НЕЙРОХИМИЯ, 2024, том 41, № 2, с. 147–152

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ РАБОТЫ

УДК 615.217.32

ОСОБЕННОСТИ ИЗМЕНЕНИЯ УРОВНЯ НЕЙРОМЕДИАТОРОВ И МАРКЕРОВ НЕЙРОДЕГЕНЕРАЦИИ В ГОЛОВНОМ МОЗГЕ КРЫС С ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ БОЛЕЗНЬЮ ПАРКИНСОНА НА ФОНЕ КУРСОВОЙ ТЕРАПИИ СТЕРОИДНЫМИ ГЛИКОАЛКАЛОИДАМИ

© 2024 г. В. А. Воронов[1, *], Д. И. Поздняков[1, 2]

[1]Пятигорский медико-фармацевтический институт — филиал ФГБОУ ВО Волгоградский государственный медицинский университет Министерства здравоохранения России, Пятигорск, Россия

[2]Пятигорский государственный научно-исследовательский институт курортологии, филиал Федерального государственного бюджетного учреждения "Федеральный научно-клинический центр медицинской реабилитации и курортологии Федерального медико-биологического агентства", Пятигорск, Россия

**E-mail: a54545a@mail.ru*

Поступила в редакцию 12.10.2023 г.
После доработки 07.11.2023 г.
Принята к публикации 23.11.2023 г.

Болезнь Паркинсона — хроническое нейродегенеративное заболевание, одним из патобиохимических проявлений которого является дисбаланс нейромедиаторов в головном мозге. Целью данной работы является исследование влияния гликоалкалоидов на изменение уровня нейромедиаторов и маркеров нейродегенерации головного мозга у крыс с экспериментальной болезнью Паркинсона. Болезнь Паркинсона моделировали у животных путем интрацеребрального введения ротенона. Исследуемые гликоалкалоиды вводили перорально в дозе 0.06 мг/кг, курсом в 28 дней после моделирования патологии. В ходе исследования установлено, что применение анализируемых гликоалкалоидов не влияло на концентрацию дофамина и серотонина, а также достоверно ($p < 0.05$) снижало уровень АХ на 35.9% и повышало уровень ГАМК на 55.1%, уменьшало концентрацию белка S100β на 68.6% и повышало уровень BDNF на 52.4%.

Ключевые слова: алкалоиды, соланин, чаконин, болезнь Паркинсона

DOI: 10.31857/S1027813324020057, **EDN:** ETIGEM

ВВЕДЕНИЕ

Болезнь Паркинсона — хроническое нейродегенеративное заболевание головного мозга, при котором происходит нарушение двигательной активности и развитие таких немоторных нарушений, как, например, снижение когнитивных функций. Несмотря на ведущиеся исследования роли различных факторов в этиологии и изучение звеньев патогенеза болезни Паркинсона, а также по разработке новых подходов к терапии, в настоящее время не существует методов лечения БП, а основной стратегией терапии является замедление прогрессирования заболевания [1]. Основной патогенеза БП является потеря дофаминергических нейронов в области компактной черной субстанции среднего мозга. В этой связи "золотым стандартом" терапии БП является леводопа — препарат, действие которого направлено на восполнение недостатка дофамина в головном мозге, что позволяет корректировать клинические проявления заболевания и улучшить качество жизни пациента [2]. К характерным для болезни Паркинсона биохимическим изменениям в мозге, кроме снижения уровня дофамина, относится недостаток "тормозных" нейромедиаторов, таких как ГАМК, а также избыток "возбуждающих" нейромедиаторов — ацетилхолина, серотонина и глутамата. Несмотря на доминирующую роль дофаминергической системы в БП нельзя не учитывать влияние иных нейромедиаторных систем на течение заболевания; так, при нарастании патохимических изменений, характерных для БП, большее значение приобретают симптомы, обусловленные поражением холинергической и других систем [3]. В связи с этим остается актуальным вопрос разработки новых подходов и терапевтических средств для лечения болезни Паркинсона, в том числе влияющих на моноаминергические нейромедиаторные механизмы [4, 5]. Целью данной работы является исследование влияния гликоалкалоидов *Solanum Tuberosum* L. на изменение уровня нейромедиаторов и маркеров

нейродегенерации в ткани головного мозга у крыс с экспериментальной БП. Алкалоиды *Solanum Tuberosum* — соланин и чаконин содержатся в побегах и зеленых частях картофеля, и, как следствие, широко распространены по всему миру. Их особенностями является доступность и простота извлечения из растительного сырья. Ранние исследования показали наличие у соланина и чаконина М-холиноблокирующего эффекта, а также слабо выраженную активность в отношении ацетилхолинэстеразы [6]. Данный вид активности является предпосылкой для применения алкалоидов *Solanum Tuberosum* L. в качестве противопаркинсонического средства.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Используемые в ходе исследования гликоалкалоиды были выделены по описанной ранее схеме [6].

Для выполнения поставленной цели работа была подразделена на следующие этапы:

Определение острой токсичности гликоалкалоидов.

Изучение влияния гликоалкалоидов на уровень нейромедиаторов и маркеров нейродегенерации в головном мозге крыс в условиях экспериментальной болезни Паркинсона.

Для определения острой токсичности крысам самкам Wistar средним весом (300 ± 30) г (n = 10 для каждой дозы) вводили перорально, с помощью зонда, водный раствор алкалоидов, подкисленный уксусной кислотой до pH 6.5, в концентрациях 200 мг/мл (666.67 мг/кг), 100 мг/мл (333.33 мг/кг), 40 мг/мл (133.33 мг/кг), 20 мг/мл (66.67 мг/кг), 10 мг/мл (33.33 мг/кг), 5 мг/мл (16.67 мг/кг). Состояние крыс оценивали в течении суток, после чего рассчитывали LD50 методом пробит-анализа и терапевтическую дозу гликоалкалоидов.

Для исследования противопаркинсонической активности использовали 40 крыс самок Wistar весом (350 ± 50) г. Животные были получены из питомника лабораторных животных “Рапполово” и на время исследования содержались в помещениях вивария в контролируемых условиях: температура окружающего воздуха (22 ± 2)ºС, относительная влажность (60 ± 5)%, при естественной смене суточного цикла и со свободным доступом к полнорационному корму и воде. Содержание и манипуляции с животными соответствовали положениям Директивы ЕС2010/63 “О защите животных, использующихся в научных целях”.

Крыс рандомизировали по массе тела на четыре группы по 10 животных в каждой: ложнооперированная (ЛО) группа; группа, не получавшая терапию, — негативный контроль (НК); группа, получавшая терапию препаратом сравнения, — прамипексол (производства “Тева Канада Лимитед”, Канада) в дозе 1 мг/кг [7]; группа, получавшая лечение исследуемыми веществами в дозе 1/300 от LD50. В качестве препарата сравнения был выбран прамипексол, так как данный лекарственный препарат один из широко применяемых и эффективных в клинической практике для терапии БП [8].

Для моделирования болезни Паркинсона была выбрана ротеноновая модель. Для этого крысам проводили стереотаксическую операцию при анестезии хлоралгидратом (Acros Organics, 350 мг/кг, внутрибрюшинно): в черепе просверливали отверстие, в правое полосатое тело вставляли канюлю, после чего животным всех групп, кроме ложнооперированной, вводили 4 мкл раствора ротенона (Sigma-Aldrich, США) в ДМСО в концентрации 5 мг/мл. Животным ложнооперированной группы вводили аналогичный объем физиологического раствора. Были использованы следующие стереотаксические координаты: AP + 0.4, ML-2.0 (от брегмы) и DV-3.3 ниже твердой мозговой оболочки. Эксперимент проводили спустя 14 дней формирования заболевания, согласно описанной в литературе методике [9].

В течении 28 дней крысы ежедневно получали пероральную терапию прамипексолом или алкалоидами. Для приготовления смеси для перорального введения готовили суспензию прамипексола в воде, а алкалоиды, ввиду низкой концентрации, растворяли в подкисленной уксусной кислотой до pH 6.7—6.9 воде. Спустя 28 дней введения животных выводили из эксперимента методом декапитации под хлоралгидратной анестезией. Вскрывали черепную коробку и извлекали головной мозг, из которого готовили гомогенат с 5 мл фосфатного буферного раствора (pH 7.4) в соотношении ткань — буферный раствор 1 : 7. Гомогенат головного мозга центрифугировали при 10000g в течение 10 мин, после чего в супернатанте определяли количество дофамина, серотонина, ацетилхолина, ГАМК. Для оценки степени выраженности нейродеструктивных процессов в супернатанте мозговой ткани оценивали содержание белка S100β и мозгового нейротрофического фактора (BDNF). Концентрацию нейромедиаторов и маркеров нейродегенерации оценивали методом ИФА с применением видоспецифичных реактивов *Cloud Clone* (США). Ход анализа соответствовал таковому, прописанному в инструкции к каждому набору. Статистические отличия оценивали с помощью пакета программ Statistica 6.0 (StatSoft) при уровне значимости $p < 0.05$ методом ANOVA с пост-процессингом по Ньюмену—Кейлсу. Данные представлены в виде M ± SEM (среднее значение ± стандартная ошибка среднего).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В ходе оценки острой токсичности гликоалкалоидов было установлено, что введение животным алкалоидов в концентрациях 200 мг/мл (666.67 мг/кг) и 100 мг/мл (333.33 мг/кг) вызывало смерть в течение 3 ч. При некропсии выявлены множественные перфорации на всем протяжении желудочно-кишечного тракта и кровоизлияние в брюшной полости, что объясняется раздражающим действием гликоалкалоидов [10]. Введение алкалоидов в концентрациях 40 мг/мл (133.33 мг/кг), 20 мг/мл (66.67 мг/кг) и 10 мг/мл (33.33 мг/кг) приводило к параличу дыхательного центра и остановке дыхания, при этом наблюдалось скопление крови в легких. Наблюдение за животными, получившими раствор 5 мг/мл, показало, что состояние животных оставалось удовлетворительным на протяжении всего периода. При пересчете LD50 составила 16.67 мг/кг. Согласно СГС классификации (Нью-Йорк и Женева, 2011) исследуемые алкалоиды можно отнести ко 2-му классу пероральной токсичности. При расчете терапевтической дозы мы учитывали высокую биологическую активность алкалоидов и практическое применение низких терапевтических доз иных препаратов алкалоидов [11]. Исходя из полученных данных был проведен расчет терапевтической дозы, которую применяли в ходе дальнейших исследований. Для снижения возможных токсических эффектов терапевтическая доза составила 1/300 высшей суточной дозы, что составляет 0.06 мг/кг.

В результате исследования уровня нейромедиаторов головного мозга было выявлено снижение концентрации дофамина у группы НК относительно ЛО на 48.8% ($p < 0.05$), тогда как у группы крыс, получавших прамипексол, наблюдалось увеличение аналогичного показателя относительно группы НК на 32.3% ($p < 0.05$). При этом введение гликоалкалоидов не оказало существенного влияния на изменение уровня дофамина в головном мозге у крыс с экспериментальной БП.

Определение уровня серотонина позволило выявить увеличение его уровня у группы НК на 24.9% ($p < 0.05$) относительно ЛО, а также снижение у группы прамипексола на 13.4% ($p < 0.05$) относительно НК, тогда как у группы алкалоидов отсутствуют достоверные отличия относительно группы НК.

Количество ацетилхолина у группы НК повышено на 51.4% ($p < 0.05$) относительно ЛО. Применение прамипексола и алкалоидов способствовало снижению содержание АХ на 13.4% ($p < 0.05$) и 35.9% ($p < 0.05$) соответственно относительно НК (рис. 1).

При отсутствии терапии происходило снижение уровня ГАМК у животных группы НК на 47.9% ($p < 0.05$) относительно ЛО крыс, тогда как применение прамипексола и алкалоидов повышало данный показатель на 33.5% ($p < 0.05$) и 55.1% ($p < 0.05$) соответственно относительно НК группы животных (см. рис. 1).

При анализе содержания белка S100β было выявлено его повышение у группы НК на 46.9% ($p < 0.05$)

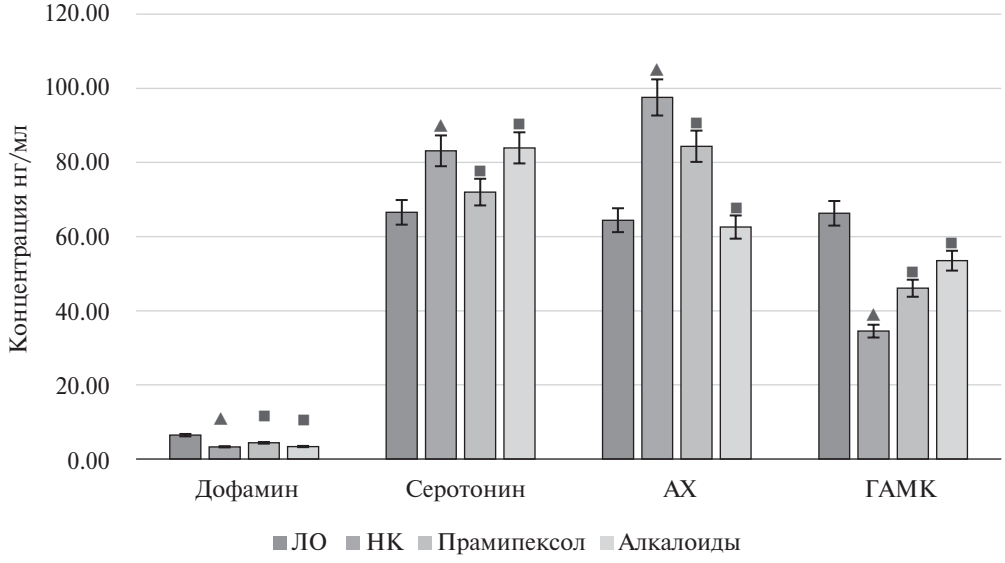

Рис. 1. Влияние прамипексола и гликоалкалоидов на изменение концентрации нейромедиаторов в тканях головного мозга у крыс с болезнью Паркинсона.
▲ — достоверно относительно ЛО; ■ — достоверно относительно НК.

относительно ЛО, а также его снижение на фоне применения прамипексола и алкалоидов на 60.3% ($p < 0.05$) и 68.6% ($p < 0.05$) относительно НК группы соответственно.

Определение нейротрофического фактора BDNF позволило установить снижение данного показателя у группы НК на 58.9% ($p < 0.05$) относительно ЛО и повышение у групп крыс, получавших прамипексол и алкалоиды на 53.7% ($p < 0.05$) и 52.4 % ($p < 0.05$) относительно НК группы животных.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

При нарастании характерных для болезни Паркинсона биохимических нарушений достоверно ($p < 0.05$) изменился уровень дофамина и серотонина у группы негативного контроля, относительно группы ложнооперированных животных: –48.8% и +24.9%. Применение прамипексола достоверно ($p < 0.05$) стабилизировало данные показатели, относительно группы негативного контроля (+32.3% и –13.4% соответственно), что согласуется с его механизмом действия [12]. В свою очередь, терапия алкалоидами не оказывала значительного эффекта на данное звено патогенеза БП, а достоверные отличия от группы негативного контроля не обнаружены.

В противовес этому алкалоиды нормализуют уровень АХ и ГАМК значимее (–35.9% и +55.1% относительно НК ($p < 0.05$)), чем препарат сравнения (–13.5% и +33.5% относительно НК). Снижение уровня АХ объясняется известной холиноблокирующей активностью соланина и чаконина в отношении М-холинорецепторов [6]: введение холинолитиков может приводить к снижению концентрации АХ в головном мозге [13]. Нельзя не отметить важную роль ГАМКергической нейротрансмиссии, связанной с ионами Ca^{2+}, в поддержании гомеостаза как на клеточном, так и на системном уровне, что определяется работой ГАМК-В рецепторов. Активация ГАМКергической системы приводит к снижению притока ионов Ca^{2+}, что положительно сказывается на кальций-индуцированном стрессе, снижает энергетические потребности клетки и корректирует митохондиальную дисфункцию, что, в свою очередь, снижает накопление интрацеребральных включений, в том числе телец Леви [14]. Таким образом, положительная динамика уровня ГАМК не только влияет на моторные нарушения, но и на течение болезни в целом. Полученная информация коррелирует с клиническим опытом лечения болезни Паркинсона [15].

При прогрессировании болезни Паркинсона происходит деградация нейронов головного мозга, что отражается повышенным уровнем белка S100β [16]: так, в наших экспериментах у группы НК этот показатель превышен более чем в пять раз (рис. 2). Существует прямая взаимосвязь между повышением уровня этого белка и гибелью нейронов [16]. Исходя из этого, можно делать выводы о том, что исследуемые гликоалкалоиды и препарат сравнения тормозили разрушение клеточных структур, так как приводили к значительному снижению уровня белка S100β (см. рис. 2).

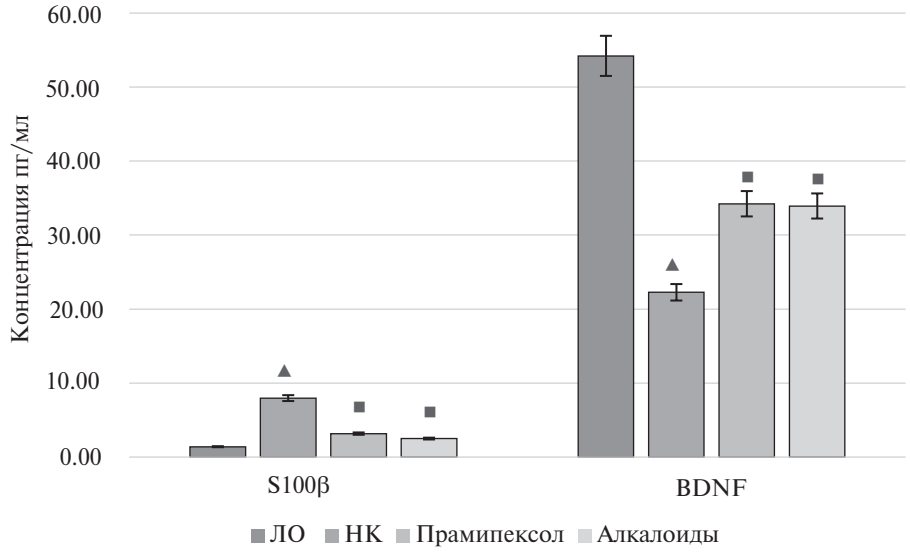

Рис. 2. Влияние прамипексола и смеси соланина и чаконина на изменение концентрации белка S100β и субстанции BDNF в тканях головного мозга у крыс с болезнью Паркинсона.
▲ — достоверно относительно ЛО; ■ — достоверно относительно НК.

Гибель дофаминергических нейронов сопровождается снижением концентрации BDNF. Также данный нейротрофин предотвращает гибель клеток и поддерживает функцию пораженных нейронов при БП [17]. Сопоставимый уровень нейротрофического фактора головного мозга у групп, получавших терапию прамипексолом и алкалоидами, указывает на наличие нейропротекторного эффекта, а также позволяет предположить стимуляцию репаративных процессов в головном мозге животных с БП. Ранее уже проводились исследования относительно нейропротекторных эффектов прамипексола, которые связывают с его противовоспалительной активностью и усилением аутофагии [18].

Так как применение гликоалкалоидов приводит к схожему изменению уровня нейромедиаторов и маркеров нейродегенерации у животных с БП, то можно предположить их положительное влияние на моторные нарушения и наличие нейропротекторного эффекта. Возможно, моделирующее действие ГАМКергической системы оказывает некоторое влияние на уровни S100β и BDNF у группы животных, получавших терапию алкалоидами, однако маловероятно, что отдельно взятая система может оказывать столь выраженный протекторный эффект. Также остается открытым вопрос о механизмах, которые приводят к нормализации уровня ГАМК у животных, получавших терапию исследуемыми веществами. Литературные данные относительно фармакологической активности соланина и чаконина, а также потенциальных мишеней, недостаточны, ввиду чего можно предположить, что данные вещества обладают плейотропным действием, однако, данный вопрос требует дальнейших исследований.

ВЫВОДЫ

Применение алкалоидов *Solanum Tuberosum* L. в дозе 0.06 мг/кг в условиях экспериментальной БП нормализовало уровень АХ и ГАМК, а также значительно снижало уровень белка S100β и BDNF. Стоит отметить, что введение гликоалкалоидов не оказывало влияния на уровень дофамина и серотонина.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Внешнее финансирование отсутствует.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ

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

Этическое одобрение. Все применимые международные, национальные и институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены. Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей в качестве объектов исследований.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Church F.C.* // Biomolecules. 2021. V. 11. № 4. P. 612. https://doi.org/10.3390/biom11040612
2. *Nawaz H., Sargent L., Quilon H., Cloud L.J., Testa C.M., Snider J.D., Lageman S.K., Baron M.S., Berman B.D., Zimmerman K., Price E.T., Mukhopadhyay N.D., Barrett M.J.* // Parkinsons Dis. 2022. V. 12. № 2. P. 599—606. https://doi.org/10.3233/JPD-212769.
3. *Ершова М.В., Иванова Е.О., Илляриошкин С.Н.* // 2018. № 1. С. 3—9.
4. *Seppi K., Ray Chaudhuri K., Coelho M., Fox S.H., Katzenschlager R., Perez Lloret S., Weintraub D., Sampaio C. & the collaborators of the Parkinson's Disease Update on Non-Motor Symptoms Study Group on behalf of the Movement Disorders Society Evidence-Based Medicine Committee* // Mov Disord. 2019. V. 34. № 2. P. 180—198. https://doi.org/10.1002/mds.27602
5. *Elsworth J.D.* // Neural Transm. 2020. V. 127. № 5. P. 785—791. https://doi.org/10.1007/s00702-020-02167-1
6. *Воронов В.А., Поздняков Д.И., Золотых Д.С., Дайронас Ж.В., Черников М.В.* // ВНМТ. 2023. Т. 30. № 1. С. 75—79.
7. *Mihaylova A., Doncheva N., Zlatanova H., Delev D., Ivanovska M., Koeva Y., Murdjeva M., Kostadinov I.* // Basic Med Sci. 2021. V. 24. № 5. P. 577—585. https://doi.org/10.22038/ijbms.2021.50439.11488
8. *Катунина Е.А., Титова Н.В., Бездольный Ю.Н., Шиккеримов Р.К., Гасанов М.Г., Бурд С.Г., Лебедева А.В., Бойко А.Н.* // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. 2015. Т. 115. № 5. С. 34—40.
9. *Innos J., Hickey M.A.* // Chem Res Toxicol. 2021. V. 34. № 5. P. 1223—1239. https://doi.org/10.1021/acs.chemrestox.0c00522
10. *Бухтиярова И.П., Калиушко В.Р.* // Научно-практические аспекты развития АПК: Материалы национальной научной конференции. 2021. Часть 1. С. 135—138.
11. *Кузьмин О.Б., Жежа В.В., Бучнева Н.В., Ландарь Л.Н.* // Артериальная гипертензия. 2022. Т. 28. № 5. С. 600—608.
12. *Singh R., Parmar M.* // StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2023.
13. *Dagaev S.G., Kosmachev A.B., Soloveva N.E., Filko O.A., Sanotskii V.I., Dolgo-Saburov V.B.* // Bull Exp Biol Med. 2004. V. 137. № 2. P. 164-6. https://doi.org/10.1023/b:bebm.0000028130.09656.ac
14. *Błaszczyk J.W.* // Front Neurosci. 2016. № 10. P. 269. https://doi.org/10.3389/fnins.2016.00269.
15. *Connolly B.S., Lang A.E.* // JAMA. 2014. V. 311. № 16. P. 1670-83. https://doi.org/10.1001/jama.2014.3654.
16. *Michetti F., D'Ambrosi N., Toesca A., Puglisi M.A., Serrano A., Marchese E., Corvino V., Geloso M.C.* // Neurochem. 2019. V. 148. № 2. P. 168—187. https://doi.org/10.1111/jnc.14574

17. *Palasz E., Wysocka A., Gasiorowska A., Chalimoniuk M., Niewiadomski W., Niewiadomska G.* // Mol Sci. 2020. V. 21. № 3. P. 1170. https://doi.org/10.3390/ijms21031170

18. *Dong A.Q., Yang Y.P., Jiang S.M., Yao X.Y., Qi D., Mao C.J., Cheng X.Y., Wang F., Hu L.F., Liu C.F.* // Acta Pharmacol Sin. 2023. V. 44. № 1. P. 32—43. https://doi.org/10.1038/s41401-022-00951-1

Features of Changes in the Level of Neurotransmitters and Markers of Neurodegeneration in the Brain of Rats with Experimental Parkinson's Disease Against the Background of Course Therapy with Steroid Glycoalkaloids

V. A. Voronov[1], D. I. Pozdnyakov[1, 2]

[1]*Pyatigorsk Medical and Pharmaceutical Institute — branch of the Volgograd State Medical University of the Ministry of Health of Russia, Pyatigorsk, Russia*

[2]*"Pyatigorsk State Research Institute of Balneology" branch of the Federal State Budgetary Institution "Federal Scientific and Clinical Center for Medical Rehabilitation and Balneology of the Federal Medical and Biological Agency", Pyatigorsk, Russia*

Parkinson's disease is a chronic neurodegenerative disease, one of the pathobiochemical manifestations of which is an imbalance of neurotransmitters in the brain. The aim of this work is to study the effect of glycoalkaloids on changes in the level of neurotransmitters and markers of brain neurodegeneration in rats with experimental Parkinson's disease. Parkinson's disease was modeled in animals by intracerebral administration of rotenone. The studied glycoalkaloids were administered orally at a dose of 0.06 mg / kg, a course of 28 days after pathology modeling. The study found that the use of the analyzed glycoalkaloids did not affect the concentration of dopamine and serotonin, and also significantly ($p < 0.05$) reduced the level of ACh by 35.9% and increased the level of GABA by 55.1%, reduced the concentration of S100**β** protein by 68.6% and increased the level of BDNF by 52.4%.

Keywords: alkaloids, solanine, chaconin, Parkinson's disease