно накопление контраста в области черной субстанции головного мозга, что свидетельствует о наличии повреждения ткани в данной области (рис. 2).

Далее делали тесты на моторные нарушения. В тесте «Ротарод» обнаружено снижение времени удержания на вращающемся стержне у крыс в группе 6-OHDA по сравнению с группой Л/о ($p < 0,001$). Животные из группы приема леводопы показали статистически значимое повышение времени удержания на вращающемся стержне по сравнению с животными из группы 6-OHDA ($z = 2,06$, $p = 0,038$), однако время удержания было меньше, чем у ложнопериорированных животных ($p < 0,001$).

По результатам теста «Регистрация спонтанной активности передних конечностей» («Цилиндр») отмечена асимметричная активность передних конечностей в группе 6-OHDA, но не в группе Л/о ($F = 5,65$, $p = 0,037$). У животных после терапии леводопой не наблюдали ухудшений моторной симптоматики ($p = 0,72$).

Тест «Кетамин-индуцированное вращение в ротаметре» показал значительное увеличение количества вращений в установке ротаметр у крыс с введенным нейротоксином по сравнению с ложнопериорированными ($F = 24,28$, $p < 0,001$). Животные группы 6-OHDA вращались активнее



Рис. 1. Схема эксперимента; МРТ – магнитно-резонансная томография, ПЦР – полимеразная цепная реакция

в сторону введения токсина (вправо), чем животные из группы Л/о, которые практически не совершали вращений (табл. 2).

Тест «Открытое поле» проводился спустя 1 и 2 месяца после операции. Обнаружены отличия в исследуемых группах по параметру горизонтальной (двигательной) активности – количеству пересеченных квадратов ($F = 26,7$, $p < 0,001$) и вертикальной (исследовательской) активности – количеству вертикальных стоек ($F = 23$, $p < 0,001$). В тесте «Открытое поле» крысы из группы 6-OHDA через 1 и 2 месяца после операции показали

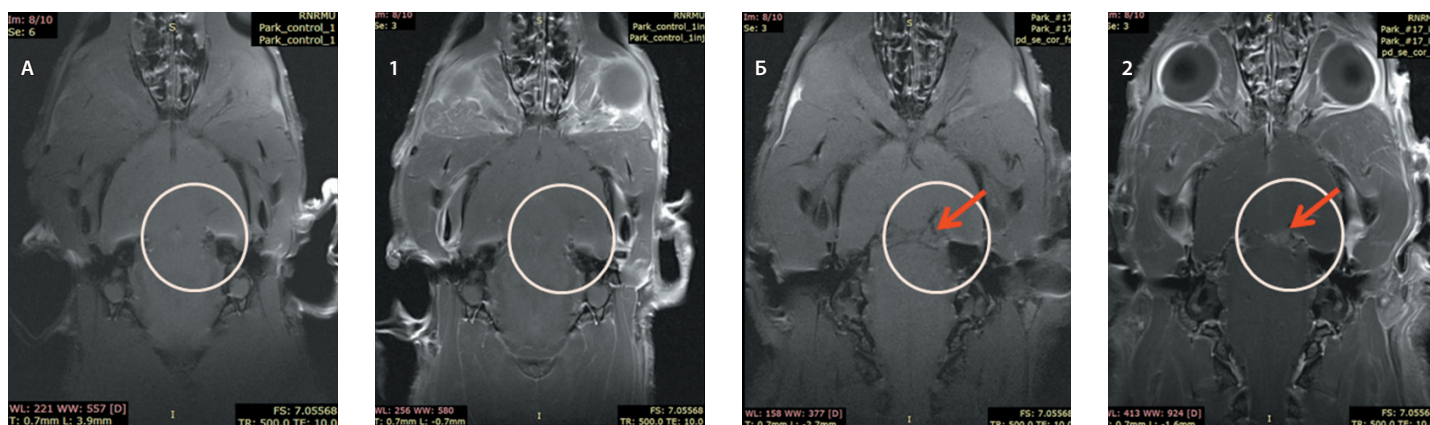


Рис. 2. Снимки магнитно-резонансной томографии головного мозга крыс. А – снимок мозга ложнопериорированной крысы, Б – снимок мозга крысы с введенным нейротоксином 6-OHDA (выделены области введения растворителя и нейротоксина), режим T2; 1 – компактная часть *s. nigra* ложнопериорированной крысы, 2 – компактная часть *s. nigra* с введенным нейротоксином 6-OHDA, режим T2 с внутривенным введением контрастного вещества – гадопентетовой кислоты (препарат Магневист)

**Таблица 2.** Тесты на моторные нарушения, M ± SD

Моторный тест	Группа		
	Ложнооперированные	6-ОНДА	6-ОНДА + леводопа
Ротарод, с	37 ± 3,7	21 ± 1,5*	32 ± 1,7**
Цилиндр, %	52,7 ± 2,95	35,7 ± 2,45 [†]	50,4 ± 3,17
Ротометр (индекс)	-1,2 ± 3,1 [†]	32,3 ± 14,4	11,25 ± 10,44 ^{††}

В тесте «Ротарод» показано время удержания на вращающемся стержне: *p < 0,01 по сравнению с ложнооперированными; **p < 0,05 по сравнению с 6-ОНДА

В тесте «Цилиндр» показан процент использования правой лапы: [†]p < 0,05 по сравнению с 6-ОНДА и ложнооперированными

В тесте «Ротометр» – процентное соотношение между разностью вращений влево и вправо и общей суммой вращений: [†]p < 0,01 по сравнению с группой 6-ОНДА; ^{††}p < 0,01 по сравнению с экспериментальными группами

значительное снижение горизонтальной (двигательной) и вертикальной (исследовательской) активности по сравнению с крысами из группы Л/о. Терапия леводопой не оказала ожидаемого эффекта ни на горизонтальную (двигательную), ни на вертикальную (исследовательскую) активность в данном тесте. В тесте «Открытое поле» были также исследованы длительности замираний и груминга (умываний). Отмечены различия в исследуемых группах при непараметрическом сравнении при помощи критерия Краскела – Уоллиса (замирания: N = 20,17, p = 0,0002; груминг: N = 12,98, p = 0,005). При дальнейшем post hoc анализе получены следующие различия: в группе крыс 6-ОНДА через 1 и 2 месяца после операции зарегистрировано повышение длительности замираний по сравнению с группой Л/о (табл. 3).

Далее были проведены тесты на депрессивно-подобное поведение крыс: тест на ангедонию и социальный интерес.

Таблица 3. Тест «Открытое поле»

Параметр	Группа			
	Ложнооперированные	6-ОНДА		
		1 месяц	2 месяца	
Стойки, абс. (Me [LQ; UQ])	24 [18,5; 28] [†]	10 [4,5; 13,75]	3 [2,75; 6,25]	4,2 [0; 6]
Пересеченные квадраты, абс. (M ± SD)	64,63 ± 20,92 ^{**}	26,4 ± 14,3	13,25 ± 11,23	14,8 ± 10,33
Замирания, с (Me [LQ; UQ])	2,15 [0; 8,4] ^{**}	30,56 [16,5; 62,7]	70,57 [39,6; 80]	36,61 [22,5; 63,8]
Груминг, с (Me [LQ; UQ])	23,25 [8,5; 35,1] [†]	58,45 [36,3; 84]	17,51 [8; 22,9]	72,195 [45,5; 93,2]

[†]p < 0,01 по сравнению с группами 6-ОНДА через 1 месяц после операции, 6-ОНДА через 2 месяца после операции и 6-ОНДА + леводопа

^{**}p < 0,05 по сравнению с группами 6-ОНДА через 1 месяц после операции, 6-ОНДА через 2 месяца после операции и 6-ОНДА + леводопа

[†]p < 0,05 по сравнению с группами 6-ОНДА через 1 месяц после операции и 6-ОНДА + леводопа

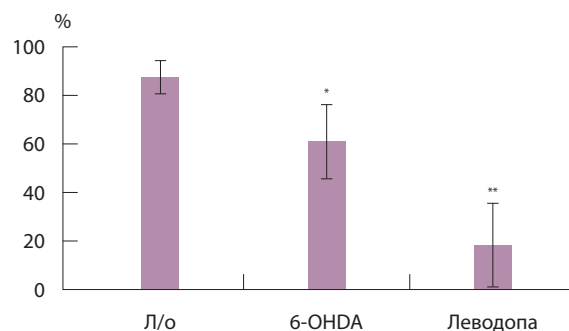


Рис. 3. Тест на ангедонию. Процент предпочтения раствора сахарозы рассчитывался по формуле: $V_{\text{сахар}} / (V_{\text{сахар}} + V_{\text{вода}}) \times 100\%$; *p < 0,05 по сравнению с группой ложнооперированных животных (Л/о), **p < 0,001 по сравнению с группой Л/о. Данные представлены как среднее ± стандартное отклонение (M ± SD)

В тесте «Предпочтение раствора сахарозы» («Ангедония») у животных из группы 6-ОНДА отмечено снижение предпочтения раствора сахарозы по сравнению с группой Л/о. Терапия леводопой значительно ослабила предпочтение раствора сахарозы, что может говорить об усилении ангедонии (F = 9,32, p < 0,001) (рис. 3).

Результаты теста «Социальный интерес», проведенного через 2 месяца после введения нейротоксина, выявили различия между тремя экспериментальными группами (F = 17,14, p < 0,001). У группы крыс 6-ОНДА без лечения была снижена длительность социальных контактов по сравнению с Л/о (p = 0,001). У животных, получавших терапию леводопой, также отмечена сниженная социальная активность, как у группы 6-ОНДА (p < 0,001 по сравнению с контролем, p = 0,86 по сравнению с группой 6-ОНДА без лечения).

В тесте на долговременную рабочую память – условная реакция пассивного избегания – оценивали

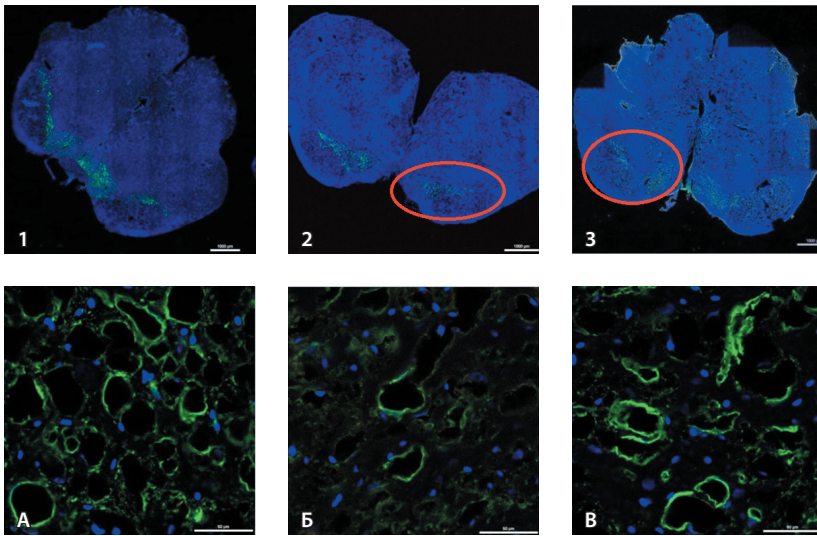


Рис. 4. Иммуногистохимический анализ срезов головного мозга крыс в области компактной части *substantia nigra*; зеленая флуоресценция – Rab Тирозингидроксилаза + Anti-rabbit Alexa 488, синяя флуоресценция – DAPI. **1 и А** – срез интактного мозга, **2 и 3** – срезы мозга с введенным нейротоксином 6-OHDA (выделены области введения нейротоксина), 1000 мкм; **Б** – компактная часть *s. nigra* с введенным нейротоксином 6-OHDA, **В** – контралатеральная компактная часть *s. nigra*, 50 мкм

время, за которое крысы зайдут в темный отсек. Ложнооперированные животные в темный отсек не заходили, крысы группы 6-OHDA, а также животные после терапии леводопой забывали о стрессирующем факторе и заходили в темный отсек. Процент зашедших в темный отсек не различался ($\chi^2 = 0,16$, $p = 0,69$). Терапия леводопой не оказала влияния на данный показатель ($\chi^2 = 0,48$, $p = 0,49$). Различия наблюдались между контрольной группой и опытными: группой 6-OHDA ($\chi^2 = 4,11$, $p = 0,043$) и группой приема леводопы ($\chi^2 = 4,17$, $p = 0,041$) (табл. 4).

Программный анализ интенсивности флуоресценции по результатам иммуногистохимического анализа показал, что в пораженной половине мозга в компактной части *s. nigra* крыс из группы 6-OHDA снижена продукция тирозингидроксилазы по сравнению с мозгом ложнооперированных крыс, а также по сравнению с интактной

половиной мозга оперированных животных ($F = 20,36$, $p < 0,001$) (рис. 4, 5).

По данным количественного ПЦР-анализа экспрессии гена *BDNF* выявлено значительное снижение экспрессии гена *BDNF* в стриатуме ($p = 0,004$) головного мозга крыс группы 6-OHDA по сравнению с группой Л/о (рис. 6), что может быть показателем депрессивно-подобного и тревожного поведения у животных экспериментальной модели.

Обсуждение

Этиология болезни Паркинсона к настоящему моменту не до конца исследована, чем обусловлено отсутствие эффективной терапии [1]. Основным способом лечения болезни Паркинсона остается применение леводопы и леводопосодержащих препаратов, которые, несмотря на наличие положительного эффекта в редукции моторных нарушений, обладают рядом побочных эффектов, а в некоторых случаях и усугубляют уже существующие моторные нарушения [15–17].

В нашей работе мы исследовали действие леводопы в модели гемипаркинсонизма с унилатеральным введением нейротоксина 6-OHDA. Данный подход признан эффективным способом воспроизведения симптоматики болезни Паркинсона на лабораторных животных, так как при нем затрагиваются те же морфофункциональные блоки нервной системы, что повреждаются у человека [22, 23]. Унилатеральное введение токсина в область черной субстанции приводит к гибели дофаминергических нейронов и повреждению нигростриарного дофаминергического пути, патология которого ассоциирована с моторными нарушениями при болезни Паркинсона [24]. В нашей работе на Т2-взвешенных изображениях при МРТ визуализировалось накопление контраста в области черной субстанции, что свидетельствует о наличии повреждений данной области мозга. Наше исследование показало: у 18% животных отсутствовали какие-либо симптомы, у 32% регистрировались только моторные симптомы, у 50% животных обнаружены как моторные, так и немоторные симптомы.

Таблица 4. Тесты на немоторные нарушения, $M \pm SD$

Немоторный тест	Группа		
	ложнооперированные	6-OHDA	6-OHDA + леводопа
Социальный интерес, с	220,96 ± 85,54*	81,46 ± 43,94	74,40 ± 33,29
УРПИ, %	0**	75	80

В тесте «Социальный интерес» показано время социальных контактов с ювенильным самцом; * $p < 0,01$ по сравнению с экспериментальными группами

В тесте «Условная реакция пассивного избегания» (УРПИ) показан процент зашедших в темный отсек; ** $p < 0,05$ по сравнению с экспериментальными группами

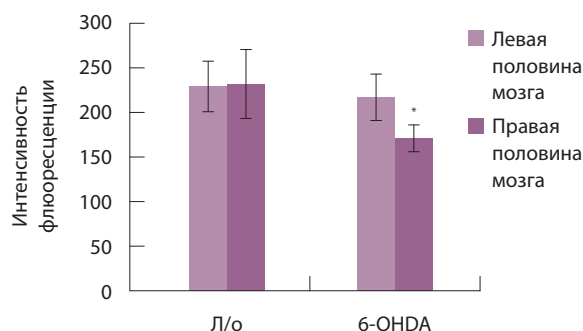


Рис. 5. Анализ интенсивности флуоресценции Alexa 488 в составе комплекса Pab Тирозингидроксилаза + Anti-rabbit Alexa 488 при иммуногистохимическом анализе; * $p < 0,001$ по сравнению с ложноперирированными животными (Л/о). Данные представлены как среднее \pm стандартное отклонение ($M \pm SD$)

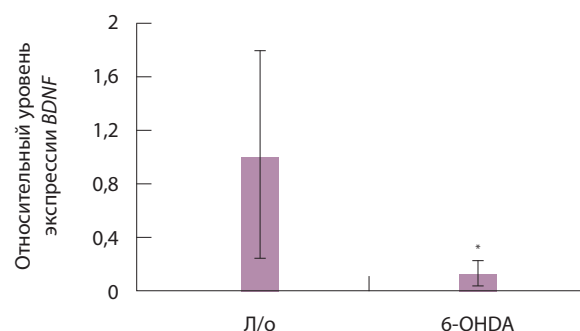


Рис. 6. Относительный уровень экспрессии гена *BDNF* в стриатуме; * $p = 0,004$ по сравнению с ложноперирированными животными (Л/о). Расчет данных был проведен по формуле: $2^{-\Delta\Delta Ct} \pm SD$ [21]

Так, в нашей воспроизведенной модели 6-OHDA-индуцированного гемипаркинсонизма наблюдалось снижение двигательной активности в тесте «Открытое поле», ухудшение показателей силы и выносливости по сравнению с контрольными животными в тесте «Ротарод». В клинической практике у пациентов, страдающих болезнью Паркинсона, проявляются такие симптомы, как ригидность, высокая утомляемость, тремор покоя [22]. Учитывая это, полученные нами результаты могут указывать на сходные симптоматические нарушения. Поскольку нейротоксин в модели был введен унилатерально, у животных было обнаружено угнетение мышечных функций одной стороны тела в тесте «Цилиндр», где животным экспериментальной группы касались стенок цилиндра преимущественно передней конечностью, соответствующей стороне повреждения, и в тесте «Ротометр», где большая часть грызунов с моделированным расстройством вращалась в сторону введения нейротоксина. Эти данные согласуются с результатами исследований по унилатеральному введению 6-OHDA крысам [25]. В целом по результатам проведенных тестов на моторную дисфункцию было установлено, что первые моторные симптомы проявляются через 1 месяц, окончательно сформировавшись через 2 месяца. Эти нарушения моторных функций подтверждаются практикой моделирования паркинсонизма на лабораторных животных [23, 26]. Терапия препаратом леводопы показала уменьшение проявления моторных нарушений в тестах «Ротарод» и «Регистрация спонтанной активности передних конечностей» («Цилиндр»).

В модели гемипаркинсонизма помимо моторных симптомов наблюдались и немоторные:

у животных, подвергавшихся введению 6-OHDA, были выявлены признаки депрессивно-подобного поведения, в частности снижение предпочтения сахарозы, свидетельствующее о развитии ангедонии, и уменьшение социальной активности в тесте «Социальный интерес». Эти данные согласуются с результатами клинических исследований, указывающих на ассоциацию болезни Паркинсона с депрессивными расстройствами [27]. Более того, появление депрессии считается продромальной стадией развития нейродегенеративного заболевания [8]. Данные доклинических исследований также указывают на наличие поведенческих нарушений, отражающих формирование депрессивно-подобного и тревожного состояния у крыс при моделировании паркинсонизма [28].

Среди немоторных проявлений было отмечено увеличение длительности груминга по сравнению с группой ложноперирированных крыс. Через 2 месяца данный показатель не отличался от контроля. В группе крыс, получавших терапию леводопой, не зарегистрировано уменьшение длительности замираний до уровня ложноперирированных животных, различия в показателях груминга также не достигли уровня статистической значимости.

Результаты тестов, направленных на оценку депрессивно-подобного поведения на фоне использованной терапии, показали, что леводопа имеет ряд побочных эффектов, усиливающих данные черты поведения. В частности, мы отметили: применение препарата значительно снижает предпочтение сахарозы экспериментальными животными, что указывает на усугубление состояния ангедонии, являющееся ключевым симптомом депрессии. Данные клинических исследований свидетельствуют о наличии побочных эффектов леводопы при длительном использовании,



выражающихся в усугублении симптомов депрессии и тревожности [29]. Кроме того, некоторые исследователи предполагают, что применение леводопы само по себе может стать причиной возникновения депрессии у пациентов. Данные о влиянии препарата на лабораторных животных противоречивы. В некоторых работах был выявлен протривожный эффект леводопы, выражающийся в снижении активности в тесте «Открытое поле» и уменьшении социальных взаимодействий [30]. Кроме того, было показано, что вещество само по себе индуцирует депрессивно-подобное поведение у крыс возрастом больше года [31]. С. Winter и соавт., наоборот, показали эффективность леводопы в устранении депрессивно-подобного поведения животных на фоне моделирования болезни Паркинсона [32]. В целом для понимания направленности и эффективности работы препарата необходимо провести более обширные исследования, нацеленные на тщательный анализ механизмов его действия.

В нашей работе наряду с оценкой поведения экспериментальных животных были исследованы биохимические и молекулярно-генетические изменения у крыс, подвергавшихся унилатеральному введению токсина. Так, иммуногистохимический анализ показал снижение продукции тирозингидроксилазы, ключевого фермента биосинтеза катехоламинов [24], что свидетельствует о дегенерации дофаминергических нейронов в области компактной части черной субстанции и подтверждает формирование морфологических нарушений. Результаты количественного ПЦР-анализа указывают на снижение экспрессии гена *BDNF* в области стриатума – структуре, входящей в нигростриарную систему, вовлеченную в патогенез болезни Паркинсона [24]. Данные литературы говорят о *BDNF* как о маркере депрессии при болезни Паркинсона: у людей с данным диагнозом

выявлено снижение уровня *BDNF* в сыворотке крови [10–12]. Таким образом, сниженный уровень *BDNF* в нашем исследовании может быть связан с наблюдаемым депрессивно-подобным поведением и ассоциирован с формированием нейродегенерации у лабораторных грызунов.

Заключение

В нашей работе успешно воспроизведена модель 6-ОНДА-гемипаркинсонизма у лабораторных крыс, подтверждающаяся наличием морфологических изменений в области черной субстанции и формированием моторной и немоторной симптоматики, согласующейся с клиническими и доклиническими данными. У экспериментальных животных были выявлены признаки депрессивно-подобного поведения, а также снижение экспрессии гена *BDNF*, что может указывать на ассоциацию *BDNF* с депрессивно-подобным поведением.

В нашем исследовании использование препарата леводопы – золотого стандарта лечения болезни Паркинсона – в качестве метода терапии заболевания показало свою частичную эффективность в нивелировании моторных нарушений, но оказало побочные эффекты, выражающиеся в усилении депрессивно-подобной симптоматики. Эти находки необходимо более детально изучить для определения возможных механизмов негативного действия препарата. Клинические исследования препаратов леводопы показывают свою эффективность в устранении моторных симптомов, однако побочные эффекты терапии усугубляют немоторные проявления, а в ряде случаев – и моторные симптомы. Наличие побочных эффектов леводопы свидетельствует о необходимости осторожного применения лекарства, в первую очередь больными, обладающими выраженной депрессивно-подобной симптоматикой. ☞

Дополнительная информация

Финансирование

Работа проведена без привлечения дополнительного финансирования со стороны третьих лиц.

Конфликт интересов

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

Участие авторов

О.С. Каримова – моделирование болезни Паркинсона со стереотаксическим введением нейротоксина 6-ОНДА, проведение тестов на моторную и немоторную симптоматику, сбор и обработка материалов, анализ полученных данных, написание текста; А.Ю. Морозова – концепция и дизайн исследования, дизайн экспериментальной части исследования,

проведение тестов на моторную и немоторную симптоматику, анализ клиничко-экспериментальных результатов исследования, редактирование рукописи, утверждение итогового варианта текста рукописи; Я.А. Зоркина – концепция и дизайн исследования, анализ и интерпретация результатов исследования, написание текста статьи, утверждение итогового варианта текста рукописи; Е.А. Зубков – концепция и дизайн исследования, анализ результатов, утверждение итогового варианта текста рукописи; В.М. Ушакова – анализ клиничко-экспериментальных результатов исследования, написание текста, редактирование рукописи; О.В. Абрамова – уход и наблюдение за лабораторными животными, проведение тестов на моторную и немоторную симптоматику; В.П. Чехонин – руководство проведением работ. Все авторы внесли существенный вклад в проведение исследования и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию перед публикацией.



Литература

- Tysnes OB, Storstein A. Epidemiology of Parkinson's disease. *J Neural Transm (Vienna)*. 2017;124(8):901–5. doi: 10.1007/s00702-017-1686-y.
- Pringsheim T, Jette N, Frolkis A, Steeves TD. The prevalence of Parkinson's disease: a systematic review and meta-analysis. *Mov Disord*. 2014;29(13):1583–90. doi: 10.1002/mds.25945.
- Wright Willis A, Evanoff BA, Lian M, Criswell SR, Racette BA. Geographic and ethnic variation in Parkinson disease: a population-based study of US Medicare beneficiaries. *Neuroepidemiology*. 2010;34(3):143–51. doi: 10.1159/000275491.
- Левин ОС, Артемьев ДВ, Бриль ЕВ, Кулуа ТК. Болезнь Паркинсона: современные подходы к диагностике и лечению. *Практическая медицина*. 2017;(1):45–51.
- Swick TJ, Ondo WG. Parkinson's Disease and Sleep/Wake Disturbances. In: Monti MJ, Pandi-Perumal SR, Chokroverty S, editors. *Dopamine and Sleep: Molecular, Functional, and Clinical Aspects*. Springer, Cham; 2016. p. 115–46. doi: 10.1007/978-3-319-46437-4_7.
- Пастухов ЮФ. Изменения характеристик парадоксального сна – ранний признак БП. *Журнал высшей нервной деятельности им. И.П. Павлова*. 2013;63(1):75–85. doi: 10.7868/S0044467713010103.
- Wen MC, Chan LL, Tan LC, Tan EK. Depression, anxiety, and apathy in Parkinson's disease: insights from neuroimaging studies. *Eur J Neurol*. 2016;23(6):1001–19. doi: 10.1111/ene.13002.
- Жукова ИА, Жукова НГ, Алифирова ВМ, Никитина МА, Ижболдина ОП, Бразовская НГ. Депрессия и другие немоторные проявления болезни Паркинсона. *Клиническая медицина*. 2017;95(5):419–24. doi: 10.18821/0023-2149-2017-95-5-419-424.
- Ершова МВ, Иванова ЕО, Иллариошкин СН. Болезнь Паркинсона и нейротрофический гомеостаз. *Нервные болезни*. 2018;(1):3–9. doi: 10.24411/2071-5315-2018-11991.
- Lu B, Nagappan G, Guan X, Nathan PJ, Wren P. BDNF-based synaptic repair as a disease-modifying strategy for neurodegenerative diseases. *Nat Rev Neurosci*. 2013;14(6):401–16. doi: 10.1038/nrn3505.
- Sun M, Kong L, Wang X, Lu XG, Gao Q, Geller AI. Comparison of the capability of GDNF, BDNF, or both, to protect nigrostriatal neurons in a rat model of Parkinson's disease. *Brain Res*. 2005;1052(2):119–29. doi: 10.1016/j.brainres.2005.05.072.
- Wang Y, Liu H, Du XD, Zhang Y, Yin G, Zhang BS, Soares JC, Zhang XY. Association of low serum BDNF with depression in patients with Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord*. 2017;41:73–8. doi: 10.1016/j.parkreldis.2017.05.012.
- Wang Y, Liu H, Zhang BS, Soares JC, Zhang XY. Low BDNF is associated with cognitive impairments in patients with Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord*. 2016;29:66–71. doi: 10.1016/j.parkreldis.2016.05.023.
- Jiang L, Zhang H, Wang C, Ming F, Shi X, Yang M. Serum level of brain-derived neurotrophic factor in Parkinson's disease: a meta-analysis. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2019;88:168–74. doi: 10.1016/j.pnpbpb.2018.07.010.
- Федорова НВ, Омарова СМ. Леводопамин-индуцированные дискинезии при болезни Паркинсона: фармакотерапия и нейрохирургическое лечение. *Нервные болезни*. 2017;(1): 22–30.
- Раимова ММ. Спектр проявлений и принципы коррекции поздних двигательных осложнений дофаминергической терапии при болезни Паркинсона и сосудистом паркинсонизме. *Медицинские новости*. 2016;(4): 80–2.
- Kim SD, Allen NE, Canning CG, Fung VSC. Parkinson disease. *Handb Clin Neurol*. 2018;159:173–93. doi: 10.1016/B978-0-444-63916-5.00011-2.
- Росинская АВ, Васенина ЕЕ, Хайбуллин ТН, Левин ОС. Темп прогрессирования болезни Паркинсона при раннем и отсроченном назначении препаратов леводопы. *Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова*. 2018;118(6 Вып. 2):77–81. doi: 10.17116/jnevro201811806277.
- Carvalho MM, Campos FL, Coimbra B, Pêgo JM, Rodrigues C, Lima R, Rodrigues AJ, Sousa N, Salgado AJ. Behavioral characterization of the 6-hydroxydopamine model of Parkinson's disease and pharmacological rescuing of non-motor deficits. *Mol Neurodegener*. 2013;8:14. doi: 10.1186/1750-1326-8-14.
- Paxinos G, Watson C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. 7th Edition. Academic Press; 2013. 388 p.
- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method. *Methods*. 2001;25(4):402–8. doi: 10.1006/meth.2001.1262.
- Molinoff PB, Axelrod J. Biochemistry of catecholamines. *Annu Rev Biochem*. 1971;40:465–500. doi: 10.1146/annurev.bi.40.070171.002341.
- Postuma RB, Berg D, Stern M, Poewe W, Olanow CW, Oertel W, Obeso J, Marek K, Litvan I, Lang AE, Halliday G, Goetz CG, Gasser T, Dubois B, Chan P, Bloem BR, Adler CH, Deuschl G. MDS clinical diagnostic criteria for Parkinson's disease. *Mov Disord*. 2015;30(12): 1591–601. doi: 10.1002/mds.26424.
- Deumens R, Blokland A, Prickaerts J. Modeling Parkinson's disease in rats: an evaluation of 6-OHDA lesions of the nigrostriatal pathway. *Exp Neurol*. 2002;175(2):303–17. doi: 10.1006/exnr.2002.7891.
- Ставровская АВ, Ямщикова НГ, Ольшанский АС, Гущина АС. Опыт моделирования болезни Паркинсона: анализ поведенческих нарушений. *Нервные болезни*. 2018;(2): 44–50. doi: 10.24411/2071-5315-2018-12022.
- Xu JT, Qian Y, Wang W, Chen XX, Li Y, Li Y, Yang ZY, Song XB, Lu D, Deng XL. Effect of stromal cell-derived factor-1/CXCR4 axis in neural stem cell transplantation for Parkinson's disease. *Neural Regen Res*. 2020;15(1):112–9. doi: 10.4103/1673-5374.264470.
- Branchi I, D'Andrea I, Armida M, Cassano T, Pèzzola A, Potenza RL, Morgese MG, Popoli P, Allea E. 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):2050–61. doi: 10.1002/jnr.21642.
- Tadaiesky MT, Dombrowski PA, Figueiredo CP, Cargnin-Ferreira E, Da Cunha C, Takahashi RN. Emotional, cognitive and neurochemical alterations in a premotor stage model of Parkinson's disease. *Neuroscience*. 2008;156(4):830–40. doi: 10.1016/j.neuroscience.2008.08.035.
- Hanganu A, Degroot C, Monchi O, Bedetti C, Mejia-Constain B, Lafontaine AL, Chouinard S, Bruneau MA. Influence of depressive symptoms on dopaminergic treatment of Parkinson's disease. *Front Neurol*. 2014;5:188. doi: 10.3389/fneur.2014.00188.
- Eskow Jaunarajs KL, Dupre KB, Ostrock CY, Button T, Deak T, Bishop C. Behavioral and neurochemical effects of chronic L-DOPA treatment on nonmotor sequelae in the hemiparkinsonian rat. *Behav Pharmacol*. 2010;21(7):627–37. doi: 10.1097/FBP.0b013e328333e7e80.
- Hernández VS, Luquín S, Jáuregui-Huerta F, Corona-Morales AA, Medina MP, Ruiz-Velasco S, Zhang L. Dopamine receptor dysregulation in hippocampus of aged rats underlies chronic pulsatile L-Dopa treatment induced cognitive and emotional alterations. *Neuropharmacology*. 2014;82:88–100. doi: 10.1016/j.neuropharm.2013.11.013.
- Winter C, von Rumohr A, Mundt A, Petrus D, Klein J, Lee T, Morgenstern R, Kupsch A, Juckel G. Lesions of dopaminergic neurons in the substantia nigra pars compacta and in the ventral tegmental area enhance depressive-like behavior in rats. *Behav Brain Res*. 2007;184(2):133–41. doi: 10.1016/j.bbr.2007.07.002.



References

1. Tysnes OB, Storstein A. Epidemiology of Parkinson's disease. *J Neural Transm (Vienna)*. 2017;124(8):901–5. doi: 10.1007/s00702-017-1686-y.
2. Pringsheim T, Jette N, Frolkis A, Steeves TD. The prevalence of Parkinson's disease: a systematic review and meta-analysis. *Mov Disord*. 2014;29(13):1583–90. doi: 10.1002/mds.25945.
3. Wright Willis A, Evanoff BA, Lian M, Criswell SR, Racette BA. Geographic and ethnic variation in Parkinson disease: a population-based study of US Medicare beneficiaries. *Neuroepidemiology*. 2010;34(3):143–51. doi: 10.1159/000275491.
4. Levin OS, Artemyev DV, Bril EV, Kulua TK. [Parkinson's disease: modern approaches to diagnosis and treatment]. *Practical Medicine*. 2017;(1):45–51. Russian.
5. Swick TJ, Ondo WG. Parkinson's Disease and Sleep/Wake Disturbances. In: Monti MJ, Pandi-Perumal SR, Chokroverty S, editors. *Dopamine and Sleep: Molecular, Functional, and Clinical Aspects*. Springer, Cham; 2016. p. 115–46. doi: 10.1007/978-3-319-46437-4_7.
6. Pastukhov IuF. [Changes in the characteristics of paradoxical sleep are an early feature of Parkinson's disease]. *Zh Vyssh Nerv Deiat Im I P Pavlova*. 2013;63(1):75–85. Russian. doi: 10.7868/s0044467713010103.
7. Wen MC, Chan LL, Tan LC, Tan EK. Depression, anxiety, and apathy in Parkinson's disease: insights from neuroimaging studies. *Eur J Neurol*. 2016 Jun;23(6):1001–19. doi: 10.1111/ene.13002.
8. Zhukova IA, Zhukova NG, Alifirova VM, Nikitina MA, Izhboldina OP, Brazovskaya NG. Depression and other nonmotor manifestations of Parkinson's disease. *Clinical Medicine (Russian Journal)*. 2017;95(5):419–24. Russian. doi: 10.18821/0023-2149-2017-95-5-419-424.
9. Ershova MV, Ivanova EO, Illarionov SN. Parkinson's Disease and Neurotrophic Homeostasis. *Nervous Diseases*. 2018;(1):3–9. Russian. doi: 10.24411/2071-5315-2018-11991.
10. Lu B, Nagappan G, Guan X, Nathan PJ, Wren P. BDNF-based synaptic repair as a disease-modifying strategy for neurodegenerative diseases. *Nat Rev Neurosci*. 2013;14(6):401–16. doi: 10.1038/nrn3505.
11. Sun M, Kong L, Wang X, Lu XG, Gao Q, Geller AI. Comparison of the capability of GDNF, BDNF, or both, to protect nigrostriatal neurons in a rat model of Parkinson's disease. *Brain Res*. 2005;1052(2):119–29. doi: 10.1016/j.brainres.2005.05.072.
12. Wang Y, Liu H, Du XD, Zhang Y, Yin G, Zhang BS, Soares JC, Zhang XY. Association of low serum BDNF with depression in patients with Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord*. 2017;41:73–8. doi: 10.1016/j.parkreldis.2017.05.012.
13. Wang Y, Liu H, Zhang BS, Soares JC, Zhang XY. Low BDNF is associated with cognitive impairments in patients with Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord*. 2016;29:66–71. doi: 10.1016/j.parkreldis.2016.05.023.
14. Jiang L, Zhang H, Wang C, Ming F, Shi X, Yang M. Serum level of brain-derived neurotrophic factor in Parkinson's disease: a meta-analysis. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2019;88:168–74. doi: 10.1016/j.pnpbp.2018.07.010.
15. Fedorova NV, Omarova SM. Levodopa-induced dyskinesias in Parkinson disease: Pharmacotherapy and surgical treatment. *Nervous Diseases*. 2017;(1):22–30. Russian.
16. Raimova MM. [Range of displays and principles correction of late motor complications of dopaminergic therapy in Parkinson's disease and vascular parkinsonism]. *Meditinskie novosti*. 2016;(4):80–2. Russian.
17. Kim SD, Allen NE, Canning CG, Fung VSC. Parkinson disease. *Handb Clin Neurol*. 2018;159:173–193. doi: 10.1016/B978-0-444-63916-5.00011-2.
18. Rosinskaya AV, Vasenina EE, Khaybullin TN, Levin OS. [Rate of progression of Parkinson's disease with early and delayed prescription of levodopa preparations]. *Zh Nevrol Psikhiatr Im S S Korsakova*. 2018;118(6.Vyp. 2):77–81. Russian. doi: 10.17116/jnevro201811806277.
19. Carvalho MM, Campos FL, Coimbra B, Pêgo JM, Rodrigues C, Lima R, Rodrigues AJ, Sousa N, Salgado AJ. Behavioral characterization of the 6-hydroxydopamine model of Parkinson's disease and pharmacological rescuing of non-motor deficits. *Mol Neurodegener*. 2013;8:14. doi: 10.1186/1750-1326-8-14.
20. Paxinos G, Watson C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. 7th Edition. Academic Press; 2013. 388 p.
21. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 2001;25(4):402–8. doi: 10.1006/meth.2001.1262.
22. Molinoff PB, Axelrod J. Biochemistry of catecholamines. *Annu Rev Biochem*. 1971;40:465–500. doi: 10.1146/annurev.bi.40.070171.002341.
23. Postuma RB, Berg D, Stern M, Poewe W, Olanow CW, Oertel W, Obeso J, Marek K, Litvan I, Lang AE, Halliday G, Goetz CG, Gasser T, Dubois B, Chan P, Bloem BR, Adler CH, Deuschl G. MDS clinical diagnostic criteria for Parkinson's disease. *Mov Disord*. 2015;30(12):1591–601. doi: 10.1002/mds.26424.
24. Deumens R, Blokland A, Prickaerts J. Modeling Parkinson's disease in rats: an evaluation of 6-OHDA lesions of the nigrostriatal pathway. *Exp Neurol*. 2002;175(2):303–17. doi: 10.1006/exnr.2002.7891.
25. Stavrovskaya AV, Yamshchikova NG, Olshansky AS, Gushchina AS. Modeling Parkinson's disease: Analysis of behavioral disturbances. *Nervous Diseases*. 2018;(2):44–50. Russian. doi: 10.24411/2071-5315-2018-12022.
26. Xu JT, Qian Y, Wang W, Chen XX, Li Y, Li Y, Yang ZY, Song XB, Lu D, Deng XL. Effect of stromal cell-derived factor-1/CXCR4 axis in neural stem cell transplantation for Parkinson's disease. *Neural Regen Res*. 2020;15(1):112–9. doi: 10.4103/1673-5374.264470.
27. Branchi I, D'Andrea I, Armida M, Cassano T, Pèzola A, Potenza RL, Morgese MG, Popoli P, Alleleva E. 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):2050–61. doi: 10.1002/jnr.21642.
28. Tadaiesky MT, Dombrowski PA, Figueiredo CP, Cargnin-Ferreira E, Da Cunha C, Takahashi RN. Emotional, cognitive and neurochemical alterations in a premotor stage model of Parkinson's disease. *Neuroscience*. 2008;156(4):830–40. doi: 10.1016/j.neuroscience.2008.08.035.
29. Hanganu A, Degroot C, Monchi O, Bedetti C, Mejia-Constain B, Lafontaine AL, Chouinard S, Bruneau MA. Influence of depressive symptoms on dopaminergic treatment of Parkinson's disease. *Front Neurol*. 2014;5:188. doi: 10.3389/fneur.2014.00188.
30. Eskow Jaunarajs KL, Dupre KB, Ostock CY, Button T, Deak T, Bishop C. Behavioral and neurochemical effects of chronic L-DOPA treatment on nonmotor sequelae in the hemiparkinsonian rat. *Behav Pharmacol*. 2010;21(7):627–37. doi: 10.1097/FBP.0b013e32833e7e80.
31. Hernández VS, Luquín S, Jáuregui-Huerta F, Corona-Morales AA, Medina MP, Ruíz-Velasco S, Zhang L. Dopamine receptor dysregulation in hippocampus of aged rats underlies chronic pulsatile L-Dopa treatment induced cognitive and emotional alterations. *Neuropharmacology*. 2014;82:88–100. doi: 10.1016/j.neuropharm.2013.11.013.
32. Winter C, von Rumohr A, Mundt A, Petrus D, Klein J, Lee T, Morgenstern R, Kupsch A, Juckel G. Lesions of dopaminergic neurons in the substantia nigra pars compacta and in the ventral tegmental area enhance depressive-like behavior in rats. *Behav Brain Res*. 2007;184(2):133–41. doi: 10.1016/j.bbr.2007.07.002.



The pro-depressive effect of levodopa in a 6-OHDA-induced hemiparkinsonism rat model

O.S. Karimova¹ • A.Yu. Morozova¹ • Ya.A. Zorkina¹ • E.A. Zubkov¹ • V.M. Ushakova^{1,2} • O.V. Abramova¹ • V.P. Chekhonin^{1,3}

Rationale: Treatment of Parkinson's disease has been by now symptomatic. The literature on the efficacy and side effects of levodopa has been contradictory. Some authors mention an anti-depressant effect of the agent, while others believe that it is exactly levodopa that eventually induces the occurrence of depressive symptoms. **Aim:** To reproduce the OHDA-hemiparkinsonism rat model with subsequent assessment of both external and structural manifestations of the disorder, as well as to study the efficacy of levodopa for motor and non-motor symptoms of parkinsonism. **Materials and methods:** The study was performed in 52 male Wistar rats. The disease model included stereotaxic administration of neurotoxic 6-OHDA into the *pars compacta* of the *substantia nigra*. At 2 months after the administration, the animals underwent test for motor (Rotarod, cylinder, ketamine-induced rotation in the rotometer) and non-motor abnormalities (open field, social interest, conditioned escape response). **Results:** In 18% of the animals no hemiparkinsonism symptoms were found. 32% of rats had only motor

symptoms, whereas in 50% of the animals both motor and non-motor symptoms were noted. Levodopa could partially correct the motor abnormalities, with augmentation of depressive-like behavior. **Conclusion:** Levodopa has shown its partial efficacy in correction of the motor symptoms caused by administration of 6-OHDA neurotoxin; however, it caused such side effects as augmentation of depressive-like behavior and anxiety.

Key words: neurodegenerative disorders, Parkinson's disease, 6-OHDA, levodopa

For citation: Karimova OS, Morozova AYU, Zorkina YA, Zubkov EA, Ushakova VM, Abramova OV, Chekhonin VP. The pro-depressive effect of levodopa in a 6-OHDA-induced hemiparkinsonism rat model. Almanac of Clinical Medicine. 2020;48(1):22–33. doi: 10.18786/2072-0505-2020-48-005.

Received 23 September 2019; revised 29 January 2020; accepted 31 January 2020; published online 17 February 2020

Conflict of interests

The authors declare that they have no conflict of interests.

Authors' contributions

O.S. Karimova, Parkinson's disease model with stereotaxic administration of neurotoxin 6-OHDA, tests for motor and non-motor symptoms, data collection, management and analysis, text writing; A.Yu. Morozova, the study concept and design, including its experimental part, tests for motor and non-motor symptoms, analysis of clinical experimental study results, editing of the manuscript, approval of the final version of the manuscript; Ya.A. Zorkina, the study concept and design, analysis and interpretation of the study results, text writing, approval of the final version of the manuscript; E.A. Zubkov, the study concept and design, analysis of the results, approval of the final version of the manuscript; V.M. Ushakova, analysis of clinical experimental study results, text writing, editing of the manuscript; O.V. Abramova, management and care of the experimental animals, tests for motor and non-motor symptoms; V.P. Chekhonin, general guidance of the study. All the authors made their significant contributions to the research and preparation of the article, have read and approved the final version before submission.

Olga S. Karimova – Laboratory Assistant Research Fellow, Laboratory of Immunochemistry, Department of Basic and Applied Neurobiology¹; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6377-3356>
✉ 23/1 Kropotkinskiy pereulok, Moscow, 119034, Russian Federation. Tel.: +7 (985) 988 13 73.
E-mail: karimovaos@yandex.ru

Anna Yu. Morozova – MD, PhD, Senior Research Fellow, Laboratory of Neurochemistry, Department of Basic and Applied Neurobiology¹; ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-8681-5299>.
E-mail: hakurate77@gmail.com

Yana A. Zorkina – PhD (in Biol.), Research Fellow, Laboratory of Immunochemistry, Department of Basic and Applied Neurobiology¹; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0247-2717>.
E-mail: zorkina.ya@serbsky.ru

Eugene A. Zubkov – PhD (in Biol.), Senior Research Fellow, Laboratory of Neurochemistry, Department of Basic and Applied Neurobiology¹; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6133-3421>.
E-mail: zubkov@ngs.ru

Valeria M. Ushakova – PhD (in Biol.), Junior Research Fellow, Laboratory of Immunochemistry, Department of Basic and Applied Neurobiology¹; Educational Master of the 1st category, Chair of Higher Nervous Activity, Biological Faculty²; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3480-910X>. E-mail: ushakovavm@yandex.ru

Olga V. Abramova – Junior Research Fellow, Laboratory of Neurochemistry, Department of Basic and Applied Neurobiology¹; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8793-1833>.
E-mail: abramova1128@gmail.com

Vladimir P. Chekhonin – MD, PhD, Professor, Member of Russian Academy of Sciences, Head of the Department of Basic and Applied Neurobiology¹; Head of the Chair of Nanobiotechnology in Medicine, Faculty of Medicine and Biology³; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4386-7897>.
E-mail: chekhoninnew@yandex.ru

¹ Serbsky Federal Medical Research Centre for Psychiatry and Narcology; 23 Kropotkinskiy pereulok, Moscow, 119034, Russian Federation

² Lomonosov Moscow State University; 1/2 Leninskie gory, Moscow, 119991, Russian Federation

³ Pirogov Medical University; 1 Ostrovityanova ul., Moscow, 117997, Russian Federation