

Feruza TOLLIBOYEVA,

O'zbekiston Milliy universiteti tayanch doktoranti

ftolliboeva@mail.com

Nafisa KOMILOVA,

O'zbekiston Milliy universiteti PhD, Biofizika kafedrasida o'qituvchisi

nafisa070890@gmail.com

Ulug'bek MIRXODJAEV

O'zbekiston Milliy universiteti Biofizika kafedrasida professori

O'z.MU qoshidagi Biofizika va Biokimyo instituti, Molekular biofizika laboratoriyasi katta ilmiy xodimi, b.f.d. N. A. Ergashev taqrizi asosida.

ОЦЕНКА ИЗМЕНЕНИЙ МОТОРНЫХ ДВИЖЕНИЙ НА IN VIVO МОДЕЛЯХ БОЛЕЗНИ ПАРКИНСОНА

Аннотация

Болезнь Паркинсона (БП) - второе по распространенности нейродегенеративное заболевание, связанное с двигательными расстройствами [1]. Хотя общие меры лечения ПК еще не до конца разработаны, в симптоматическом лечении заболевания достигнут некоторый прогресс. Гетерогенность ПК, обусловленная возрастом дебюта и причинами ее возникновения, требует разнообразия моделей, полностью раскрывающих особенности заболевания. Одной из приоритетных задач при проведении экспериментов является выбор и создание моделей, способных в полной мере выявить все признаки клинической ПК. В настоящее время модели на животных являются лучшим инструментом для изучения патогенеза ПК. В ходе проведенных нами экспериментов были рассмотрены методы *создания in vivo* модели болезни Паркинсона у животных и корректной оценки двигательных движений, происходящих на моделях.

PARKINSON KASALLIGINING IN VIVO MODELLARIDA MOTOR HARAKATLARI O'ZGARISHLARINI

BAHOLASH

Аннотация

Parkinson kasalligi (PK) ikkinchi o'rinda eng keng tarqalgan harakat buzilishi bilan bog'liq neyrodegenerativ kasallik hisoblanadi [1]. PKning umumiy davo choralarini to'liq ishlab chiqilmagan bo'lsada kasallikka qarshi simptomatik kurashish bo'yicha bir qancha yutuqlarga erishilgan. PK ning uchrash yoshi va kelib chiqish sabablariga ko'ra geterogenligi kasallik xususiyatlarini to'la nomoyon qiluvchi modellarning ham xilma xilligini talab qiladi. Klinik PK ning barcha belgilarini to'laonli nomoyon qila oluvchi modellarni tanlash va ularni yaratish tajribalar davomida ustuvor vazifalardan biridir. Hozirgi kunda hayvon modellari PK patogenezini o'rganish uchun eng yaxshi vositadir. Olib borilgan tajribalarimiz davomida Parkinson kasalligining hayvonlarda *in vivo* modelini yaratish va modellarda yuzaga keluvchi motor harakatlarini to'g'ri baholash metodlari ko'rib chiqildi.

ASSESSMENT OF BIOENERGETIC PROCESSES IN MITOCHONDRIA IN IN VIVO MODELS OF PARKINSON'S DISEASE

Annotation

Parkinson's disease (PD) is the second most common neurodegenerative disease associated with movement disorders [1]. Although general treatment measures for PK have not been fully developed, some progress has been made in the symptomatic treatment of the disease. The heterogeneity of PK due to the age of onset and the causes of its origin requires the diversity of models that fully reveal the characteristics of the disease. One of the priority tasks during experiments is to choose and create models that can fully reveal all the signs of clinical PK. Currently, animal models are the best tool for studying the pathogenesis of PK. During our experiments, methods of creating an *in vivo* model of Parkinson's disease in animals and correctly evaluating the motor movements occurring in the models were considered.

Kalit so'zlar. *Parkinson kasalligi (PK), rotenon, oksidlanishli fosforlanish, ATF, ADF*

Kirish. Parkinson kasalligi (PK) o'rta miya substansia nigra qismida joylashgan dofaminergik neyronlarning selektiv yo'qolishi bilan borib, sekin rivojlanuvchi kasallikdir. PK ning kelib chiqishi 10% irsiylanish yo'li oqali deb hisoblanadi [2] qolgan 90% tasodifiy deb qaraladi va aniq sabablar hozirgacha noma'lumdur. Ammo ehtimoliy jihatdan genetik moyillik va uzoq muddatli noqulay tashqi sharoit oqibatida ham deb tahmin qilinadi [3]. Epidemiologik kuzatuv natijalariga ko'ra pestisidlar PK ga chalinish xavfini oshiradi [4]. Shunday qilib, ushbu ko'p qirrali kasallik haqidagi tushunchamizni chuqurlashtirish va hozirda cheklangan davolash imkoniyatlarini kengaytirish uchun eksperimental modellarga katta ehtiyoj bor [5]. Hayvon modellari dorilarni kashf qilishda klinikadan oldingi tadqiqotlarning asosiy qismidir [6]. PK etiologiyasi va patologiyasining geterogenligi hayvonlarda PD ning turli tomonlarini takrorlashi mumkin bo'lgan turli xil modellarni talab qiladi [5]. Eksperimental hayvonlarda PKni modellashtirish uchun ikkita asosiy yondashuv qo'llaniladi: neyrotoksinlar (6-gidroksidofamin (6-OHDA) va 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridin (MPTP) modellari) va pestitsid rotenon, paraquat gerbitsid) va genetik mutatsiyalar [7]. Kalamushlarda rotenon modeli dofamin hujayralarining yemirilishi, α -sinuklein hosil bo'lishi va motor harakatlardagi kamchiliklarni keltirib chiqara olish xususiyatlariga ko'ra PK ning pestisidli modeli sifatida ishonchli hisoblanadi [8]. Rotenon yuqoridagi disfunktsiyalardan tashqari mitoxondriyal funksiyasini ingibirlaydi va shu sababdan neyrodegenerativ kasalliklarda asosan PK da nerv hujayralarining nobud bo'lishiga mitoxondriyalardagi disfunktsiya asosiy sabablardan biri deb qaraladi [9].

Materiallar va metodlar. Tadqiqotlar vazni o'rtacha 200-250g zotsiz oq kalamushlarda olib borildi. Kalamushlarda PK modeli rotenon pestisidi orqali yaratildi. Rotenon eritmasi stok ko'rinishida 100% li dimetilsulfoksid (DMSO) da eritildi va zaytun moyida (1:23) qayta suyultirildi. Kalamushlar rotenon qabul qiluvchi (n=7) hamda nazorat guruhlariga ajratildi (n=3). Rotenon model kalamushlariga 6 hafta : 3 hafta davomida haftada 5 kun-1mg/kg/kun miqdorda, 4-5- hafta davomida 2mg/kg/kun miqdorida rotenon nazorat guruhlariga faqat zaytun moyi qorin bo'shlig' orqali yuborildi. Kalamushlar kunlik monitoring qilib borildi.

Kalamushlarda motor harakatlari o'zgarishlarini baholash. Modellarda harakat o'zgarishlarini aniqlash va baholash uchun *ustundan yurish, silindr va panja kuchini aniqlash* testlaridan foydalanildi .

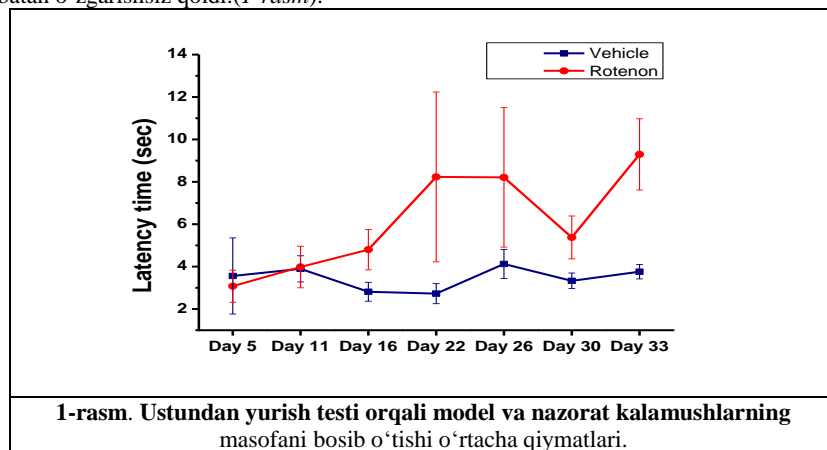
Ustundan yurish testi orqali kalamushlarning maxsus ustun bo‘ylab “uy” gacha yetib kelish vaqti hisoblandi. Bu test rotenon qabulining beshinchi kunidan boshlab haftada 2 marotaba o‘tqazildi.

Silindr testi kalamushlarning yangi muhitni o‘rganish xususiyatiga asoslangan bo‘lib, bunda kalamushlar silindrga joylangach 3 daqiqa ichida old panjalarini silindr devoriga yelkalaridan baland holatda necha marotaba tegqazishi hisoblandi. Keyingi urinish kalamush panjalarini silindir pastki devoriga to‘liq qo‘ygach hisoblanadi. Test rotenon qabulining birinchi haftaligidan boshlab haftada bir marotaba o‘tqazildi [10].

Panja kuchini aniqlash testi davomida kalamushlar maxsus simli panjarada avval panjara markaziga joylandi va yerdan 30-40- sm balandlikda tutib turildi. So‘ngra panjara 180° teskari holatga aylantirildi. Panjara aylantirilgan vaqtdan to kalamushlar yerga yiqilguncha ketgan vaqt sekundlarda o‘lchandi. Ushbu testda kalamushlar o‘z tana vaznini qancha muddat tutib turishi orqali kalamush panjalaridagi kuch aniqlandi va shkalada baholandi. Test rotenon qabulining oxirgi 3 haftaligida o‘tqazildi [11]. Barcha testlar model hamda nazorat kalamushlarida kunning ikkinchi yarmida etika qoidalariga asoslangan holda o‘tqazildi. Monitoring davomida kalamushlar tana vazni haftada 3 marotaba o‘lchab borildi va tana vaznida o‘zgarishlar sezilmadi.

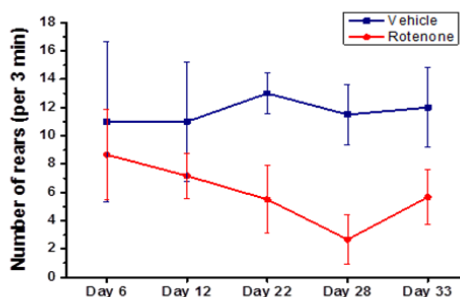
Miya to‘qimasi mitoxondriyalarini ajratib olish. Kalamush miya to‘qimasi mitoxondriyalari differensial sentrifugalash usuli yordamida ajratib olindi [12]. Kalamush dekepitatsiya qilingandan so‘ng bosh miya to‘qimasi ajratib olindi. Ajratish muhiti orqali (225 mM saxaroz, 75 mM mannitol, 10 mM HEPES, 1 mM EGTA, 0.01% BSA, pH =7.34) bir necha bor yuvilib, eritrotsitlardan tozalangach Douns gomogenizatori yordamida 10 -15 marotaba gomogeneziya qilindi. Gomogenat 3 bosqichda : 1-bosqichda 700g aylanma tezlikda +1°C haroratda 10 daqiqa sentrifuga qilindi va olingan supernatant yangi probirkaga quyiladi va xuddi shu parametrlarda 2- bosqichda sentrifugalandi. Ajratib olingan cho‘kma 3- bosqichda digitoninli (0.02%) ajratish muhitida qayta suspenziya qilingach 10000g aylanma tezlikda 15 daqiqa +1°C haroratda sentrifuga qilindi. So‘nggi bosqichda ajratib olingan mitoxondriyalar inkubatsion muhit (225 mM saxaroz, 75 mM mannitol, 10 mM HEPES, pH= 7.34) yordamida qayta suspenziyalandi va muz solingan idishda saqlandi. Mitoxondriyalarda oqsil miqdori biuret usuli yordamida o‘lchandi.

Tahlil va natijalar. Olingan natijalarga ko‘ra *ustundan yurish* testi 1- hafta natijalariga ko‘ra barcha model kalamushlar “yetib borish” tezligida farq sezilmadi, ammo rotenon qabulining 5 -haftasiga kelib rotenon qabul qiluvchi guruh kalamushlari nazorat guruhiga nisbatan umumiy vaqtda 6.5 sekundga kechikish kuzatildi. Nazorat guruhi kalamushlarida natija deyarli dastlabki holatga nisbatan o‘zgarishsiz qoldi. (1-rasm).



1-rasm. Ustundan yurish testi orqali model va nazorat kalamushlarning masofani bosib o‘tishi o‘rtacha qiymatlari.

“Silindr” testi natijalariga ko‘ra rotenon qabulining 6 kunida nazorat kalamushlarida silindr devoriga teginishlar soni o‘rtacha 11(±5,6) tani tashkil etdi. Bu vaqtda rotenon model kalamushlarida natijalar o‘rtacha 8,6 (±3,2) ta ni ko‘rsatdi. Rotenon qabulining navbatdagi haftalari davomida nazorat kalamushlarida natijalar deyarli o‘zgarmadi, rotenon model kalamushlarida teginishlar soni 28- kunida keskin pasaydi va 33- kunga kelib tegishli ravishda model kalamushlarda 5,6(±1,9) va nazorat kalamushlarida 12(±2,8) ni tashkil etdi (2-rasm).



2-rasm. Rotenon model va nazorat kalamushlarining silindr testi orqali olingan natijalar

Xulosa O‘tqazilgan testlar natijasiga ko‘ra rotenonning tegishli dozalarini yuborish orqali yaratilgan PKning hayvon modelida klinik PK da yuzaga keluvchi motor harakatlari disfunktsiyalari kuzatildi. Ustundan yurish va silindr testlari natijalariga ko‘ra model kalamushlar nazoratga nisbatan past ko‘rsatkichlarni nomoyon qildi.

ADABIYOTLAR

1. Timothy R. Mhyre, corresponding author James T. Boyd, Robert W. Hamill, and Kathleen A. Maguire-Zeiss. Parkinson’s Disease. *Subcell Biochem.* 2012; 65: 389–455.

2. Claudia M Testa, Todd B Sherer, J Timothy Greenamyre Rotenone induces oxidative stress and dopaminergic neuron damage in organotypic substantia nigra cultures *Brain Res Mol Brain Res* 2005 Mar 24;134(1):109-18
3. Jason R Cannon , Victor Tapias, Hye Mee Na, Anthony S Honick, Robert E Drolet, J Timothy Greenamyre (2009) A highly reproducible rotenone model of Parkinson's disease. *Neurobiol Dis.* 34(2): 279–290.
4. J M Gorell 1, C C Johnson, B A Rybicki, E L Peterson, R J Richardson. The risk of Parkinson's disease with exposure to pesticides, farming, well water, and rural living. *Neurology.* 1998 ;50(5):1346-50
5. Foltynie T, Brayne C, Barker RA. The heterogeneity of idiopathic Parkinson's disease. *J Neurol.* 2002 Feb;249(2):138–45.
6. Kevin M. Gamber. Animal Models of Parkinson's Disease: New models provide greater translational and predictive value. *Biotechniques* vol. 61, no. 4 . Published Online:16 Mar 2018
7. J Timothy Greenamyre 1, Teresa G Hastings. Parkinson's--divergent causes, convergent mechanisms. *Science.* 2004 May 21;304(5674):1120-2.
8. Betarbet R, Sherer TB, MacKenzie G, Gracia-Osuna M, Panov AV, Greenamyre JT. Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson's disease. *Nat Neurosci.* 2000 Dec;3(12):1301–6
9. Sherer TB, Betarbet R, Testa CM, Seo BB, Richardson JR, Kim JH, Miller GW, Yagi T, Matsuno-Yagi A, Greenamyre JT. Mechanism of toxicity in rotenone models of parkinson's disease. *J Neurosci.* 2003; 23(34):10756–10764.
10. Simon P Brooks 1, Stephen B Dunnett . Tests to assess motor phenotype in mice: a user's guide. *Nat Rev Neurosci* 2009 Jul;10(7):519-29.
11. Robert M.J. Deacon. Measuring the Strength of Mice. *Journal of Visualized Experiments.* 2013; (76): 2610.
12. Ignacio A, Javier T, Carlos BR. Isolating brain mitochondria by differential centrifugation. *Bio-protocol.* 2016; 6 (10): e1810. DOI: 10.21769/BioProtoc.1810.