

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»

На правах рукописи

Воронина Наталья Александровна

**Изучение механизмов нейропротекторного действия производных
адамантана на разных стадиях экспериментального паркинсонического
синдрома**

3.3.3 – патологическая физиология

3.3.6 – фармакология, клиническая фармакология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание учёной степени
кандидата медицинских наук

Москва – 2021

Работа выполнена в лаборатории общей патологии нервной системы
Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»

Научные руководители:

доктор медицинских наук **Кучеряну Валериян Григорьевич**

доктор медицинских наук, профессор, заслуженный деятель науки

Воронина Татьяна Александровна

Официальные оппоненты:

Башкатова Валентина Германовна – доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт нормальной физиологии имени П.К.Анохина»

Яснецов Виктор Владимирович – доктор медицинских наук, ведущий научный сотрудник Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Государственный научный центр Российской Федерации – Институт медико-биологических проблем РАН» Российской академии наук

Ведущая организация: Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М.Сеченова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет)

Защита диссертации состоится « 16 » декабря 2021 года в 14.00 часов на заседании Диссертационного совета 24.1.180.01 Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»

по адресу: 125315, г. Москва, ул. Балтийская, д.8

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБНУ ФГБНУ «НИИ общей патологии и патофизиологии».

Диссертация размещена на сайте института ФГБНУ ФГБНУ «НИИ общей патологии и патофизиологии» www.niopp.ru

Автореферат разослан « 15 » ноября 2021 года

Ученый секретарь

Диссертационного совета 24.1.180.01

доктор биологических наук

Панкова Н.Б.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Болезнь Паркинсона (БП) является хроническим нейродегенеративным заболеванием, приводящим к развитию инвалидности. Распространенность БП быстро растет среди стареющего населения мира и приводит к возрастанию в геометрической прогрессии социально-экономических затрат, что свидетельствует об острой потребности в эффективных способах лечения данной нозологии. Встречаемость БП составляет около 2% среди населения мира в возрасте 65 лет, а среди населения возрастом 80 лет достигает 5 % (Tysnes O.V., Storstein A., 2017). Прогнозируется увеличение заболеваемости БП в мире в два раза к 2040 г. (Dorsey E.R., Bloem V.R., 2018), что сделает его самым распространенным нейродегенеративным заболеванием, опережающим болезнь Альцгеймера (GBD 2015 Neurological Disorders Collaborator Group, 2017). В последние годы отмечается также общемировая тенденция к «омоложению» БП, эпидемическая распространенность заболевания увеличивается среди людей моложе 60 лет (Dorsey E.R., Bloem V.R., 2018).

Ключевым звеном патогенеза БП является повреждение и гибель нигростриатных дофаминергических нейронов, приводящее к резкому снижению уровня дофамина (ДА) в стриатуме головного мозга, в результате чего у больных возникает симптомокомплекс – акинезия, мышечная ригидность и тремор (Крыжановский Г.Н. и др., 2002; Угрюмов М.В., 2014; Armstrong M.J., Okun M.S., 2020). БП развивается постепенно, первые симптомы появляются спустя 20-30 лет от начала процесса дегенерации дофаминергических нейронов в черной субстанции (Угрюмов М.В. 2011, 2014, 2019; Bernheimer H., 1973). В клинике основным методом лечения болезни Паркинсона остается заместительная терапия в виде предшественника дофамина – L-ДОФА. Леводопа остается наиболее эффективным терапевтическим подходом на сегодняшний день, и по-прежнему считается «золотым стандартом» для лечения болезни Паркинсона.

Однако данная терапия является симптоматической и не направлена на устранение главной причины заболевания – дегенерации нигральных дофаминергических нейронов. Более того, длительное применение заместительной терапии приводит к развитию тяжелых побочных эффектов в виде дискинезии, флуктуации психических расстройств, вплоть до галлюцинаций. В связи с этим, является актуальным создание нейропротективных препаратов, способных остановить или снизить степень нейродегенерации нигральных нейронов и, тем самым, затормозить прогрессирование болезни Паркинсона. Следует также отметить, что большинство современных оригинальных препаратов для лечения БП

зарубежного происхождения, и существует недостаток доступных отечественных фармакологических средств.

В России и за рубежом в качестве средства лечения БП исследуются и используются производные адамантана, в частности, мидантан (Blanchet P.J. et al., 1998; Caumont A.S. et al., 2006; Danysz W. et al., 1997; Карабань И.Н., 2018). В ФГБНУ «НИИ Фармакологии им В.И. Закусова» был разработан препарат гимантан (производное адамантана) (Патент РФ 2423981, Публикация: Бюл. №20; 20.07.2011 г.). Установлено, что гимантан в эксперименте обладает способностью ослаблять показатели двигательной активности, в том числе на субхронической модели МФТП на мышах и модели с использованием 6-ГОДА на крысах (Вальдман Е.А. и др., 1999; Вальдман Е.А. и др., 2004; Иванова Е.А. и др., 2015). В исследованиях на животных показано, что гимантан обладает свойствами низкоаффинного неконкурентного блокатора ионного канала глутаматных NMDA рецепторов, а также (в дозе 20 мг/кг) повышает уровень внеклеточного дофамина и снижает содержание метаболитов дофамина в стриатуме крыс (Абаимов Д.А., 2007). Установлено также, что в концентрации 10^{-5} М гимантан обладает свойствами обратимого ингибитора MAO-B (Воронина Т.А. и др., 2001; Вальдман Е.А. и др., 2003). В ряде экспериментов продемонстрированы антидепрессивное, иммуномодулирующее (Нежинская Г.И. и др., 2003) и противовоспалительное действие гимантана (Иванова Е.А. и др., 2013). Вместе с тем, для расширения и углубления представлений об особенностях эффектов и патогенетических механизмах нейропротекторного, противопаркинсонического, действия адамантанов и, в частности, гимантана, необходимо исследование его различных нейрохимических эффектов непосредственно на моделях паркинсонического синдрома (ПС), на ранней и поздней стадиях развития синдрома.

В связи с вышеизложенным была выполнена настоящая работа, посвященная изучению патогенетических механизмов развития ПС на ранней и поздней стадиях его развития, и исследованию механизмов нейропротекторного и противопаркинсонического действия адамантанов, и, в частности, гимантана, в том числе его способности уменьшать гибель дофаминергических клеток черной субстанции на ранней и поздней стадиях развития ПС.

Цель работы

Целью диссертационной работы является изучение механизмов нейропротективного действия производных адамантана на основе полученных данных о патогенезе паркинсонического синдрома на разных стадиях его развития.

Задачи исследования

1. Провести сравнительное изучение влияния производных адамантана на выраженность паркинсонической симптоматики у мышей C57Bl/6J на ранней и поздней стадиях МФТП-индуцированного ПС.
2. Провести сравнительное изучение влияния производных адамантана на уровень дофамина (ДА) и его метаболитов диоксифенилуксусной кислоты (ДОФУК) и гомованилиновой кислоты (ГВК) в стриатуме головного мозга мышей C57Bl/6J на разных стадиях МФТП-индуцированного ПС.
3. Провести оценку степени нейрональной гибели тирозингидроксилазы-положительных нейронов (ТГ+) в черной субстанции мозга мышей линии C57Bl/6J на разных стадиях МФТП-индуцированного ПС и оценить нейропротекторное действие гимантана.
4. Изучить изменение уровня общего окислительного статуса, антиоксидантного статуса и индекса окислительного стресса у мышей на разных стадиях развития ПС и влияние на эти показатели гимантана.
5. Исследовать цитокиновый профиль (IL-1 β , IL-6, интерферон- γ , ФНО- α) у мышей на разных стадиях развития ПС и эффекты гимантана на эти показатели.
6. Исследовать нарушения биоэлектрической активности в различных структурах мозга мышей на разных стадиях ПС и способность гимантана предупреждать эти нарушения.
7. Изучить особенности нарушения кальциевого гомеостаза и влияние гимантана на это звено патогенеза.

Научная новизна исследования

Впервые при исследовании влияния гимантанана на степень гибели ТГ+ - нейронов черной субстанции (ЧС) на ранней и поздней стадиях экспериментального ПС продемонстрирован его защитный эффект в отношении ДА-ергических нейронов.

Впервые путем анализа уровня провоспалительных цитокинов непосредственно в нигростриатном комплексе исследовано влияние гимантана на процесс нейровоспаления на ранней и поздней стадиях ПС и доказаны иммуномодулирующие эффекты гимантана, направленные на уменьшение выраженности воспаления в зоне ЧС. Впервые изучено влияние гимантана на уровень общего окислительного статуса, общего антиоксидантного статуса и индекса общего окислительного статуса в ниграстриатном комплексе на ранней стадии ПС и показана его способность усиливать мощность антиоксидантных систем и уменьшать выраженность окислительного стресса в ЧС. Впервые при использовании кальциевого имиджинга детально изучен механизм блокады гимантаном NMDA-рецепторов и показано, что препарат вызывает блокаду

патологических токов Ca^{2+} в ответ на эксайтотоксический эффект глутамата, и сохраняется физиологическая способность нейронов к передаче сигнала. В ЭЭГ-исследованиях показано, что гимантан как на ранней, так и на поздней стадиях ПС, ослабляет в структурах мозга рост амплитуд групп волн, нормализует тета-активность, снижает патологическое замедление и дизрегуляторную активность в диапазонах бета- и дельта волн в ЧС.

Теоретическая и практическая значимость работы

Теоретическая значимость работы заключается в расширении и углублении представлений о механизме нейропротективного и антипаркинсонического действия производных адамантана и, в частности, гимантана, на разных стадиях развития ПС. Полученные данные о том, что гимантан тормозит развитие симптомов на ранней стадии развития ПС и уменьшает выраженность паркинсонической симптоматики на поздней стадии развития ПС, расширяет и уточняет возможности его клинического применения у больных БП.

Результаты исследования показывают, что производные адамантана являются перспективным классом химических соединений для поиска среди них веществ с нейропротекторным действием и имеют научно-практическую значимость при разработке новых препаратов для лечения нейродегенеративных заболеваний, в частности, БП.

Положения, выносимые на защиту

1. Выраженность паркинсонической симптоматики и снижение уровня дофамина и его метаболитов усиливается на поздней стадии в сравнении с ранней клинической стадией МФТП-индуцированного ПС.
2. Гимантан в сравнении с мидантаном при предварительном применении более эффективно предупреждает развитие паркинсонической симптоматики, снижение уровня дофамина и его метаболитов ДОФУК и ГВК в стриатуме мозга мышей; эффекты препаратов более выражены на ранней, чем на поздней клинической стадии МФТП-индуцированного ПС.
3. Гимантан снижает степень дегенерации нигральных нейронов на ранней клинической стадии МФТП-индуцированного ПС, проявляя нейропротекторное действие.
4. Антипаркинсонический эффект гимантана на ранней клинической стадии ПС обусловлен его способностью снижать степень образования провоспалительных цитокинов, уровень окислительного стресса, повышать мощность антиоксидантной системы в нигрокаудатном комплексе и блокировать NMDA-глутаматные каналы, уменьшая чрезмерное поступление ионов Ca^{2+} и Na^{+} в нейроны.

Апробация работы

Основные результаты диссертационной работы были представлены на XXVI Российском национальном конгрессе «Человек и лекарство» (Москва, 2019), II Объединенном научном форуме / VI Съезд Физиологов СНГ / VI Съезд Биохимиков России / IX Российский Симпозиум «Белки и Пептиды» (1-6 октября 2019, Сочи – Дагомыс), Конгрессе «Нейронаука для медицины и психологии» (Судак, 6-16 октября 2020 г.), Международной конференции «Рецепторы и внутриклеточная сигнализация» (Пушино, 24-28 мая 2021 г.).

Публикации результатов исследования

По теме диссертации опубликовано 5 статей в рецензируемых научных изданиях (по специальности 3.3.3 – патологическая физиология) и приравненных к ним публикаций, в том числе 2 статьи с переводной на английский язык версией, и 4 тезисов в сборниках докладов научных конференций и конгрессов.

Объем и структура работы

Диссертационная работа содержит: введение, обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты собственных исследований и их обсуждение, заключение, выводы и список литературы, включающий работы на русском (48) и иностранном (348) языках. Диссертация изложена на 192 страницах машинописного текста и содержит 7 таблиц и 43 рисунка.

Личный вклад автора

Разработка основной научной идеи и планирование диссертационного исследования выполнено при непосредственном активном участии автора. Все ключевые эксперименты выполнены автором лично. Часть вошедших в диссертационную работу данных получена в соавторстве с другими исследователями при участии автора. Автором самостоятельно проведен анализ результатов, выполнена их статистическая обработка и интерпретация. Выводы на основе полученных результатов сформулированы автором самостоятельно. Основные публикации написаны автором самостоятельно по результатам выполненной работы.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Животные

Исследование проводилось на лабораторных мышах линии C57BL/6J, полученных из питомника «Пушино». Возраст животных составлял во всех группах от 5 до 7 месяцев, с массой тела 26-30 г. Группы делились по 10-12 особей в каждой группе, включая группу контроля. Также в ходе проведения

всей работы соблюдались требования международных и Российских нормативно-правовых документов: Приказ Минздравсоцразвития РФ №708н от 23 августа 2010 г. «Об утверждении правил лабораторной практики» и Директива 2010/63/EU Европейского Парламента и Совета Европейского Союза от 22 сентября 2010 года по охране животных, используемых в научных целях. Общее количество животных, использованное в работе, составило 350 мышей. Проведение опытов одобрено Комиссией по биомедицинской этике ФГБНУ «НИИОПП» и ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова.

Моделирование паркинсонического синдрома и проведение поведенческих тестов

Для моделирования ПС мышам линии C57BL/6J вводили нейротоксин 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридин (МФТП, внутривенно, однократно или многократно). В контроле вводили физ.раствор (0,9% NaCl).

Для моделирования разных стадий развития ПС использовали схемы, предложенные М.В.Угрюмовым (Ugrumov M.V. et al., 2011): раннюю симптомную стадию ПС моделировали введением МФТП в дозе 12 мг/кг, 4 раза с интервалом в 2 часа, а позднюю, развернутую симптомную стадию развития ПС – введением МФТП в дозе 20 мг/кг, 4 раза с интервалом в 2 часа. Показано (Хаиндрава В.Г. и др., 2010), что при моделировании ранней стадии ПС у мышей в стриатуме выявляется падение содержания ДА ниже порогового уровня (80 %), что наблюдается и у пациентов с первыми признаками БП (Хаиндрава В.Г. и др., 2010). Поздняя, «развернутая» стадия ПС отражает классическую модель ПС, имитирующую выраженную позднюю клиническую стадию БП (Jackson-Lewis V. et al., 1995).

Для оценки выраженности симптоматики ПС (олигокинезии и мышечной ригидности) использовали традиционные базисные тесты: «открытое поле», «вращающийся стержень», «вертикальный стержень», а также оценку ригидности проводили по изменению длины шага (Stride Length Test) (Tillerson J.L. et al., 2002) и по симптому «горбатости» (оценка в баллах). В тесте «открытое поле» (установка «Columbus instruments», США) использовали программу «Auto-Track» и в течение 6 мин измеряли пройденный мышью путь, время без движений и число вертикальных стоек (Kryzhanovsky G.N. et al. 1997). Тест проводили спустя 1 и 14 суток после введения МФТП.

Для регистрации мышечной ригидности, а также других нарушений поддержания позы и двигательной активности проводили тест «Вращающийся стержень» на аппарате RotaRod для мышей (Ugo Basile, Italy), где регистрировали время, проведенное мышами на вращающемся стержне и тест «Вертикальный стержень» (Pole Test), в котором регистрировали время спуска животного с вертикального стержня.

Культуры клеток

Для приготовления первичных культур нейронов использовались клетки коры головного мозга новорожденных (1 день) крыс породы Вистар. Ткань коры головного мозга покрывали папаином, центрифугировали, сажали на стекла. Для лучшей адгезии стекла покрывали заблаговременно полиэтиленгликолем (1 мг/мл, 30 мин). Чашки с клетками содержали в термостате с заданной температурой 37°C и содержанием CO₂ 5% в условиях 100% влажности.

Оценка кальциевого гомеостаза в культуре нейронов головного мозга

Изучение кальциевого гомеостаза методом кальциевого имиджинга производилось под руководством д.б.н. А.М.Сурина на базе лаборатории нейробиологии и фундаментальных основ развития мозга ФГАУ «НМИЦ здоровья детей». Для измерения концентрации внутриклеточного кальция в различных условиях эксперимента, заранее приготовленные клеточные культуры использовали спустя 12-15 дней от посадки. Наступление отсроченной кальциевой дисрегуляции (лаг-период ОКД) определяли как время второго максимума на графике первой производной сигнала X-rhod-FF (график зависимости $\Delta F/\Delta T$ от T, где F – интенсивность флуоресценции индикатора; T – время от момента добавки Δ – шаг дифференцирования, 10 с). Фиксацию флуоресцентных излучений индикаторов осуществляли благодаря инвертированному микроскопу Olympus IX-71 (Япония). Программа для регистрации, анализа, сохранения и переработки данных: MetaFluor и MetaFluor Analyst (Molecular Devices, USA). Флуоресцентные индикаторы Ca²⁺, Na⁺ и Rh123 были закуплены у Molecular Probes (Thermo Fisher, USA). Остальные реагенты были от «Sigma» (USA).

Оценка степени гибели дофаминергических нейронов в ЧС головного мозга

Морфологическое исследование, подготовка гистологических препаратов проводилось совместно с м.н.с. ФГБНУ ФГБНУ «НИИ общей патологии и патофизиологии» В.В.Голоборщевой.

С целью изготовления гистологических препаратов головного мозга у мышей через 14 дней после введения МФТП извлекали головной мозг и заключали его в гистологическую кассету. Для дегидратации препарата использовали раствор Карнуа, параформальдегид, фосфатно-солевой буфер (ФСБ), батарею спиртов. После препараты заключали в парафин на автоматизированной станции Leica EG1160 (Leica Biosystems, Германия). Срезы толщиной 8 мкм получали с помощью ротационного микротомы Leica RM2265. Для депарафинизации использовали раствор ксилола, батарею спиртов с убывающей концентрацией (100%, 95%, 50 % длительностью 10 мин, 5 и 5 мин,

соответственно). Затем препараты обрабатывали первичными поликлональными мышинными антителами к тирозингидроксилазе (ТГ) («Santa Cruz», США, 1:2000), вторичными лошадиными антителами (Vectastain ABC kit, Vector Laboratories, Великобритания) в растворе ФСБ-Т с разведением 1:1500, 1,5 часа.

Для визуализации ДА-нейронов в ЧС использовали 3,3-диаминобензидин («Sigma», США). Морфометрический анализ ДА нейронов проводился стереологически, определяя содержание тирозингидроксилазы-позитивных нейронов (ТГ+) во всей исследуемой анатомической структуре, локализацию которой проводили по атласу. Для подсчета каждый 5-й срез располагали на предметном стекле, всего 10 срезов толщиной 8 мкм на препарат. Для введения коррекционной поправки Аберкромби измеряли диаметр 30 нейронов, располагавшихся в каждой из исследуемых областей. Подсчитывали отдельно значения для правой и левой частей ЧС.

Определение содержания дофамина, его метаболитов и серотонина в стриатуме головного мозга

Этап проведения ВЭЖХ выполнен под руководством к.м.н. В.С.Кудрина на базе лаборатории нейрхимической фармакологии НИИ имени В.В.Закусова. Выделенные структуры стриатумов размельчали в гомогенизаторе стекло-тефлон (0,2 мм) в «холодной комнате» (+10°C). В среду добавлялся 100 нг/мл 3,4-диоксибензиламин (ДОБА), центрифугировали и фильтровали через устройства «Millipore» GS (Millipore, США) (0,22 мкм диаметром пор). Концентрацию моноаминов и их метаболитов определяли с помощью метода высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с электрохимической детекцией на хроматографе LC-304Т («BAS, WestLafayette», США) с инжектором Rheodyne 7125 (Kissinger P.T., 1981). Полученные данные выражали в нмоль вещества на 1 мг ткани.

Методы исследования общего окислительного статуса (ООС), общего антиоксидантного статуса (ОАС) и индекса окислительного статуса (ИОС)

Для определения уровня ООС, ОАС и ИОС комплексы ЧС и стриатума выделяли из мозга на охлажденной льдом поверхности, замораживали и хранили в жидком азоте. Далее перед исследованием образцы ткани превращали в суспензию в гомогенизирующей среде: 150 мМ NaCl, 3мМ ЭДТА, 10 мМ Трис – HCl, pH=7,3 в соотношении 1 мг ткани 9 мл среды.

ООС в нигростриатном комплексе определяли спектрофотометрическим методом (Erel O., 2005). К 675 мкл реактива-1 (150 мкМ ксиленолового оранжевого, 140 мМ NaCl и 1,35 М глицерина в 25 мМ растворе H₂SO₄, pH =1,75) добавляли 105 мкл гомогената нигростриатума, затем добавляли 33 мкл реактива-2 (5 мМ Fe(NH₄)₂(SO₄)₂ × 6H₂O и 10 мМ о-дианизидина, растворенных

в 25мМ растворе H_2SO_4). Оптическую плотность измеряли при длине волны 800 нм (фон) и спустя 4 мин после добавления реактива-2 при длине волны 560 нм на спектрофотометре Hitachi 320 (Япония). Калибровочную кривую строили с помощью H_2O_2 для определения ООС и выражали в микромолярном эквиваленте H_2O_2 на литр (мкмоль H_2O_2 Экв / л).

ОАС в нигростриатном комплексе определяли спектрофотометрическим методом (Egel O., 2004). К 600 мкл реактива-1 (о-дианизидин (10 мМ), ионы железа $(Fe(NH_4)_2(SO_4)_2 \times 6H_2O$ 45 мкМ) в растворе Кларка и Лубса (75 мМ, рН=1,8) добавляли 15 мкл гомогената нигростриатума и затем 30 мкл реактива-2 (7,5 мМ H_2O_2 в растворе Кларка и Лубса). Оптическую плотность измеряли при длине волны 444 нм спустя 4 мин после добавления реактива-2 на спектрофотометре Hitachi 320 (Япония). Калибровочную кривую строили с помощью антиоксиданта Trolox (6-гидрокси-2,5,7, 8-тетраметилхроман-2-карбоксилловой кислоты), водорастворимого аналога витамина Е. Результаты выражали в миллимолярных эквивалентах Trolox на литр (ммоль Trolox Экв/л).

ИОС рассчитывали, как отношение значений ООС и ОАС (Kumari S. et al., 2013; Verma A. K. et al., 2014). Все использованные реактивы произведены компанией «Sigma» (USA).

Исследование уровня провоспалительных цитокинов

Определение цитокинов в мозговой ткани проводилось совместно с в.н.с. лаборатории общей и перинатальной нейроиммунопатологии ФГБНУ «НИИ общей патологии и патофизиологии» к.м.н. Л.А.Ветрилэ.

После извлечения мозга выделяли нигрокаудатный комплекс, взвешивали и гомогенизировали материал в буфере для лизиса следующим составом: 150 мМ NaCl, 5 мМ ЭДТА, 50 мМ Tris, 1.0% NP-40 (IGEPAL CA-630, 0,5% дезоксихолат натрия, 0,1% SDS). После центрифугирования 10000g в течение 5 мин, супернатанты замораживали и хранили при температуре $-85^{\circ}C$. Содержание цитокинов в структурах мозга мышей определяли методом иммуноферментного анализа с использованием тест-систем производства «Cloud-Clone Corporation», США и считывающего устройства «ИФА-reader» «ImmunoChem-2100», США при длине волны 450 нм.

Исследование биоэлектрической активности мозга мышей

ЭЭГ-исследования выполнены на базе лаборатории психофармакологии ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В.Закусова» в соавторстве с к.б.н. И.Г.Капицей под руководством д.м.н., профессора Т.А.Ворониной. Для регистрации биоэлектрической активности мышам под хлоралгидратным наркозом вживляли долгосрочные электроды в структуры сенсомоторной коры, хвостатого ядра и черной субстанции по координатам стереотаксического атласа

(Franklin K.B.J., Paxinos G., 2001). Регистрация ЭЭГ проводилась через 14 дней после моделирования ПС, и не ранее чем через 3 суток после вживления электродов. ЭЭГ-регистрация проводилась в условиях свободного передвижения животных с использованием 21-го канального аппаратно-компьютерного комплекса «Нейро-КМ» (Статокин, Россия).

Производные адамантана

Препараты гимантан – (N-2-адамантил-гексаметиленимины гидрохлорид, синтезирован в ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В.Закусова») и амантадина гидрохлорид (мидантан, Борисовский ЗМП, Беларусь), указанный далее как мидантан, вводили мышам в дозе 20 мг/кг (внутрибрюшино) однократно или 4-кратно за 30 мин до каждого введения МФТП.

Статистический анализ данных

Статистический анализ результатов проводили с использованием компьютерной программы «STATISTICA 10.0». Для определения нормального характера распределения данных использовали тест Колмогорова-Смирнова; межгрупповые различия оценивали по однофакторному дисперсионному анализу One-Way ANOVA с пост-хок тестом Ньюмена-Куллиза (Newman-Keuls: N-K тест), или по непараметрическому критерию Kruskal-Wallis ANOVA с последующим анализом по тесту Манна-Уитни. Различия считали достоверными при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ.

Влияние производных адамантана на моторные проявления ПС на его ранней и поздней стадиях развития на модели с 4-х кратным введением МФТП мышам линии C57BL/6J

В тесте «открытое поле» четырехкратное введение МФТП в дозах 12 мг/кг и 20 мг/кг вызывало развитие существенных моторных нарушений в виде олигокинезии и мышечной ригидности, выраженность которых возрастала с увеличением дозы нейротоксина. Отмечалось статистически достоверное уменьшение длины пробега, числа вертикальных стоек и увеличение времени, проводимого мышами без движения (Табл. 1). На ранней стадии ПС, в сравнении с группой МФТП, гимантан (20 мг/кг) увеличивал горизонтальную активность мышей в 2,3 раза (мидантан – в 1,4 раза), число вертикальных стоек – в 3 раза (мидантан – в 1,4 раза) и уменьшал время без движения в 1,6 раза (мидантан – в 1,2 раза). На поздней «развернутой» стадии ПС гимантан увеличивал двигательную активность по сравнению с группой МФТП в 2 раза, а мидантан не оказывал влияния на этот показатель (Табл. 1).

Таблица 1: влияние гимантана (20 мг/кг) и мидантанана (20 мг/кг) на двигательные поведенческие проявления ПС на его ранней и поздней стадиях развития на модели с 4-кратным введением МФТП мышам линии C57BL/6J

Экспериментальные группы	Длина пробега, см	Число стоек	Время без движения, с
Гр.1. NaCl (Контроль)	1175 ± 60,3	15,1 ± 1,9	176,4 ± 12,4
Гр.2. МФТП 4 × 12 мг/кг (начальная стадия ПС)	305,4 ± 59,1**	3,9 ± 1,5**	285,6 ± 11,8**
Гр.3-1. МФТП 4 × 12 мг/кг + гимантан	698,6 ± 118,5 ⁺	11,7 ± 2,2 ⁺	181,7 ± 11,5 ⁺⁺
Гр.3-2. МФТП 4 × 12 мг/кг + мидантан	427,7 ± 79,3 [#]	5,6 ± 0,5 ^{+#}	238,3 ± 15,3 ^{+#}
Гр.4. МФТП 4 × 20 мг/кг	156,2 ± 112,1**	3,2 ± 2,1**	264,0 ± 51,4**
Гр.5-1. МФТП 4 × 20 мг/кг + гимантан	310,0 ± 96,7	2,0 ± 1,0	269,3 ± 33,2
Гр.5-2. МФТП 4 × 20 мг/кг + мидантан	157,1 ± 55,6	1,2 ± 0,4	294,0 ± 13,2

Статистическая значимость отличий (по One-Way ANOVA) обозначена: ** – при сравнении с Гр.1 ($p < 0,01$); + и ++ – при сравнении с гр. 2 ($p < 0,05$ и $p < 0,01$ соответственно); # – при сравнении с Гр.3-1 ($p < 0,05$).

В тесте «вращающийся стержень» на ранней стадии развития ПС (введение МФТП в дозе 12 мг/кг × 4 раза) наблюдалось снижение времени удерживания мышей на стержне в 2,3 раза по сравнению с контролем (физ. раствор), а на поздней стадии развития ПС (введение МФТП в дозе 20 мг/кг × 4 раза) этот показатель уменьшался в 8,2 раза (**Рис. 1**). Гимантан ослаблял проявления олигокинезии и ригидности в тесте «вращающийся стержень» как на ранней, так и на поздней стадиях развития ПС, что выражалось в увеличении времени удерживания на стержне на ранней стадии в 1,9 раза, а на поздней стадии – в 2,7 раза. Мидантан, как и в других тестах, оказывал меньший антипаркинсонический эффект в сравнении с гимантаном: на ранней стадии он увеличивал время удерживания только в 1,3 раза, а на поздней стадии эффект был статистически незначим (**Рис 1**).

Развитие олигокинезии и ригидности после введения МФТП наблюдалось и в других тестах. Так, время спуска животных в тесте «вертикальный стержень» при введении МФТП в дозе 20 мг/кг × 4 раза увеличивалось с 2,8 ± 0,5 с (контроль с физ. раствором) до 11,2 ± 2,4 с ($p < 0,01$). Отмечалось также снижение длины шага мышей с 6,7 ± 0,1 см до 5,0 ± 0,1 см у животных с ПС ($p < 0,01$). Выраженность

ригидности (показатель «горбатости») у мышей с начальной стадией ПС (МФТП 12 мг/кг × 4) составляла 1,5±0,1 балла, а на поздней стадии ПС – 2,1±0,1 балла. Гимантан восстанавливал до показателей нормы длину шага (6,6±0,3 см), а мидантан не влиял на этот показатель.

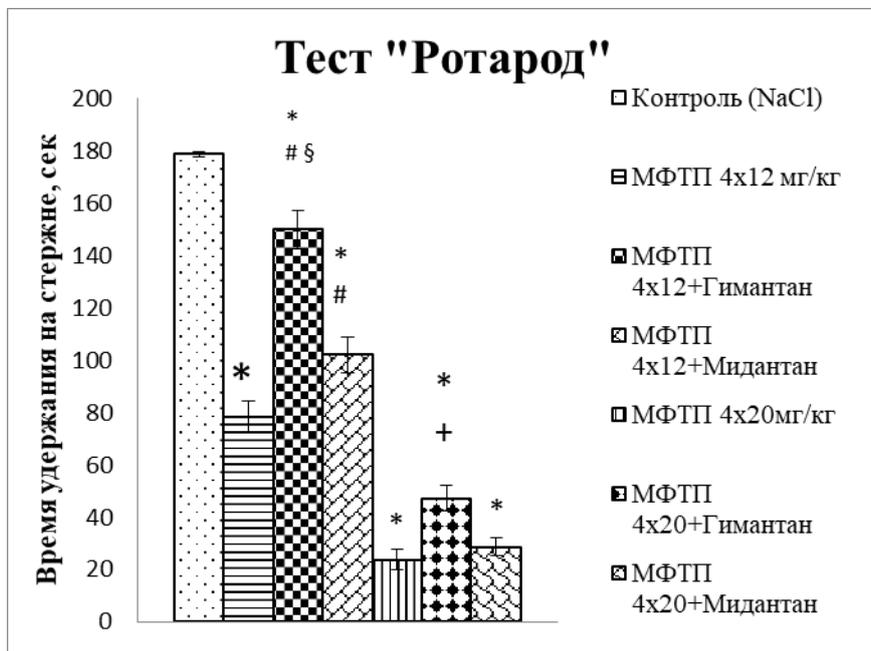


Рис. 1. Влияние гимантана и мидантана на время удерживания мышей на вращающемся стержне на ранней и поздней стадиях МФТП-индуцированного ПС (Тест «Ротарод»). Примечание: * – $p < 0,05$ в сравнении с гр. контрольных животных; # – $p < 0,05$ с группой МФТП 4 × 12 мг/кг; + – $p < 0,05$ с группой МФТП 4 × 20 мг/кг; § – $p < 0,05$ с группой МФТП 4 × 20 мг/кг + мидантан.

Таким образом, производные адамантана: гимантан (20 мг/кг) и мидантан (20 мг/кг) оказывают выраженное антипаркинсоническое действие как на ранней, так и на поздней стадиях развития ПС, ослабляя проявления олигокинезии и мышечной ригидности в различных тестах, при этом гимантан во всех тестах проявляет большую эффективность, чем мидантан.

Сравнительное изучение влияния производных адамантана при предварительном применении на уровень моноаминов в стриатуме мышей на ранней и поздней стадии ПС, вызванного многократным введением МФТП

Результаты влияния гимантана и мидантана при предварительном применении (20 мг/кг) на уровень моноаминов в стриатуме мышей на ранней и поздней клинической стадией ПС, вызванного многократным введением МФТП представлены в **Табл. 2.**

На ранней клинической стадии ПС многократное введение МФТП в дозе 12 мг/кг × 4 раза приводило в стриатуме мышей к снижению уровня ДА на 84%, ДОФУК на 40%, ГВК на 66%, НА на 67% и серотонина на 74%. На этой стадии ПС отмечается также рост оборота дофамина ДОФУК/ДА и ГВК/ДА.

Таблица 2: влияние производных адамантана при предварительном применении на уровень моноаминов в стриатуме мозга мышей на ранней и поздней клинической стадиях ПС, вызванного многократным введением МФТП.

Экспериментальные группы	Дофамин, нмоль/мг ткани	ДОФУК, нмоль/мг ткани	ГБК, нмоль/мг ткани	ДОФУК/ДА	ГБК/ДА	НА, нмоль/мг ткани	5-НТ, нмоль/мг ткани
Контроль (NaCl)	14,49±2,39	0,86±0,14	2,23±0,3	0,12±0,03	0,42±0,1	2,86±0,39	23,0±0,3
МФТП 4 × 12 мг/кг	2,41±0,63*	0,52±0,15	1,0±0,21*	0,64±0,45*	1,9±0,8*	0,95±0,36*	6,0±0,68*
МФТП 4 × 12+Гим	9,58±2,05#	1,08±0,21#	4,57±1,32#	0,14±0,05#	1,15±0,44	3,4±0,65#	8,0±0,6
МФТП 4 × 12+Ам	0,89±0,29	0,09±0,04	1,32±0,46	0,1±0,05	1,69±0,44	0,47±0,12	5,0±0,08
МФТП 4 × 20мг/кг	0,4±0,11*	0,09±0,02*	0,7±0,23*	0,35±0,11	3,26±1,6*	0,46±0,13*	6,0±0,2*
МФТП 4 × 20+Гим	0,82±0,48	0,57±0,24	0,57±0,25	0,55±0,42	1,07±0,14	0,66±0,28	3,0±0,23
МФТП 4 × 20+Ам	0,55±0,06	0,22±0,12	0,75±0,27	0,62±0,4	1,78±0,65	0,36±0,02	3,0±0,04

Примечание: * – $p < 0,05$ в сравнении с группой контрольных животных; # – $p < 0,05$ в сравнении с группой МФТП 4 × 12 мг/кг.

Предварительное применение гимантана, в отличие от мидантана, повышало уровень ДА до 66% от контрольных значений, а также увеличивало содержание ДОФУК, ГВК, НА в 2, 4 и 6 раз, соответственно. Повышение уровня метаболитов ДА, по-видимому, свидетельствует об усилении метаболизма этого катехоламина.

На поздней стадии ПС, вызванной многократным введением МФТП в дозе 20 мг/кг × 4 раза, наблюдалось снижение уровня ДА на 95%, ДОФУК – на 90%, ГВК – на 69%, НА – на 84% в стриатуме мышей (**Табл. 2**).

На этой клинической стадии ПС предварительное применение гимантана и мидантана не влияло на содержание моноаминов и их метаболитов в стриатуме животных.

Таким образом, предварительное введение гимантана в сравнении с мидантаном более эффективно предупреждало резкое снижение уровня ДА и его метаболитов в стриатуме мышей на ранней симптомной стадии и не оказывало влияние на поздней клинической стадии ПС.

Морфометрический анализ дофаминергических нейронов ЧС

Проведение иммуногистохимического окрашивания на тирозингидроксилазу (ТГ) и дальнейший количественный анализ нейронов показал в группе контроля (Гр. 1) наибольшее число нейронов ЧС 6862 ± 1012 среди всех групп. Нейроны, подверженные окраске ТГ, считались дофаминергическими (ТГ+). Внутривентрикулярное введение МФТП вызывает потерю ТГ+ нейронов в ЧС у мышей, количественно прямо коррелирующую с дозой нейротоксина. На ранней стадии ПС, вызванной введением МФТП в дозе 12 мг/кг × 4 количество ТГ+ нейронов в ЧС снижается от контроля до 67% ($p < 0,05$), а на поздней стадии, вызванной введением МФТП в дозе 20 мг/кг, 4 раза, до 86% ($p < 0,05$). Гимантан в дозе 20 мг/кг способствовал сохранению значительного количества ДА-нейронов при моделировании ранней стадии ПС (77% от контроля), что свидетельствует, что этот препарат обладает нейропротекторным свойством. На поздней стадии ПС введение гимантана не оказало сравнительного эффекта на выживание нейронов ЧС (**Рис. 2**). При моделировании поздней стадии ПС гимантан не столь эффективен и сохраняет лишь ~27% нейронов ЧС от контроля, что недостаточно для поддержания полноценной работы дофаминергической системы базальных ганглиев и, вероятно, не оказывает существенного положительного эффекта на выраженность ПС. Так, нами обнаружено почти двухкратное увеличение потери нейронов при повышении дозы МФТП с 12 мг/кг × 4 до 20 мг/кг × 4, что в целом согласуется с исследованиями других авторов (Laloux C. et al., 2008).

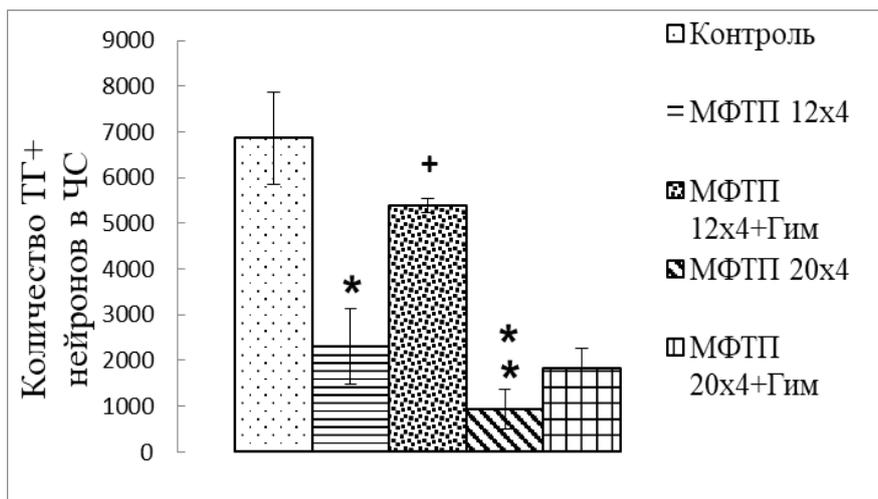


Рис. 2. Число выживших (ТГ+) нейронов в черной субстанции на ранней и поздней клинической стадиях паркинсонического синдрома у мышей С57BL/6J с поправкой на диаметры ядер по формуле Аберкромби. Примечание: * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$ в сравнении с гр. контроля; + – $p < 0,05$ в сравнении с гр. МФТП 12 × 4.

Изучение уровня провоспалительных цитокинов на ранней и поздней клинической стадиях паркинсонического синдрома. Воздействие гимантана

Как на ранней, так и на поздней стадиях ПС было обнаружено увеличение уровня ИЛ-1β, ИЛ-6, Ин-γ и ФНО-α в nigrocaudate complex мышей по сравнению с контролем.

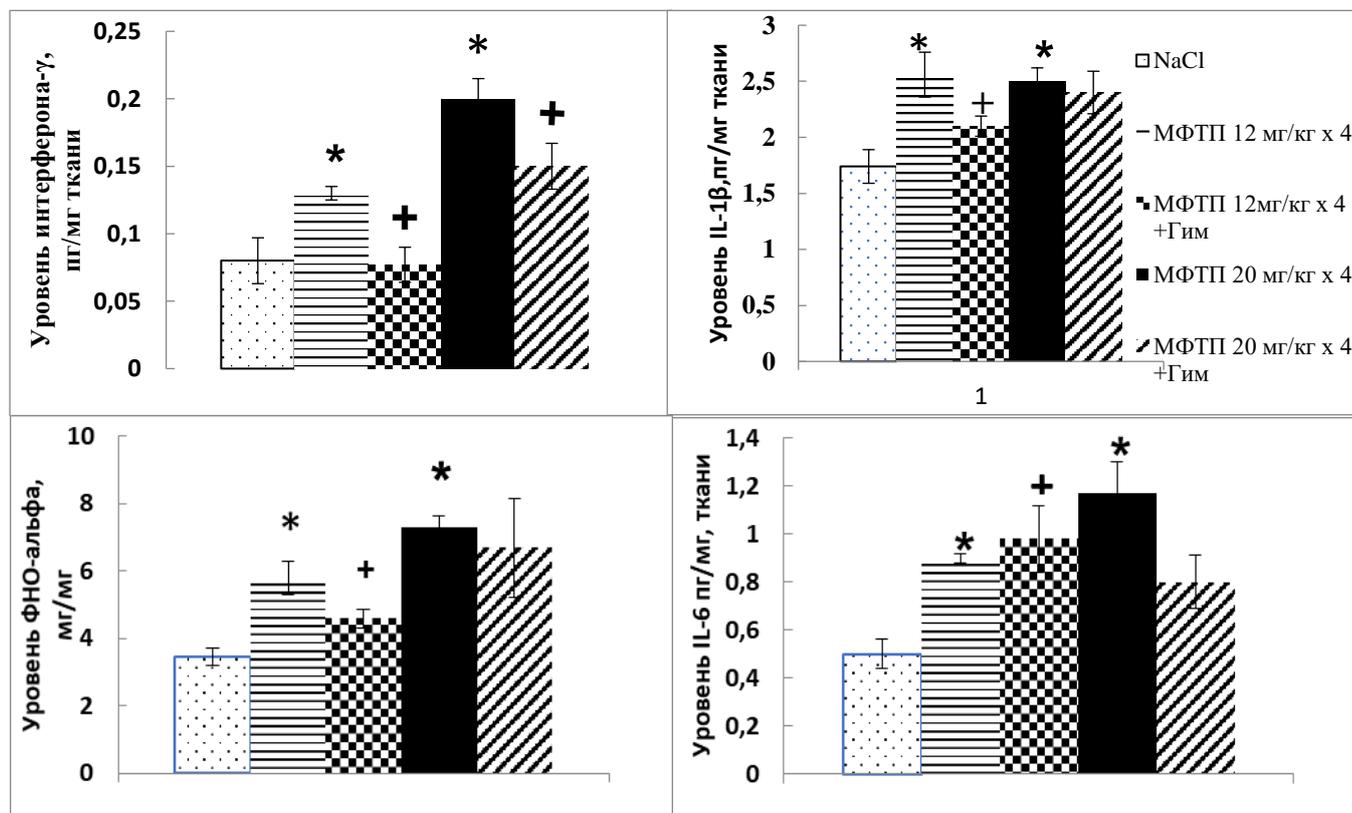


Рис. 3. Уровень интерферона-γ, ИЛ-1β, ФНО-α, ИЛ-6 в nigrocaudate complex мышей на ранней и поздней клинической стадиях ПС.

Уровни провоспалительных цитокинов, измеренных у мышей с ПС в nigrocaudate complex, в ответ на введение гимантана также претерпели изменения в сравнении с группой мышей, которым не вводили препарат. Так, отмечено достоверное уменьшение уровня IL-1 β , интерферона- γ , ФНО- α на ранней стадии ПС, и снижение только уровня IL-6 на поздней стадии. Поскольку поддержание нейровоспаления в ЧС при БП осуществляется, в том числе, благодаря активации микроглии и циркуляции провоспалительных цитокинов IL-1 β , интерферон- γ , ФНО- α , IL-6, а уменьшение количества указанных цитокинов сопряжено с уменьшением степени нейродегенерации в зоне ЧС (McCoу M.K., et al., 2008), следовательно данный эффект гимантананужно трактовать как противовоспалительный и направленный на нейропротекцию DA-ергических нейронов в ЧС (Рис. 3).

Изучение уровня общего окислительного статуса, общего антиоксидантного статуса и индекса общего окислительного статуса на ранней и поздней клинической стадии ПС. Воздействие гимантана

Результаты по измерению ООС, ОАС в nigrocaudate complex мышей контрольной группы и мышей, которым вводили МФТП в дозе 4 \times 12 мг/кг МФТП и 4 \times 20 мг/кг МФТП, представлены на Рис. 4. Выявлено повышение уровня общего окислительного статуса и индекса окислительного стресса и снижение уровня общего антиоксидантного статуса в nigrocaudate complex мышей, как на ранней стадии, так и более выражено на поздней стадии развития ПС.

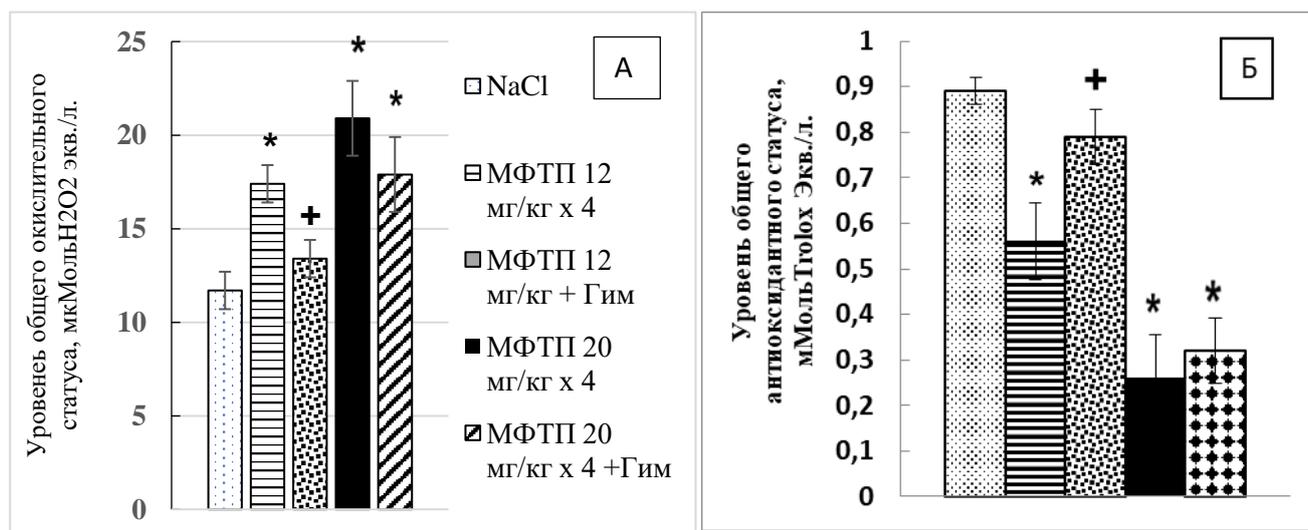


Рис. 4. Влияние гимантана на уровень общего окислительного статуса (А) и общего антиоксидантного статуса (Б) в nigrostriatal complex группы мышей C57BL/6J на разных клинических стадиях паркинсонического синдрома. Примечание: * – $p < 0,05$ в сравнении с группой NaCl; + – $p < 0,05$ в сравнении с группой «4 \times 12 МФТП».

Гимантан предотвращал повышение уровня ООС и ИОС и снижение уровня ОАС только на ранней стадии развития ПС.

Влияние гимантана на биоэлектрическую активность мозга на ранней и поздней стадиях развития паркинсонического синдрома, вызванного введением МФТП

Ранее было показано, что однократное внутрибрюшинное введение МФТП (30 мг/кг) мышам C57BL/6J вызывает уменьшение тета1 активности и рост бета активности в диапазоне 15–30 Гц, которое наблюдается уже через 10 мин после введения нейротоксина и сохраняется длительное время (Капица И.Г. и др., 2013). В настоящем исследовании показано, что МФТП при 4-кратном введении вызывает изменение биоэлектрической активности (БЭА) в структурах мозга как на ранней, так и на поздней стадиях развития ПС, с большей выраженностью на поздней стадии ПС. МФТП (20 мг/кг × 4) усиливал БЭА в диапазоне дельта и бета2 волн в различных структурах мозга, в том числе в ЧС.

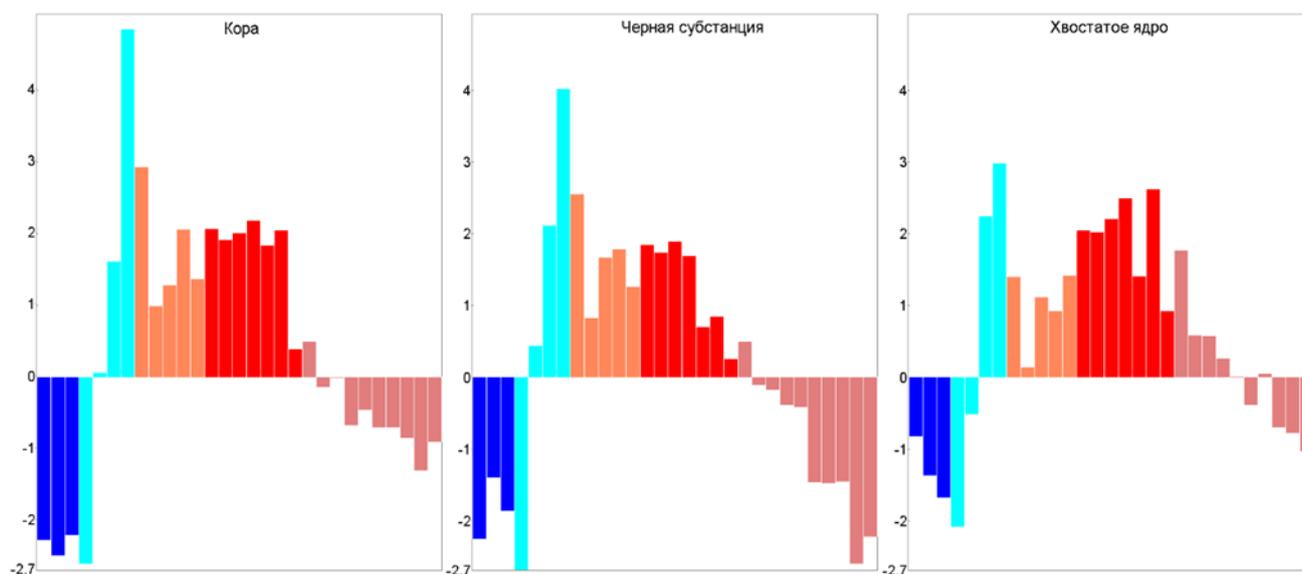


Рис. 5. Изменение автоспектров относительной мощности одного диапазона частоты в % от всего диапазона (сравнение по критерию Стьюдента двух групп ЭЭГ файлов N1-N2). Достоверность различий при $p < 0,05$ $t > 1,8$. По оси ординат – величина t Стьюдента со знаком (N1-N2), полученная при сравнение 2 независимых групп ЭЭГ-файлов мышей C57BL/6J, где N1 – выборка ЭЭГ-файлов группы «Гимантан + МФТП 20 мг/кг × 4», а N2 – группы «МФТП 20 × 4»; по оси абсцисс – диапазон волн биоэлектрической активности мозга с шагом 1 Гц; где ■ – дельта, ■ – тета1, ■ – тета2, ■ – бета1, ■ – бета2.

Гимантан (20 мг/кг × 4) в течение суток перед каждой инъекцией МФТП как на ранней, так и на поздней стадиях ПС восстанавливал нарушенную МФТП БЭА. Так, в группе «Гимантан + МФТП 20 мг/кг × 4» во всех анализируемых структурах мозга мышей отмечалось выраженное ослабление спектра мощности в диапазоне дельта волн и повышение активности в диапазонах тета и бета1 волн, наряду со снижением бета2 активности, наиболее выраженное в ЧС, по

сравнению с группой «МФТП 20 мг/кг × 4» (рис. 5). Полученные данные свидетельствуют о защитном действии гимантана на нарушенную при ПС БЭА мозга.

Таким образом, на ранней и поздней стадиях МФТП-индуцированного ПС в структурах мозга мышей выявлена дезрегуляционная активность, изменение спектров мощности ЭЭГ, повышение амплитуд волн. Гимантан как на ранней, так и на поздней стадиях ПС устраняет чрезмерный рост амплитуд всех групп волн, нормализует тета-активность, снижает патологическое замедление и дизрегуляционную активность в диапазонах бета- и дельта волн с превалированием в ЧС.

Кальциевый гомеостаз. Влияние гимантана на изменения внутриклеточной концентрации Ca^{2+} и Na^+ , вызванные активацией NMDA-каналов в культивируемых нейронах мозга крысы

Гимантан частично ингибирует изменения концентрации ионов Ca^{2+} [Ca^{2+}]_i и внутриклеточной концентрации Na^+ ($[Na^+]$ _i), вызванные NMDA. NMDA каналы хорошо проницаемы для ионов натрия. Мы сопоставили изменения [Ca^{2+}]_i и [Na^+]_i, вызванные одной NMDA и в присутствии гимантана. Ингибитор уменьшил долю нейронов, в которых произошла ОКД за время действия NMDA (рис. 6, А, В). Изучение кальциевого имиджинга на первичных нейрональных культурах показали, что блокирование канала NMDA-рецептора и последующее за этим снижение поступления Ca^{2+} в цитоплазму, уменьшение количества нейронов с ОКД обуславливает антиэксайтотоксический эффект гимантана в отношении действия глутамата, а быстрая обратимость ингибирования NMDA-каналов может благоприятствовать нормализации функционирования мозга после отмены применения гимантана.

Сохранение функциональной активности нейронов на фоне блокады NMDA-каналов выгодно отличает гимантана от неконкурентных ингибиторов (т.к. МК-801) и должно избавить от выраженных побочных эффектов применения препарата, связанных с блокадой NMDA-рецепторов (сонливость, галлюцинации и угнетение сознания вплоть до комы) (Olivares D. et al., 2012). Более эффективное блокирование гимантаном входа Ca^{2+} по сравнению с Na^+ будет сильнее ингибировать нейротоксическое воздействие Ca^{2+} , при этом в меньшей степени, снижая поступление Na^+ , его деполяризующий эффект на плазматическую мембрану и, соответственно, передачу электрического сигнала между нейронами.

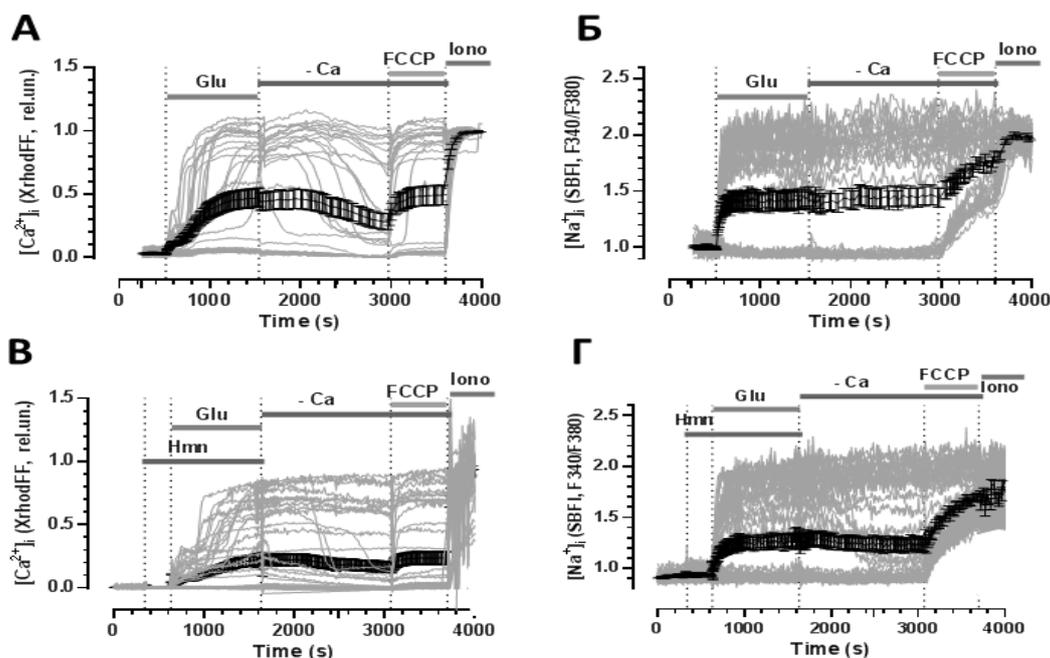


Рис. 6. Изменения внутриклеточной концентрации $[Ca^{2+}]_i$ и $[Na^+]_i$, вызванные добавлением NMDA и гимантана. Серыми линиями показаны графики $[Ca^{2+}]_i$ и $[Na^+]_i$ индивидуальных клеток, черными линиями – средние значения (\pm ошибка среднего). А,В– измерения $[Ca^{2+}]_i$ выполнены с помощью флуоресцентного Ca^{2+} -индикатора X-rhod-FF. Б,Г – изменения $[Na^+]_i$ представлены как отношения сигналов флуоресцентного Na^+ -индикатора SBFI, измеренных при возбуждении на 340 и 380 нм (F340/F380) и регистрации при 525 нм; значения F340/F380 нормированы относительно исходной величины в покое нейронах.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

С применением различных методик показан положительный эффект гимантана, на основные принципиальные звенья патогенеза ПС, такие как нейродегенерация, окислительный стресс, нейровоспаление, эксайтотоксичность глутамата и перегрузка клеток Ca^{2+} , что сочетается со способностью препарата ослаблять моторную симптоматику ПС в поведенческих тестах и ослаблять нарушения в биоэлектрической активности в структурах мозга. Нейропротективное и антипаркинсоническое действие гимантана в наибольшей степени проявляется на ранней клинической стадии ПС и по своей эффективности гимантан превосходит мидантан. Полученные результаты расширяют и уточняют возможности клинического применения адамантанов у больных БП, в частности, обосновывают включение гимантана в комплексную патогенетическую терапию БП на ранней стадии, что позволит затормозить степень дегенерации нигральных дофаминергических нейронов и прогрессирование заболевания.

ВЫВОДЫ

1. На модели паркинсонического синдрома (ПС), вызванного МФТП у мышей линии C57BL/6J, показано, что выраженность проявлений гипокинезии и ригидности (уменьшение горизонтальной и вертикальной двигательной активности, длины шага, нарушение моторной координации), возрастает на поздней клинической стадии ПС (МФТП 4×20 мг/кг, 4 раза) по сравнению с ранней стадией (МФТП 4×12 мг/кг, 4 раза). Гимантан уменьшает выраженность паркинсонической симптоматики на ранней стадии ПС и превосходит по эффективности мидантан.
2. Показано снижение уровня дофамина (ДА), его метаболитов (диоксифенилуксусной кислоты (ДОФУК) и гомованилиновой кислоты (ГВК), норадреналина, а также серотонина в стриатуме мозга мышей на ранней и, в большей степени, на поздней стадии развития МФТП-индуцированного ПС. На ранней клинической стадии гимантан предупреждает резкое снижение уровня ДА, ДОФУК, ГВК, норадреналина и повышение интенсивности метаболизма дофамина (ДОФУК/ДА), а на поздней стадии ПС снижает в стриатуме мышей только уровень ДОФУК.
3. Морфологические исследования показали, что число ДА тирозингидроксилазы-позитивных нейронов (ТГ+) в черной субстанции (ЧС) мозга мышей на ранней стадии ПС, вызванного МФТП, достоверно снижается. Гимантан оказывает нейропротекторное действие, предупреждая снижение числа ТГ+ нейронов в ЧС (сохранность 77%) на ранней клинической стадии ПС.
4. Показано, что как на ранней, так и на поздней стадиях развития ПС в nigrocaudate complex мозга мышей возрастает уровень цитокинов IL-1 β , IL-6, Интерферон- γ и ФНО- α . Гимантан на ранней стадии развития ПС снижает содержание цитокинов IL-1 β , Интерферон- γ и ФНО- α , а на поздней стадии ПС уменьшает содержание только IL-6.
5. Выявлено повышение уровня общего окислительного статуса (ООС) и индекса окислительного стресса (ИОС) и снижение уровня общего антиоксидантного статуса (ОАС) в nigrocaudate complex мышей, как на ранней стадии, так и более выражено на поздней стадии развития ПС. Гимантан предотвращает повышение уровня ООС и ИОС и снижение уровня ОАС только на ранней стадии развития ПС.
6. На ранней и поздней стадиях МФТП-индуцированного ПС в структурах мозга мышей выявлена дезрегуляторная активность, изменение спектров мощности ЭЭГ, повышение амплитуд волн. Гимантан как на ранней, так и на поздней стадиях ПС устраняет чрезмерный рост амплитуд всех групп волн, нормализует тета-активность, снижает патологическое замедление и дизрегуляторную активность в диапазонах бета и дельта волн, в том числе в ЧС.
7. На культуре нейронов, приготовленной из коры головного мозга показано, что гимантан проявляет нейропротекторные свойства, обладая

ингибирующим свойством NMDA-глутаматных рецепторов, препятствует росту $[Ca^{2+}]_i$ и $[Na^+]_i$ в клетку, отдалает развитие отсроченной кальциевой дизрегуляции, уменьшает деполяризацию митохондрий и способствует восстановлению исходных значений $[Ca^{2+}]_i$, $[Na^+]_i$ и $\Delta\Psi_m$ после прекращения действия NMDA.

СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ

Статьи в рецензируемых научных изданиях по специальности 3.3.3 – патологическая физиология, и приравненные к ним публикации

1. **Воронина Н.А.**, Кучеряну В.Г., Капица И.Г., Воронина Т.А. Эффекты производных адамантана на поведенческую активность мышей на разных стадиях экспериментального паркинсонического синдрома // Патогенез. – 2019. – Т.17, №.4. – С. 57-62. DOI: 10.25557/2310-0435.2019.04.57-62.
2. Кучеряну В.Г., Ветрилэ Л.А., Захарова И.А., **Воронина Н.А.** Антитела к глутамату при моделировании паркинсонического синдрома // Бюллетень биологии и медицины. -2020. – Том. 169. - №4.- С. 411-415. Переводная версия: Kucheryanu V.G., Vetrile L.A., Zakharova I.A., **Voronina N.A.** Effect of Anti-Glutamate Antibodies in Modeled Parkinsonian Syndrome // Bulletin of Experimental Biology and Medicine. – 2020. – Vol. 169 – P. 431-434. DOI: [10.1007/s10517-020-04902-w](https://doi.org/10.1007/s10517-020-04902-w)
3. **Воронина Н.А.**, Лисина О.Ю., Красильникова И.А., Кучеряну В.Г., Капица И.Г., Воронина Т. А., Сурин, А. М. Влияние гимантана на изменения Ca^{2+} и Na^+ , вызванные активацией NMDA-каналов в культивируемых нейронах мозга крысы // Нейрохимия. – 2021. – Т.38, №.1. – С. 3-13. Переводная версия: **Voronina N.A.**, Lisina O.Y., Krasilnikova I.A., Kucheryanu V.G., Kapitsa I.G., Voronina T.A., Surin A.M. Influence of hemantane on changes in Ca^{2+} and Na^+ caused by activation of NMDA channels in cultured rat brain neurons // Neurochemical Journal. – 2021. – Vol.15, N.1. – P. 8-17. DOI: 10.1134/S1819712421010165.
4. **Воронина Н.А.**, Кучеряну В.Г., Ветрилэ Л.А., Голоборщцева В.В., Капица И.Г., Воронина Т.А., Морозов С.Г. Изучение влияния гимантана на уровень провоспалительных цитокинов в нигрокудатном комплексе мозга мышей при экспериментальном паркинсонизме // Патогенез. – 2021. – Т.19, №.2. – С. 45-49. DOI: 10.25557/2310-0435.2021.02.45-49.
5. Голоборщцева В.В., **Воронина Н.А.**, Овчинников Р.К., Кучеряну В.Г., Морозов С.Г. Моделирование МФТП-индуцированного паркинсонизма на генетически модифицированных мышцах // Патогенез. – 2021. – Т.19, №.2. – С. 12-23. DOI: 10.25557/2310-0435.2021.02.12-23.

Тезисы докладов:

1. **Воронина Н.А.**, Кучеряну В.Г., Капица И.Г., Воронина Т.А. Изучение влияния производных адамантана на поведенческую активность мышей с разными стадиями экспериментального паркинсонизма // Тезисы докладов.

Сборник материалов XXVI Российского национального конгресса «Человек и лекарство». – М.: Видокс, 2019. – С. 146.

2. Кучеряну В.Г., Бочаров Е.В., **Воронина Н.А.**, Бочарова О.А. Использование нейропротекторов при паркинсонизме // II Объединенный научный форум / VI Съезд Физиологов СНГ / VI Съезд Биохимиков России / IX Российский Симпозиум «Белки и Пептиды» 1-6 октября 2019, Сочи – Дагомыс, Россия // Acta Naturae, – 2019. Т. 11, № S.1 – С. 35.
3. **Воронина Н.А.**, Лисина О.Ю., Красильникова И.А., Сурин А.М., Кучеряну В.Г., Капица И.Г., Воронина Т.А. «Влияние гимантана на изменения Ca^{2+} и Na^{+} , вызванные активацией NMDA-каналов в культивируемых нейронах мозга» // XVI Международный междисциплинарный конгресс «Нейронаука для медицины и психологии» (Судак, 6-16 октября 2020 год), Сборник трудов конгресса. – С. 134.
4. **Воронина Н.А.**, Лисина О.Ю., Красильникова И.А., Кучеряну В.Г., Капица И.Г., Воронина Т.А., Сурин А.М. Ингибирование гимантаном повышения внутриклеточных концентраций Ca^{2+} и Na^{+} при активации NMDA-каналов в культивируемых нейронах коры головного мозга крысы. // Международная конференция «рецепторы и внутриклеточная сигнализация» (Пушино, 24-28 мая 2021 г.), Сборник статей. – Т. 2. – С. 609-619.

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ

5-НТ – серотонин
6-ГОДА – 6-гидроксидофамин
L-ДОФА – L-3,4-дигидроксифенилаланин
МАО-В – моноаминоксидаза-В
NMDA – N-methyl-D-aspartate
 $\Delta\Psi_m$ – митохондриальный потенциал
БА – болезнь Альцгеймера
БП – болезнь Паркинсона
ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография
ГВК – гомованилиновая кислота
Гимантан – N-(2-адамантил)-гексаметиленмина гидрохлорид
ДА – дофамин
ДОБА – 3,4-диоксибензиламин
ДОФУК – диоксифенилуксусная кислота
Мемантин – 1-амино-3,5-диметиладамантан
МФТП – 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридин
НАДН-дегидрогеназы – никотинамидадениндинуклеотидфосфат-дегидрогеназы
НАДФН – никотинамид адениндинуклеотид-фосфат
ООС – общий окислительный статус
ОАС – общий антиоксидантный статус
ОКД – отсроченная кальциевая дизрегуляция (лаг-период)
СОД – супероксиддисмутаза
ТГ+ – тирозингидроксилазы-положительные нейроны
ФНО- α – фактор некроза опухоли- α
ФСБ – фосфатно-солевой буфер
ЧС – черная субстанция