

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

Диссертация на соискание учёной степени
кандидата медицинских наук

Научные руководители:

д.м.н., гл. научн. сотр.

Кучеряну Валериян Григорьевич

д.м.н., профессор, заслуженный деятель науки

Воронина Татьяна Александровна

г. Москва
2021

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	8
1. Актуальность и степень разработанности темы исследовани	8
2. Цель работы.....	11
3. Задачи исследования	11
4. Научная новизна, теоретическая и практическая значимость	12
5. Методология и методы исследования	13
6. Положения, выносимые на защиту	14
7. Личный вклад автора.....	14
8. Степень достоверности результатов	15
9. Основные положения диссертации доложены и обсуждены на:.....	15
ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	17
1. Болезнь Паркинсона. Общие сведения.....	17
2. Патогенез болезни Паркинсона. Механизмы гибели дофаминергических нейронов nigrostriатной системы при болезни Паркинсона	20
1.1. Окислительный стресс	20
1.2. Механизм эксайтотоксичности действия глутамата.....	29
1.2.1. Глутаматные рецепторы.....	29
1.2.2. Глутамат–индуцированные повреждения и гибель ДА-ергических нейронов при болезни Паркинсона.....	37
1.2.3. Нарушение кальциевого гомеостаза при паркинсонизме	40
1.2.4. Действие антагонистов NMDA-глутаматных рецепторов.....	46
1.3. Нейровоспаление. Изменение цитокинового статуса при болезни Паркинсона	50
2. Моделирование паркинсонического синдрома у грызунов	55
2.1. Моделирование паркинсонического синдрома с помощью пронейротоксина 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридина (МФТП) у мышей.	55
1.1.1. Механизм селективного токсического действия МФТП на ДА- ергические нейроны.....	57
2.1.2. Влияние МФТП на уровень глутамата.	60

2.2. Моделирование ранней и поздней фазы клинической формы болезни Паркинсона	61
1.2. Моделирование паркинсонического синдрома у крыс, вызванного интранигральным введением нейротоксина 1-метил-4-фенилпиридина в ионной форме (МФП ⁺).	65
3. Нейропротекция при болезни Паркинсона	66
3.1. Действие производных адамантана	66
3.2. Фармакологические эффекты гимантана	71
МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	76
1. Животные	76
2. Моделирование паркинсонического синдрома и проведение поведенческих тестов	76
3. Культуры клеток	78
4. Измерение влияния на кальциевый гомеостаз в культуре клеток	79
5. Гистологическое исследование	80
5.1 Приготовление препаратов	80
5.2. Иммуногистологическое окрашивание	81
5.3. Морфометрический анализ дофаминергических нейронов в ЧС	82
6. Исследование биоэлектрической активности мозга мышей (ЭЭГ-исследование)	83
7. Определение содержания дофамина, его метаболитов и серотонина в стриатуме головного мозга.	84
8. Методы исследования определения общего окислительного статуса, общего антиоксидантного статуса и индекса окислительного стресса	85
8.1. Определение общего окислительного статуса (ООС)	85
8.2. Определение общего антиоксидантного статуса (ОАС)	85
8.3. Определение индекса окислительного стресса (ИОС)	86
9. Исследование уровня провоспалительных цитокинов	86
10. Производные адамантана	87
11. Статистический анализ данных	87
РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	88
1 Проявления паркинсонического синдрома при однократном введении МФТП и влияние на них производных адамантана	90

1.1. Влияние производных адмантана на поведение мышей на ранней и поздней стадиях ПС при 4-х кратном введении МФТП.....	95
2. Сравнительное изучение влияния производных адамантана при предварительном применении на уровень дофамина и его метаболитов ДОФУК и ГВК в стриатуме мышей на ранней и поздней клинической фазе ПС.	103
2.1. Исследование влияние производных адамантана на уровень дофамина и его метаболитов после однократного введения МФТП.	103
2.2. Сравнительное изучение влияния производных адамантана при предварительном применении на моноаминов в стриатуме мышей на ранней и поздней клинической фазе ПС, вызванного многократным введением МФТП.....	106
3. Морфометрический анализ дофаминергических нейронов ЧС.....	108
4. Изучение уровня провоспалительных цитокинов на ранней и поздней клинической стадии паркинсонического синдрома. Воздействие гимантана	114
5. Изучение уровня общего окислительного статуса, общего антиоксидантного статуса и индекса общего окислительного статуса на ранней и поздней клинической стадии ПС. Воздействие гимантана	119
6. Биоэлектрическая активность мозга на фоне введения гимантана у мышей с экспериментальном паркинсоническим синдромом.....	125
7. Кальциевый гомеостаз. Влияние гимантана на изменения Ca^{2+} и Na^{+} , вызванные активацией NMDA-каналов в культивируемых нейронах мозга крысы.....	142
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	157
ВЫВОДЫ.....	161
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	164

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

БП	-	болезнь Паркинсона
БА	-	болезнь Альцгеймера
L-ДОФА	-	L-3,4-дигидроксифенилаланин
NMDA	-	N-methyl-D-aspartate
6-ГОДА	-	6-гидроксидофамин
ЧС	-	черная субстанция
ПС	-	паркинсонический синдром
МФТП	-	1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридин
ДА	-	дофамин
ДОФУК	-	диоксифенилуксусная кислота
ГВК	-	гомованилиновая кислота
МФП ⁺	-	1-метил-4-фенил пиридиный
СОД	-	супероксиддисмутаза
ТН ⁺	-	тирозингидроксилазы-положительные нейроны
ЭЭГ	-	электроэнцефалография
ВЭЖХ	-	высокоэффективная жидкостная хроматография
ВАК	-	высшая аттестационная комиссия
ОС	-	окислительный стресс
АФК	-	активные формы кислорода
НО [•]	-	гидроксильный радикал
H ₂ O ₂	-	перекись водорода
O ²⁻	-	супероксидный анион
ДНК	-	дезоксирибонуклеиновая кислота
РНК	-	рибонуклеиновая кислота
ЦПЭ	-	цепь переноса электронов
ПОЛ	-	перекисное окисление липидов
ГМ	-	головной мозг
αSYN	-	альфа-синуклеин

ЧСк - компактная часть черной субстанции
 Cav_{1.3} - кальциевые каналы L типа
 АТФ - аденозинтрифосфат
 мтДНК - матричная ДНК
 НАДН-дегидрогеназа - никотинамидадениндинуклеотидфосфат-дегидрогеназа
 НАДФН - никотинамид адениндинуклеотид-фосфат
 МАО-В - моноаминоксидаза-В
 VMAT2 - везикулярный транспортер моноаминов 2
 Fe³⁺ и Fe²⁺ - ионы железа
 CoQ10 - коэнзима Q10
 МДА - малоновый диальдегид
 БХ - болезнь Хантингтона
 БАС - боковой амиотрофический склероз
 АМРА - 2-амино-3-гидрокси-5-метил-4-изоксазолпропионовая кислота
 KAR - каинатные рецепторы
 iGluR - глутаматные рецепторы ионотропные
 mGluR - глутаматные метаботропные рецепторы
 ГАМК - гамма-аминомасляная кислота
 EAATs - переносчики возбуждающих аминокислот
 ONOO⁻ - пероксинитрит
 MAPK p38 - митоген-активируемой протеинкиназы p38
 CREB - белок, связывающий цАМФ
 α-CaMKII - α-кальций-кальмодулин-зависимая протеинкиназа II
 VPA - вальпроевая кислота
 HDAC - ингибитор гистондеацетилазы
 TRPC1 - транзиентный рецепторный потенциал
 ППП - пора с переходной проницаемостью
 ЭР - эндоплазматический ретикулум
 МАМ - митохондриально-ассоциированными мембранами

БДР - большое депрессивное расстройство
ЛИД - леводопа-индуцированная дискинезия
ПЭТ - позитронно-эмиссионная томография
TNFR-2 - рецептор-2 фактора некроза тканей
ФНО- α - фактор некроза опухоли- α
ГЭБ - гематоэнцефалический барьер
ВОП - вентральная область покрышки
ПГЕ2 - простагландин E2
iNOS - оксида азота синтаза
ПА - пароксизмальная активность
Амантадин - 1-аминоадамантан
Мемантин - 1-амино-3,5-диметиладамантан
Гимантан - N-(2-адамантил)-гексаметиленимины гидрохлорид
ЛПС - липополисахарид
GDNF - глиальный нейротрофический фактор
BDNF - мозговой нейротрофический фактор
ПЦР - полимеразная цепная реакция
5-ГИУК - гидроксииндолуксусная кислота
МХП-1 - моноцитарный хемоаттрактивный протеин-1
ОКД - отсроченная кальциевая дисрегуляция (лаг-период)
ФСБ - фосфатно-солевой буфер
ДОБА - 3,4-диоксибензиламин
5-НТ - серотонин
ООС - общий окислительный статус
ОАС - общий антиоксидантный статус
ИОС - индекс окислительного стресса
СК - сенсомоторная кора
ХЯ - хвостатое ядро
 $\Delta\Psi_m$ - митохондриальный потенциал
AUC - площадь под кривой изменений (area under curve)

ВВЕДЕНИЕ

1. Актуальность и степень разработанности темы исследования

Болезнь Паркинсона (БП) является хроническим нейродегенеративным заболеванием, приводящим к развитию инвалидности. Распространенность БП быстро растет среди стареющего населения мира, что приводит к возрастанию в геометрической прогрессии социально-экономических затрат, что подчеркивает острую потребность в эффективных способах лечения данной нозологии. Как и для других нейродегенеративных расстройств, наиболее значимым фактором риска БП является возраст, что подтверждается статистически: спорадические случаи БП крайне редко встречаются в возрасте до 50 лет, но уже составляет около 2% среди населения мира в возрасте 65 лет, а среди населения возрастом 80 лет достигают 5 % (Tysnes O.V. et al., 2017). Прогнозируется, что глобальная заболеваемость БП удвоится к 2040 г. (Dorsey E.R. et al., 2018), что сделает его самым распространенным нейродегенеративным заболеванием, опережающим болезнь Альцгеймера (GBD 2015 Neurological Disorders Collaborator Group, 2017). В отличие от большинства болезней, затраты на которые уменьшаются с повышением социально-экономического уровня, экономические затраты на БП со временем возрастают. Инвалидность по причине БП увеличивается с ростом социально-демографического индекса, комплексного показателя дохода на душу населения, образования и фертильности населения, и это единственное неврологическое расстройство, демонстрирующее такую закономерность. В последние годы отмечается также общемировая тенденция к «омоложению» БП, эпидимическая распространенность заболевания увеличивается среди людей моложе 60 лет (Dorsey E.R. et al., 2018).

Ключевым звеном патогенеза БП является повреждение и гибель нигростриатных дофаминергических нейронов, приводящие к резкому снижению уровня дофамина 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). Болезнь Паркинсона развивается постепенно, первые симптомы появляются спустя 20-30 лет от начала процесса дегенерации дофаминергических нейронов в черной субстанции (Угрюмов М.В., 2011; Bernheimer H. et al., 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. В течение первых лет лечения БП леводопасодержащими препаратами заметно улучшает двигательные показатели большинства пациентов с БП, что приводит к улучшению общего качества жизни и облегчению ежедневной деятельности. Однако эффекты леводопы, как правило, снижаются по мере того, как болезнь прогрессирует, и после 3-5 лет лечения требуются более высокие дозы препарата, что сопровождается появлением изнурительных побочных эффектов, худшим из которых является двигательная флуктуация и дискинезия. Эти новые симптомы непосредственно вызваны высокими дозами леводопы. Они прогрессивно снижают качество жизни пациента и оказывают пагубное воздействие на когнитивные функции. В связи с чем практикуется комплексный подход к терапии включающий разные механизмы увеличения содержания дофамина в нигростриатуме мозга, который подразумевает применение ингибиторов обратного захвата моноаминоксидазы В (Разагилин, Селегилин), агонистов дофамина (Прамипексол, Ропинерол, Бромокриптан) и антихолинергических препаратов (Циклодол, Акинетон, Бензтропин, Этопропазин, Проциклидин, Тригексифенидил). 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, психических расстройств и прогрессированию заболевания. В связи с этим, является актуальным создание

нейропротективных препаратов, способных остановить или снизить степень нейродегенерации nigralных дофамин-ергических нейронов и, тем самым, затормозить прогрессирование болезни Паркинсона. Следует также отметить, что большинство современных оригинальных препаратов для лечения БП зарубежного происхождения, и имеется недостаток доступных отечественных фармакологических средств.

В России и за рубежом в качестве средств лечения БП исследуются 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 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридин (МФТП)-индуцированного паркинсонизма на мышцах и модели с использованием 6-гидроксидофамина (6-ГОДА) на крысах (Иванова Е.А. и др., 2015; Вальдман Е.А. и др., 1999; Вальдман Е.А. и др., 2004). В исследованиях на интактных животных и «in vitro» 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. Установлено также, что в концентрации 10^{-5} М гимантан обладает свойствами обратимого ингибитора моноаминоксидазы-В (МАО-В) (Воронина Т.А. и др., 2001; Вальдман Е.А. и др., 2003). В ряде экспериментов продемонстрирована также антидепрессивная, иммуномодулирующая, антиоксидантная активность гимантана, положительное влияние на ЭЭГ-показатели при моделировании паркинсонического синдрома (ПС) (Капица И.Г. и др., 2013; Нежинская Г.И. и др., 2003; Иванова Е.А. и др., 2013). Однако для расширения и углубления представлений о патогенетических механизмах противопаркинсонического,

нейропротекторного действия адамантанов и, в частности, гимантана необходимо исследование его различных нейрoхимических эффектов не только на интактных животных, но и непосредственно на моделях ПС на ранней и поздней стадиях его развития.

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, противопаркинсонического эффектов адамантанов, и в частности гимантана, в том числе его способности уменьшать гибель дофаминергических клеток черной субстанции на ранней и поздней стадиях развития ПС.

2. 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.

3. Задачи исследования

1. Провести сравнительное изучение влияния препаратов - производных адамантана на выраженность паркинсонической симптоматики у мышей C57Bl/6 на разных стадиях МФТП-индуцированного ПС.
2. Провести сравнительное изучение влияния препаратов - производных адамантана на уровень дофамина (ДА) и его метаболитов диоксифенилуксусной кислоты (ДОФУК) и гомованилиновой кислоты (ГВК) в стриатуме головного мозга мышей C57Bl/6 на разных стадиях МФТП-индуцированного ПС.
3. Провести оценку степени нейрональной гибели TH⁺-положительных нейронов 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, общего антиоксидантного статуса и индекса окислительного стресса у мышей на разных стадиях развития ПС и влияние на эти показатели гимантана.

5. Исследовать цитокиновый профиль (ИЛ-1 β , ИЛ-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

4. Научная новизна, теоретическая и практическая значимость

Впервые в работе было исследовано влияние гимантана на степень гибели ТН⁺-нейронов черной субстанции (ЧС) на начальной и поздней стадии экспериментального паркинсонического синдрома и продемонстрирован его защитный эффект в отношении ДА-ергических нейронов. Впервые исследовано влияние гимантана на процесс нейровоспаления на начальной и поздней стадии экспериментального ПС путем анализа уровня провоспалительных цитокинов непосредственно в нигростриатном комплексе, 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 клинической 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-рецептора и показано, что на фоне препарата наблюдается блокада патологических токов Ca^{2+} в ответ на эксайтотоксический эффект глутамата и сохраняется физиологическая способность нейронов к передаче сигнала.

Научно-практическая значимость.

Полученные данные показывают, что производные адамантана являются перспективным классом химических соединений для поиска среди них веществ с нейропротекторным действием. Полученные данные о том, что гимантан тормозит прогрессирование симптомов на ранней стадии развития ПС и уменьшает выраженность паркинсонической симптоматики на поздней стадии развития заболевания уточняет и расширяет возможности его клинического применения у больных БП.

Результаты исследования имеют научно-практическую значимость при разработке новых препаратов с нейропротекторным действием для лечения нейродегенеративных заболеваний.

5. Методология и методы исследования

Планирование и проведение исследований осуществляли согласно поставленной цели на основе гистологических методов, методов поведенческого тестирования (открытое поле, вертикальный стержень, Rota-Rod); нейрохимическое исследование проводили методом ВЭЖХ, кальциевого имиджинга - с помощью флуорисцентных зондов, исследование цитокинового профиля - методом иммуноферментного анализа, спектрофлуориметрический метод использовали для определения окислительного стресса, а также применяли методы биоинформатического и статистического анализа.

6. Положения, выносимые на защиту

1. Выраженность паркинсонической симптоматики и снижение уровня дофамина и его метаболитов усиливается на поздней фазе в сравнении с ранней клинической фазой 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 на ранней, чем на поздней клинической фазе МФТП-индуцированного паркинсонического синдрома.
3. Гимантан снижает степень дегенерации нигральных нейронов на ранней клинической фазе МФТП-индуцированного ПС, проявляя нейропротективное действие.
4. Антипаркинсонический эффект гимантана на ранней клинической фазе ПС обусловлен его способностью снижать степень образования провоспалительных цитокинов, уровень окислительного стресса и повышать мощность антиоксидантной системы в нигрокаудатном комплексе и блокадой NMDA-глутаматных каналов, путем уменьшения чрезмерного поступления ионов Ca^{2+} и Na^{+} в нейроны.

7. 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 проведён 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. ЭЭГ-исследования выполнены на базе лаборатории психофармакологии ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В.

Закусова» в соавторстве с к.б.н. И.Г.Капица под руководством д.м.н., профессора Т.А. Ворониной, этап проведения ВЭЖХ выполнен под руководством к.м.н. В.С. Кудрина на базе лаборатории нейрохимической фармакологии ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», 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», определение цитокинов в мозговой ткани проводилось совместно с в.н.с. лаборатории общей и перинатальной нейроиммунопатологии ФГБНУ "НИИОПП", к.м.н. Л.А. Ветрилэ, морфологическое исследование, подготовка гистологических препаратов проводилось совместно с м.н.с. ФГБНУ "НИИОПП" В. В. Голоборщевой.

8. Степень достоверности результатов

Достоверность полученных результатов подтверждается количеством животных, использованием современных лабораторных методов исследования, адекватных поставленным задачам, а также применением современных методов статистического анализа. Научные выводы и положения обоснованы. Выводы диссертационной работы объективно и полноценно отражают результаты проведенных исследований.

9. Основные положения диссертации доложены и обсуждены на:

По теме диссертации опубликовано 10 печатных работ, в том числе 5 статей в рецензируемых журналах из перечня рецензируемых научных изданий ВАК РФ и 5 тезисов в сборниках докладов научных конференций.

Основные результаты диссертационной работы были представлены на XXVI Российском национальном конгрессе «Человек и лекарство» (Москва, 2019), II Объединенный научный форум / VI Съезд Физиологов СНГ / VI Съезд Биохимиков России / IX Российский Симпозиум «Белки и Пептиды» (1-6 октября 2019, Сочи - Дагомыс), Конгресс "Нейронаука для медицины и

психологии" (Судак, Крым, 6-16 октября 2020 г.), Международная конференция «Рецепторы и внутриклеточная сигнализация» (г. Пущино, 24-28 мая 2021 г.).

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1. Болезнь Паркинсона. Общие сведения.

Болезнь Паркинсона (БП) - нейродегенеративное заболевание, классически характеризующееся триадой моторных симптомов: брадикинезия, ригидность и тремор покоя. Недавно было признано, что фенотип заболевания на самом деле намного шире. Есть проявления, которые предшествуют этим характерным чертам заболевания и составляют «премоторные» симптомы БП: запор, расстройства мочевого пузыря, гипосмия, вегетативная дисфункция, депрессия и нарушения сна (Hirsch E. C.; Standaert D.G., 2021). БП распространена повсеместно с частотой в среднем 120-180 случаев на 100 тыс. населения. В Европе показатели распространенности заболеваемости БП оцениваются примерно в 108–257 на 100 тыс. населения в год. Факторы риска включают возраст, мужской пол и некоторые факторы окружающей среды (Balestrino R. et al., 2020). Большинство случаев БП, вероятно, имеют многофакторную этиологию, и являются результатом комбинированного воздействия факторов окружающей среды и генетических факторов. Воздействие токсичных веществ и присутствие травмы головного мозга в анамнезе могут увеличить риск БП. Идентифицируемые мутации в определенных генах вызывают БП примерно в 5–10% случаев, эти мутации отсутствуют у большинства людей с БП. Более того, наиболее распространенные генетические мутации, связанные с БП, обладают неполной пенетрантностью, что указывает на участие других экологических или генетических факторов (Simon D.K. et al., 2020). Исследование, сравнивающее показатели конкордантности у монозиготных и дизиготных близнецов, показало, что наследуемость БП составляет всего 30%, предполагая, что большая часть риска БП связана с факторами окружающей среды и поведенческими факторами (Goldman S.M. et al., 2019).

Патологически симптомы БП сопровождаются дегенеративными изменениями, затрагивающими головной, спинной мозг и периферические

нервы. Нейродегенерация приводит к выраженному истощению запасов дофамина в дофаминергических нейронах ЧСк, но также обширная дегенерация других структур, включая голубое пятно, гиппокамп и корковые структуры. Для появления первых двигательных симптомов требует пороговый уровень дегенерации ДА-ергических нейронов ЧС, что составляет 50-60% нейронов и 70-80% аксонов этих нейронов (Угрюмов М.В., 2011). Эти изменения сопровождаются появлением телец Леви, белковых агрегатов, обнаруживаемых в ЧСк и других областях. Важным достижением в этой области стало открытие вовлеченности белка α -синуклеина в этот патологический процесс. α -Синуклеин признан не только генетически вовлеченным в патологический процесс компонентом, но и основным содержимым телец Леви и нейритов. Ранние стадии связаны с аномальным накоплением α -синуклеина в нейронах кишечника, блуждающего нерва и других периферических нервов. В головном мозге самые ранние изменения связаны с агрегатами α -синуклеина в стволе мозга и обонятельной луковице, при этом более поздней стадии изменения обнаруживаются в среднем мозге и в конечном итоге затрагивают уже большую часть коры головного мозга (Braak H et al., 2004).

Для наступления симптоматической стадии БП требуется снижение уровня дофамина в стриатуме на 70-80% (Хаиндрава В.Г. и др., 2010). Исследования роли ДА-ергических нейронов в старении предполагают, что естественный процесс нейродегенерации происходит в ЧС начиная с 18 летнего возраста и обуславливает при критическом снижении нарушение двигательной функции. Так, с помощью метода позитронно-эмиссионной томографии (ПЭТ) обнаружено возрастное снижение активности дофаминовых рецепторов дофамина D1, D2 (van Dyck C.H. et al., 2002). Анализ методом однофотонной эмиссионной компьютерной томографии (ОФЭКТ) позволил обнаружить возрастные потери дофамина от 8 % за десятилетие в период от 18 до 83 лет с максимальным снижением на 51 %. Таким образом, процесс

нейродегенерации при БП опережает естественный процесс гибели нейронов в ЧС.

Дефицит тормозного нейротрансмиттера ДА приводит к чрезмерной компенсаторной активации холинергических нейронов полосатого тела, что лежит в основе генерации патологически усиленного возбуждения (Крыжановский Г.Н., 1997). Такое следствие дисрегуляторного процесса проявляется характерным моторным симптомокомплексом. Среди причин, приводящих к смерти нигральных дофаминергических нейронов, важную роль отводят образованию свободных радикалов и связанному с этим оксидативному стрессу, разобщению дыхательной цепи электронов в митохондриях и энергетическому дефициту, активации NMDA-глутаматных рецепторов, активации микроглии и, как следствие, нейровоспалению в ЧС (Кучеряну В.Г., 2002; Кучеряну В.Г. и др., 2012). Также к принципиальным звеньям патогенеза БП относят глутаматергическую эксайтотоксичность и аномальную агрегацию белка альфа-синуклеина (Salamon A. et al., 2020).

Доступные в настоящее время методы лечения симптоматичны и не способны замедлить нейродегенерацию. На начальных стадиях заболевания фармакологическая терапия обеспечивает хороший контроль симптомов, на более поздних стадиях заболевания некоторые симптомы уже не поддаются коррективке леводопой (например, дизартрия, дисфагия и одышка, деменция, галлюцинации, дневная сонливость и недержание мочи), что приводит к инвалидности на поздних стадиях БП. Более того, осложнения, связанные с фармакологическим лечением, добавляют дополнительные трудности в ведение запущенных стадий БП. БП ассоциируется с повышенным риском смертности от всех причин, сокращением продолжительности жизни. Большинство пациентов теряют способность к самообслуживанию на поздней фазе болезни, что в сочетании с резистентностью к терапии леводопы является показанием к помещению пациента в интернат (Balestrino R. et al., 2020). Для всех пациентов с БП лечение является симптоматическим, направленным на улучшение моторных

(например, тремор, ригидность, брадикинезия) и немоторных (например, запор, когнитивные функции, настроение, сон) признаков. Фармакологические препараты, модифицирующие заболевание, не доступны. В связи с этим принципиальным становится разработка препаратов нейропротективного действия, способных ослабить гибель ДА-ергических нейронов в ЧС (Armstrong, M. J.; Okun, M. S., 2020).

2. Патогенез болезни Паркинсона. Механизмы гибели дофаминергических нейронов nigrostriatной системы при болезни Паркинсона

1.1. Окислительный стресс

Двигательная дисфункция при БП является результатом потери дофаминергических нейронов в компактной части ЧС и истощения дофамина в nigrostriatных путях. Окислительный стресс играет ключевую роль в сложном и прогрессирующем нейродегенеративном каскаде, лежащем в основе дофаминергической нейродегенерации при всех формах БП (Trist B.G. et al., 2019).

Окислительный стресс (ОС) - это патологический процесс, вызванный дисбалансом между окислителями и антиоксидантами в биологической системе. Дисбаланс возникает в результате избыточной продукции активных форм кислорода (АФК) или неэффективного функционирования антиоксидантной системы (Chiurchi V. et al., 2016). Одновременно с тем, что кислород служит наиболее важным и жизненно необходимым элементом функционирования всех живых аэробных организмов, в избыточном количестве производные АФК оказывают губительное воздействие на функционирование клеток. Накопление АФК в следствии развития окислительно-восстановительного дисбаланса внутри клетки опосредует повреждение нейронов (Schieber M., Chandel N.S., 2014). АФК, участвующие в механизмах нейродегенерации, включают перекись водорода (H_2O_2), супероксидный анион (O^{2-}) и высокореактивный гидроксильный радикал

(HO[•]) (Singh A. et al., 2019). АФК представляют собой важные сигнальные молекулы, регулирующие физиологическую транскрипцию генов и взаимодействия белков, а свободное радикальное окисление само по себе представляет для клетки механизм обезвреживания патогенных веществ и продуктов метаболизма, но избыточное накопление АФК вызывает окислительное повреждение в зависимости от места продукции АФК внутри клетки липидов, белков, дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) и рибонуклеиновой кислоты (РНК) и нарушает функционирование и структурную целостность нейрона (Schieber M., Chandel N.S., 2014). АФК, возникающие внутри организма в неконтролируемом количестве продукты перекисного окисления липидов по существу являются эндотоксинами (Крыжановский Г.Н., 2002). Учитывая, что мозг богат липидами, здесь может легко происходить перекисное окисление липидов, которое проходит как свободнорадикальная цепная реакция полиненасыщенных жирных кислот. Конечный продукт перекисного окисления липидов представляет собой семейство альдегидов с различной длиной углерода, к числу которых относятся малоновый диальдегид и акролеин (Grimsrud P.A. et al., 2008). В исследованиях материала аутопсий было обнаружено, что выработка малонового диальдегида в результате перекисного окисления липидов клеток черной субстанции пациентов с паркинсонизмом увеличивается по сравнению со здоровыми контрольными образцами человеческого мозга (Dexter D.T. et al., 1989).

Основным внутриклеточным источником АФК и одновременно наиболее чувствительными к ОС органеллами являются митохондрии (Brand M.D. et al., 2004). Продукция митохондриального АТФ поддерживает нервную активность и клеточный гомеостаз, что достигается за счет окислительного фосфорилирования в митохондриальной цепи переноса электронов (ЦПЭ). Преждевременный перенос электронов от комплексов I и III ЦПЭ к O₂ происходит в митохондриях млекопитающих (Dröse S., Brandt U., 2008; Kussmaul L., Hirst J., 2006) и генерирует O^{2•-} в качестве физиологического

побочного продукта при синтезе АТФ. Эти АФК могут запускать образование гидроксильных радикалов $\text{HO}^\bullet$, которые становятся причиной первичного окислительного повреждения нейронов как внутри, так и вне митохондрий (Weidinger A., Kozlov A.V., 2015). В качестве противовеса митохондрии содержат два вида из трех эукариотические системы супероксиддисмутазы (СОД), которые детоксифицируют O_2^- в H_2O_2 (Ruszkiewicz J., Albrecht J., 2015). Наряду с этим в антиоксидантной системе присутствуют глутатион, таурин, креатин, цинк, витамин Е, витамин С, витамин А и полифенолы, которые также связывают и нейтрализуют активные формы кислорода. Эффект антиоксидантов усиливается и поддерживается антиоксидантными ферментами, к которым, помимо СОД, относят каталазу, глутатионпероксидазу, глутатион-S-трансферазу и др. (Yun-Zhong F. et al., 2002; Guido K., John C.R., 2000). Исследования крови пациентов с БП показали снижение активности каталазы, СОД, а также содержание антиоксиданта альфа-токоферола (Кучеряну В.Г., 2000). Аналогичные данные получены при экспериментальном паркинсонизме у старых крыс путем многократного введения 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридина (МФТП), что приводило к снижению и недостаточности СОД, сопровождающие повышения уровня вторичных продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) в стриатуме (Кучеряну В.Г. и др., 1989). При развитии паркинсонического синдрома после введения 1-метил-4-фенил пиридиния (МФП⁺) в хвостатое ядро, отмечалось повышение продуктов ПОЛ, и существенным увеличением концентрации 2-тиобарбитуловой кислоты, на основании чего был сделан вывод о корреляции выраженности паркинсонического синдрома и активности ПОЛ. Интересно, что большинство соединений, вызывающих дофаминергическую потерю *in vivo*, являются местными ингибиторами дыхательной функции митохондрий. Однако их токсический эффект, зависит в первую очередь от индукции ими образования радикалов дыхательной цепью (Cannon J.R., Greenamyre J.T., 2011).

Следует отметить, что чувствительность к пагубному воздействию АФК не одинаково в разных популяциях нейронов головного мозга (ГМ), и во многом определяется различием в энергетических затратах клеток. Так, дофаминергические нейроны компактной части черной субстанции (ЧСк) особенно чувствительны к дегенерации при БП и при экспериментальном моделировании паркинсонического синдрома (Pissadaki E.K., Bolam J.P., 2013). Хотя предполагается, что в основе этой чувствительности лежат различные молекулярные характеристики, одним из возможных факторов является массивная разветвленность сети немиелинизированных аксонов, которая на порядок больше, чем у других типов нейронов (Braak H. et al., 2004). Экстраполяция данных, полученных в исследованиях на крысах предполагает, что рост аксонов и количество синапсов дофаминергических нейронов ЧС человека в десять раз больше, чем в любых других нейронах мозга (Bolam J.P., Pissadaki E.K., 2012). Эта аксональная архитектура дофаминергических нейронов ЧСк создает высокую потребность в энергии не только для поддержания нормального биологического функционирования клеток, но, главным образом, для поддержания мембранного потенциала покоя, распространения потенциалов действия и синаптической передачи (Pissadaki E.K., Bolam J.P., 2013). Были предоставлены данные в прямую поддержку этой гипотезы (Pacelli C. et al., 2015), показав *in vitro*, что митохондриальный оксидантный стресс выше в аксонах ДА-нейронов ЧСк, чем в менее разветвленных аксонах нейронов ДА-нейронов вентральной области покрышки. Другая причина избирательной гибели нейронов ЧСк заключается в том, что сильно разветвленный аксон является эффективным каналом для ретроградно передаваемых патогенов, таких как неправильно свернутый альфа-синуклеин (α SYN), из-за большого количества сайтов синаптического захвата (Venda L.L. et al., 2010). Однако есть нейроны с длинными, сильно разветвленными аксонами как и у ДА-нейронов ЧСк, которые не подвергаются гибели при БП (Zhou F.M. et al., 2002), что

доказывает, что длинный аксон сам по себе не является основной причиной нейродегенерации при БП.

В отличие от большинства нейронов ГМ, дофаминергические нейроны ЧСк автономно активны. Регулярные потенциалы действия (2–4 Гц) генерируются в отсутствие активации через синапс (Grace A.A., Bunney B.S., 1983) для поддержания уровня дофамина в областях, иннервируемых ЧСк, особенно в полосатом теле (Romo R., Schultz W., 1990). Шипы в этих нейронах широкие, что увеличивает поступление ионов Ca^{2+} и способствует медленной ритмической активности (Bean B.P., 2007). Сходная функция автономной активности в соседних популяциях нейронов, таких как дофаминергические нейроны вентральной области покрышки, управляется моновалентными катионными каналами. Однако дофаминергические нейроны ЧСк используют кальциевые каналы L-типа $\text{Cav}_{1.3}$ (Bonci A. et al., 1998). Каналы $\text{Cav}_{1.3}$ особенно интересны, потому что они открываются при относительно гиперполяризованном мембранном потенциале (Lipscombe D., 2004). Фактически, из-за деполяризованного рабочего диапазона нейронов ЧСк, каналы $\text{Cav}_{1.3}$ никогда не закрываются полностью во время цикла стимуляции (Puorolo M. et al., 2007); это и экспрессия С-концевых вариантов сплайсинга субъединицы $\text{Cav}_{1.3}$, которые минимизируют Ca^{2+} -зависимую инактивацию, приводят к устойчивому притоку Ca^{2+} в нейрон (Tan B.Z. et al., 2011). В результате приток Ca^{2+} может нарушать клеточные сигнальные и метаболические пути из-за воздействия Ca^{2+} как вторичного мессенджера. Соответственно, поступивший Ca^{2+} должен быть немедленно изолирован в эндоплазматическом ретикулуме или митохондриях или транспортирован обратно во внеклеточное пространство против градиента концентрации, что требует значительных энергетических затрат (Perier C., Vila M., 2012). Такая постоянная потребность в связывании и/или выведении за пределы клетки ионов Ca^{2+} является уникальной особенностью дофаминовых нейронов ЧСк, поскольку другие популяции нейронов, экспрессирующие $\text{Cav}_{1.3}$, активируются только эпизодически (Olson P.A. et al., 2005). Это

подтверждается исследованиями с применением исрадипина - блокатора кальциевых каналов L-типа, который демонстрирует защитные эффекты против α -синуклеина, - 6- гидрооксидофамина (6-ГОДА) или вызванной МФТП нейротоксичности в ДА-ергических нейронах (Pijic E. et al., 2011; Wang Q.M. et al., 2017). Нормальное функционирование и Ca^{2+} автономная активность дофаминовых нейронов ЧСк создают высокую метаболическую нагрузку именно на эту популяцию нейронов, что обуславливает восприимчивость к избыточной генерации АФК в ситуациях, когда потребность в энергии (протонодвижущая сила) превышает способность синтеза аденозилтрифосфат (АТФ). Дисфункция митохондриальной ЦПЭ, особенно в комплексе I (Puspita L. et al., 2017), составляет одну из таких ситуаций, когда доставка электронов в ЦПЭ превосходит способность их связывания в ЦПЭ в процессе окислительного фосфорилирования.

Таким образом, процесс преждевременного переноса электронов на O_2 приводит к образованию значительного количества O^{2-} , вызывая окислительное повреждение ДНК, липидов и белков как внутри, так и вне митохондрий. Активность митохондриального комплекса I в дофаминергических нейронах ЧСк с возрастом постепенно снижается (Venkateshappa S. et al., 2012) и уникальные биофизические свойства дофаминергических нейронов ЧСк могут способствовать высокому исходному уровню окислительного стресса в ЧСк в условиях старения организма. Кроме того, дофаминергические нейроны в вентральной зоне компактной части ЧС не экспрессируют кальбиндин, важный нейрональный буферный белок Ca^{2+} (Schmidt H., 2012), в отличие от значительной его экспрессии в дорсальной области ЧСк (Reyes S. et al., 2012). Эти данные предполагают, что нарушение регуляции Ca^{2+} и окислительно-восстановительный дисбаланс, связанные со старением или этиологией БП, могут влиять на причину более ранней гибели нейронов в вентральной зоне ЧСк за счёт исходно сниженной способности к связыванию Ca^{2+} . Таким образом, поддержание автономной активности Ca^{2+} в такой сложной

архитектуре аксонов накладывает необходимость в значительно больших энергетических затратах и соответственно в большей энергопродукции в дофаминергических нейронах ЧСк по сравнению с нейронами в других областях мозга, особенно в вентральной зоне ЧСк, что может способствовать их высокому исходному уровню окислительного стресса и уязвимость к дегенерации при БП. (Trist B.G. et al., 2019). Кроме того, несколько наблюдений на людях, показали, что каналы Cav1 и окислительный стресс митохондрий, стимулированный Ca^{2+} , являются движущими силами нейродегенерации при БП. Во-первых, как упоминалось выше, экспрессия буферного белка Ca^{2+} кальбиндина обратно коррелирует с риском дегенерации в среднем мозге (German D.C. et al., 1992). Во-вторых, в среднем мозге пациентов с БП находили явные признаки стойкого митохондриального ОС. В ЧСк у пациентов с БП, делеции матричной ДНК (мтДНК) (например, производимые АФК) распространены (Sanders L.H. et al., 2014), а активность комплекса I митохондрий снижена (Schapira A.H. et al., 1990).

Анализ данных, полученных в ходе экспериментального моделирования паркинсонического синдрома с помощью нейротоксина МФТП, показал, что в отличие от ситуации прогрессирующего нарушения регуляции окислительно-восстановительных процессов в митохондриях дофаминергических нейронов ЧСк в ходе естественного процесса старения организма, чрезмерная генерация АФК митохондриями ЧСк при моделировании БП связана с серьезным нарушением в ЦПЭ и окислительным повреждением нейронов (Schapira A.H. et al., 1990). МФТП после превращения в астроглии с помощью фермента МАО В в МФП^+ свободно проникает через липидные мембраны и накапливается в митохондриях, где приводит к тому, что система ЦПЭ, изначально находящаяся в условиях избыточной функциональной активности в связи с выраженными энергетическими потребностями клетки, быстро выходит из состояния окислительно-восстановительного баланса, за счет блокирования МФП^+ потока электронов от никотинамидадениндинуклеотидфосфат-дегидрогеназы (НАДН-

дегидрогеназы) к коферменту Q в пределах митохондриального комплекса I (Ramsay R.R. et al., 1991), чем провоцирует значительную генерацию супероксидных радикалов и снижению синтеза АТФ (Richardson J.R. et al., 2005). Таким образом, МФТП-индуцированные биохимические изменения, к которым относится избыточная генерация АФК, накладываются на избирательную предрасположенность дофаминергических клеток ЧСк к нейродегенерации при БП, что способствует селективной гибели именно нейронов ЧСк. В подтверждении такой роли АФК в МФТП-индуцированной нейродегенерации служат эксперименты с трансгенными мышами, имеющими повышенную антиоксидантную активность СОД1, которые становились устойчивыми к дегенерации дофаминергических нейронов после введения МФТП (Przedborski S., Levivier M., 1992).

Ряд генетических мутаций, приводящих к накоплению в митохондриях мутантного (Martin L.J. et al., 2006) или дикого типа (Hsu L.J. et al., 2000) α -синуклеина, белкового продукта синуклеина, в дофаминергических нейронах снижает активность комплекса I и увеличивает продукцию АФК *in vivo* у трансгенных мышей, что предшествует гибели дофаминергических нейронов в полосатом теле (Subramaniam S.R. et al., 2014). Иными словами, специфическая уязвимость дофаминергических нейронов ЧСк при семейном БП, несмотря на общесистемное присутствие генетических мутаций во всем мозге и теле у лиц страдающих БП, подчеркивает уникальную восприимчивость этой популяции нейронов к повреждению вследствие повышенного окислительного стресса в митохондриях.

Если учесть тот факт, что накопление α -синуклеина опосредовано увеличивает продукцию АФК (как описано выше), имеются данные о том, что как при наследственной, так и при спорадической форме БП непосредственно сам окислительный стресс вызывает нарушение сборки, модификацию и агрегацию α -синуклеина, перекисное окисление липидов, воспаление и митохондриальную дисфункцию. Хасимото М и Оуэн Скадамор обнаружили, что окислительный стресс индуцирует образование амилоидоподобных

агрегатов α -синуклеина *in vitro* и усиливает агрегацию α -синуклеина *in vivo* (Hashimoto M. et al., 1999).

Ряд данных свидетельствует о том, что метаболизм дофамина, высокие уровни железа и кальция в ЧС, митохондриальная дисфункция и нейровоспаление способствуют усилению окислительного стресса и потере дофаминергических нейронов в мозге пациентов с БП (Chang K.H., Chen C.M., 2020). Дофамин обладает способностью к самоокислению с образованием хинонов дофамина и свободных радикалов, которые могут вызывать нейродегенерацию при БП (Monzani E. et al., 2019). Циклизация дофаминовых хинонов образует аминокхром, который генерирует супероксидный радикал и подавляет антиоксидантные способности никотинамид адениндинуклеотид-фосфата (НАДФН) (Segura-Aguilar J., Paris I., 2014). При метаболизме дофамина моноаминоксидазой-В (МАО-В) образуется 3,4-дигидроксифенилацетальдегид, аммиак и H_2O_2 (Graves S.M. et al., 2020). H_2O_2 в дофаминергических нейронах реагирует с Fe^{2+} , что приводит к образованию гидроксильного радикала (Kumar M.J., Andersen J.K., 2004; Nagatsu T., Sawada M., 2006). Индукция МАО-В в астроцитах приводит к избирательной потере ДА-ергических нейронов в ЧС у мышей (Mallajosyula J.K. et al., 2008). Транспортировка и хранение дофамина также увеличивают производство АФК. Хранение дофамина требует его предварительной транспортировки с помощью везикулярного транспортера моноаминов 2 (VMAT2) (Zhang S. et al., 2019). VMAT2 обеспечивает защиту нейронов от токсичности, вызываемой МФТП. Доказано, что ДА-нейроны с ингибированным VMAT2 более уязвимы к окислительному стрессу (Uhl G.R. et al., 2000).

В литературе сообщается, что повышенный уровень ионов железа в ЧС вносит вклад в окислительный стресс и нейродегенерацию при БП (Sziráki I. et al., 1998; Lan J., Jiang D.H., 1997). Превышение концентрации ионов железа в ЧС обнаружено у пациентов с БП в сравнении со здоровыми лицами (Mochizuki H. et al., 2020). Ионы железа Fe^{3+} и Fe^{2+} реагируют с супероксидным радикалом и H_2O_2 , что приводит к образованию гидроксильных свободных

радикалов, которые могут быть токсичными для нейронов (Bresgen N., Eckl P.M., 2015). Стереотаксическая инфузия ионов железа в ЧС крыс приводит к повышению уровня гидроксильных радикалов в полосатом теле (Sziráki I. et al., 1998). Введение хелатора железа мышам снижает уровень ионов железа в головном мозге и демонстрирует нейропротекторный эффект против нейротоксичности, вызванной введением раствора железа или МФТП (Lan J., Jiang D.H., 1997).

Многие исследования сосредоточены на поиске биомаркеров, отражающих окислительный стресс при БП. К ним можно отнести сниженный уровень общего коэнзима (CoQ10) в плазме и увеличение отношения окисленного CoQ10 к общему CoQ10 у пациентов с БП (Sohmiya M. et al., 2004), концентрацию 8-OHdG (биомаркер повреждения ДНК в результате окислительного стресса (Valavanidis A. et al., 2009)), который избирательно повышается в ЧС пациентов с БП (Alam Z.I. et al., 1997), повышение уровня продуктов перекисного окисления липидов, таких как изопростаны (Nourooz-Zadeh J. et al., 1999) и малоновый диальдегид (MDA) (Dexter D.T. et al., 1989), что также обнаруживается у пациентов с БП.

1.2. Механизм эксайтотоксичности действия глутамата

1.2.1. Глутаматные рецепторы

Способность нервной системы быстро передавать сенсорную информацию и сложные двигательные команды из одной части тела в другую, а также формировать мысли и воспоминания, в значительной степени зависит от мощного возбуждающего нейротрансмиттера – глутамата (Zhou, Y., Danbolt, N.C., 2014). Глутамат является широкораспространенным нейромедиатором ЦНС - большинство нейронов (а также глии) содержат высокие концентрации глутамата (~ 10 мМ) (Lipton S.A., Rosenberg P.A., 1994). Нарушение гомеостаза глутамата имеет важные нейропатологические последствия и связано с несколькими неврологическими или нейродегенеративными расстройствами, такими как эпилепсия, рассеянный

склероз, болезнь Альцгеймера (БА), болезнь Хантингтона (БХ), боковой амиотрофический склероз (БАС) и БП (Lewerenz J., Maher P., 2015).

О возбуждающей роли глутамата в мозге млекопитающих было известно еще с 1950х годов. Так, Хаяши в эксперименте 1952 г. по моделированию судоржных припадков на собаках в качестве стимулирующих медиаторов использовал в том числе и глутамат, ссылаясь на более ранние работы со сходными протоколами (Hayashi T. et al., 1952). В 1957 году Лукас и Ньюхаус сообщили, что системное введение глутамата новорожденным крысам приводило к дегенерации сетчатки - первое доказательство нейротоксичности больших доз глутамата (Lucas D.R., Newhouse J.P., 1957). Далее в 1960 году возбуждающий потенциал основных медиаторов в спинном мозге изучали Curtiss и Watkins, отводя глутамату одну из ведущих ролей в нейропередаче (Curtis, D. R., Watkins, J. C., 1960). Позже стало понятно, что глутамат оказывает свое действие постсинаптически на три семейства рецепторов, которые были названы в честь своих агонистов N-methyl-D-aspartate (NMDA), 2-амино-3-гидрокси-5-метил-4-изоксазолпропионова кислота (AMPA) и каинатные рецепторы (KAR) (Рис 1). Рецепторы имеют мультимерное строение с несколькими субъединицами. Функция этих рецепторов заключается в открытии ионных каналов для катионов, проницаемость которых различна для различных семейств рецепторов (Hollmann M. et al., 1989).

Следующие десятилетия ознаменовались подъемом научного интереса к глутаматным рецепторам по всему миру. Так, например, было доказано, что сайты распознавания глутамата в ионотропных рецепторах обладают схожестью последовательности с бактериальной аминокислотной переносчиков кислот и растительных пептидов, которые чувствительны к глутамату и участвуют в световых реакциях, что подтверждает длительную историю эволюции глутаматных рецепторов (Lam H.-M. et al., 1998). В конце 1980-х описаны глутаматные метаботропные рецепторы, реализующие свое действие на ионные каналы через G-белки (Conn P. J., Pin J. P., 1997).

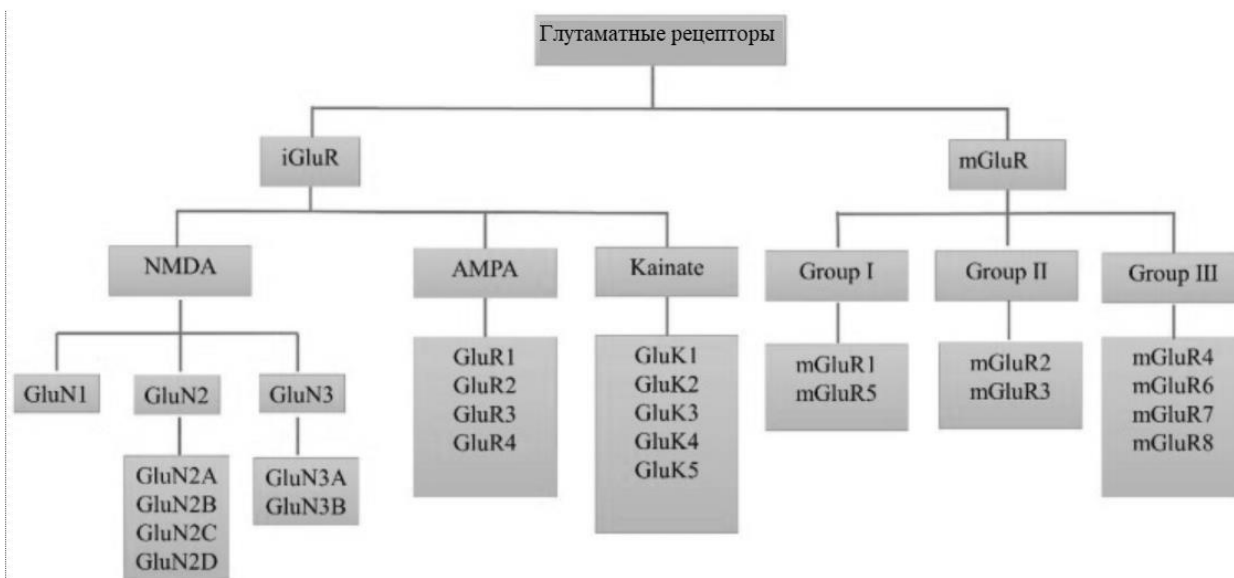


Рис. 1. Классификация глутаматных рецепторов. По материалам (Zhang Z, 2019).

Два типа глутаматных рецепторов: ионотропные (iGluR) и метаботропные рецепторы (mGluR). Среди ионотропных рецепторов выделяют N-метил-D-аспартат (NMDA), 2-амино-3-гидрокси-5-метил-4-изоксазолпропионова кислота (AMPA) и каинатные рецепторы (Kainate).

Отдельного внимания заслуживают NMDA-рецепторы. Постсинаптический потенциал, вызванный активацией NMDA рецептора имеет более медленное начало и большую продолжительность, чем постсинаптические потенциалы, вызванные активацией других ионотропных рецепторов глутамата. К тому же NMDA-опосредованный постсинаптический потенциал является зависимым от напряжения. В состоянии потенциала покоя мембраны NMDA рецептора трудно активировать, потому что ионный канал рецептора блокируется нормальными концентрациями внеклеточного магния. Когда мембрана становится деполяризованной, магниевая блокада снимается и рецептор может быть активирован (Choi D.W. et al., 1988). Глутамат активирует несколько классов метаботропных рецепторов и три основных типа ионотропных рецепторов. Эти более поздние рецепторы представляют

собой лигандо-управляемые ионные каналы, проницаемые для одновалентных катионов Na^+ и K^+ и, в зависимости от подтипа, также для Ca^{2+} . AMPA рецепторы в значительной степени непроницаемы для ионов Ca^{2+} и участвуют в большинстве форм быстрой синаптической передачи. Напротив, подтип, называемый N-метил-D-аспаратат (NMDA), активируется только при определенных условиях.

Следует отметить, что NMDA-рецепторы значительно представлены на нигральных дофаминергических нейронах. При взаимодействии глутамата с этими рецепторами открывается ионные каналы для входа иона кальция в нейрон (Paquet M. et al., 1997).

Глутамат выделяется из пресинаптических терминалей, где он депонируется везикулярно в высоких концентрациях. Его высвобождение регулируется широким спектром пресинаптических рецепторов, к которым относятся метаботропные рецепторы глутамата группы II и группы III, а также холинергические (никотиновые и мускариновые) рецепторы, аденозин (A_1), каппа-опиоид, γ -аминомасляная кислота (ГАМК), холецистокинин и нейропептид Y (Y_2) рецепторы (Meldrum B.S., 1998). In vivo концентрация глутамата в синаптической щели в условиях покоя составляет около 0,6 М (Bouvier M. et al., 1992). Астроциты обеспечивают буферизацию большей части внеклеточного глутамата путем его поглощения через белки-носители, обозначаемые как переносчики возбуждающих аминокислот (EAATs), и затем производят внутриклеточное превращение глутамата в его неактивный метаболит - глютамин (Rothstein J.D. et al., 1996). Синаптическая передача опосредуется коротким (1-2 мс) и пространственно ограниченным повышением концентрации глутамата в межклеточном пространстве более 10 М (Clements J.D. et al., 1992). Прекращение возбуждающего действия глутамата опосредуется благодаря системе обратного захвата, расположенной как на пре- и постсинаптических мембранах нейрональных клеток, так и на мембранах соседних глиальных клеток. В физиологических условиях с помощью указанных систем обратного захвата глутамата токсический

потенциал глутамата нивелируется его своевременным удалением из межсинаптического пространства (Danbolt N.C., 2001).

Индукцированная глутаматом эксайтотоксичность считается общим признаком многих нейродегенеративных заболеваний, включая БП. Теория эксайтотоксичности утверждает, что чрезмерное возбуждение нейрона такими медиаторами как глутамат, ведет к избыточному входу кальция в клетку и к каскаду патологических процессов и в конечном счете оказывает губительное действие (Whetsell W.O. Jr., Shapira N.A., 1993). Хотя в норме глутамат легко удаляется лучше использовать слово «удаляется» из межклеточного пространства, при патологических состояниях данный гомеостатический механизм нарушается, и медиатор становится эксайтотоксином (Roberts P. J., Davies S. W., 1987). Термин «экситотоксин» был введен Olney (1974), и возник из наблюдения, что тяжесть токсического ответа на возбуждающие агонисты аминокислотных рецепторов была прямо пропорциональна их возбуждающим способностям на центральных нейронах. Группа Olney обнаружила, что внутримозговая инъекция возбуждающих нейротрансмиттеров приводит к гибели нейронов в области инъекции, в то время как нервные волокна и афферентные терминалы отдаленных от места инъекции нейронов остаются сохранными. Эти работы доказывают устойчивую корреляцию между возбуждающими и токсическими свойствами аминокислот (Olney J.W., 1969). Согласно современным взглядам на механизм гибели нейронов в случае глутаматной эксайтотоксичности при активации NMDA-рецептора открывает канал, который позволяет Ca^{2+} (и другим катионам) проникать в клетку (Lewerenz J., Maher P., 2015). В некоторых областях мозга эта активность важна для долгосрочного потенцирования, который считается клеточным электрофизиологическим аналогом обучения и формирования памяти. В нормальных условиях синаптической передачи канал NMDA-рецептора блокируется Mg^{2+} , сидящим в канале, и активируется только в течение коротких периодов времени. В патологических условиях, однако чрезмерная активация рецептора вызывает избыточное поступление Ca^{2+} в нервную

клетку, что затем запускает различные процессы, которые могут привести к некрозу, апоптозу или дендритному синаптическому повреждению. Эти процессы включают Ca^{2+} перегрузку митохондрий, что приводит к образованию свободных радикалов кислорода, активации каспаз и высвобождению фактора, индуцирующего апоптоз, Ca^{2+} -зависимую активацию нейронов, приводящую к увеличению продукции NO и образованию очень токсического для клеток продукта пероксинитрита (ONOO^-); и стимуляцию митоген-активируемой протеинкиназы p38, которая активирует факторы транскрипции, проникающие в ядро для запуска апоптоза (Bonfoco E. et al., 1995). Проводимые исследования *in vitro* на культуре нейронов гиппокампа после применения токсических уровней глутамата показывают, что внутриклеточные концентрации Ca^{2+} остаются повышенными в течение ~1 часа, прежде чем вернуться к уровням до стимуляции (Dubinsky J.M. et al., 1993). Однако 85% нейронов погибают в течение 24 часов. Гибель культивируемых нейронов была предотвращена путем блокирования NMDA рецепторов или удалением Ca^{2+} из ростовой среды (Goldberg M.P. et al., 1987). Приток внеклеточного Ca^{2+} , усиленный высвобождением из внутриклеточного депо Ca^{2+} , может действовать как механизм положительной обратной связи для усиления синаптической передачи и нейронной возбудимости, вызывая дальнейшее высвобождение глутамата и закрепляя патологический круг (Choi D.W., 1992). Одновременно с этим постоянно высокие концентрации глутамата в стриатальных синапсах приводят к самонакоплению глутамата в астроцитах. Это явление активирует глиоз, истощает способность астроцитов запасать глутамат, путем снижения активности глутаминсинтетазы, и соответственно усиливает эксайтотоксичность (Morales I., Rodriguez M., 2012). Избыточное поступление ионов кальция в таком случае приводит к ряду дегенеративных процессов внутри клетки. К этому можно отнести активацию катаболических ферментов: кальпаин I, который разлагает нейрональные структурные белки фодрин, спектрин, тубулин, связанные с микротрубочками и многочисленные

полипептиды нейрофиламентов, вызывая тем самым разрушение цитоскелета (Siman R., Noszek J.C., 1988). Активируются также фосфолипазы, способные высвободить арахидоновую кислоту (Lazarewicz J.W. et al., 1990). Одновременно могут быть активированы эндонуклеазы, повреждающие ДНК клетки. Повышенный уровень цитозольного Ca^{2+} может действовать совместно с диацилглицерином для активации Ca^{2+} -чувствительных протеинкиназ, что приводит к гиперфосфорилированию белков цитоскелета (Lee V.M. et al., 1991). Запуск метаболизма арахидоновой кислоты клеточными оксидазами генерирует свободные радикалы кислорода, в результате чего происходит деградация липидных структур мембран (Chan P.H., Fishman R.A., 1978). Активация NMDA рецептора приводит к нейротоксическим (через активацию апоптотических путей) или нейропротективным эффектам в зависимости от места расположения рецептора (синаптического или внесинаптического) (Chai J. et al., 2001). Кроме того, приток Ca^{2+} - не единственный фактор гибели клеток, вызванной возбуждением. Исследования показали, что воздействие глутамата, гипоксии или ишемии могут запускать активацию внесинаптических NMDA-рецепторов, вызывать инактивацию белка, связывающего цАМФ, и приводить к потере митохондриального мембранного потенциала и гибели клеток. Однако активация синаптических NMDA-рецепторов не активирует апоптоз (Hardingham G.E., Bading H., 2010).

Концепция эксайтотоксичности глутамата имела наибольший успех в объяснении патофизиологических механизмов таких острых неврологических заболеваний как гипоксия и гипогликемия мозговой ткани. В обеих ситуациях нормальное поглощение и инактивация глутамата нарушается из-за нарушения клеточного метаболизма, что приводит к обильному росту внеклеточного уровня глутамата. Одновременно мембраны нейронов становятся более деполяризованными, облегчая тем самым активацию NMDA-рецепторов на их поверхности и повышая чувствительность нейронов, к развитию эксайтотоксичности. В экспериментальных моделях очаговых

гипоксии и гипогликемии показано, что антагонисты NMDA-рецепторов снижают степень поражения головного мозга (Choi D.W., 1990).

Помимо непосредственной эксайтотоксичности, вызванной высокими концентрациями глутамата существует и опосредованная (или медленная) эксайтотоксичность, осуществляемая путем стимуляции глутаматергических рецепторов в отсутствие повышенного внеклеточного уровня глутамата и связанная с любым процессом, который может поставить под угрозу способность нейрона поддерживать нормальный мембранный потенциал, к примеру, нарушение функции митохондрий. Эта концепция легла в основу косвенной эксайтотоксической гипотезы, постулированной в начале 90-х годов Альбин и Гринамир (Albin R.L., Greenamyre J.T., 1992). Авторы предполагают, что кроме установленного механизма эксайтотоксичности глутамата чрезмерными количествами агониста, имеется также «альтернативный» механизм, лежащий в основе соответствующей теории эксайтотоксичности. Такая «альтернативная» гипотеза эксайтотоксичности подразумевает два ведущих момента. Первое, возможность существования на нейроне “измененного” рецептора, избыточно восприимчивого к возбуждающему нейротрансмиттеру при его нормальной концентрации во внеклеточном пространстве. В подтверждение этому выступил ряд исследований намеренно измененных подтипов AMPA рецепторов, в ходе модификации получивших значительно более высокую проницаемость ионных каналов для Ca^{2+} (Hollmann M. et al., 1991). Аномальная экспрессия такого рецептора, хорошо проницаемого для Ca^{2+} на отдельных нейронах, может сделать их избирательно уязвимыми для эксайтотоксического повреждения с увеличением притока Ca^{2+} во время активация рецептора.

Другой взгляд на альтернативную теорию предоставили наблюдения Henneberry et al того, что гранулярные клетки мозжечка в культуре обычно устойчивы к эксайтотоксическим эффектам глутамата. Но в случае, когда эти нейроны лишены глюкозы, они становятся довольно чувствительными к эксайтотоксическому действию глутамата, опосредованного через NMDA-

рецепторы (Henneberry R.C. et al., 1989). Предполагается, что нарушение клеточного энергетического обмена приводит к выходу из строя Na^+/K^+ АТФазы, которая поддерживает нормальный мембранный потенциал, деполяризацию мембраны, снижение магниевого блока и обеспечивает легкую активацию NMDA-рецептора. Подобные эксперименты Henneberry's показали, что идентичное потенцирование эксайтотоксичности может быть получено путем обработки Na^+/K^+ АТФазы убаином. Аналогичные *in vivo* эксперименты продемонстрировали, что гипотония или гипоксия может усугубить действие экзогенно вводимого экситотоксина (Silverstein F.S. et al., 1986). Меж- и внутрирегиональные различия в патологии среди нейродегенеративных расстройств объясняются тем, что данный процесс заболевания характеризуется изменениями в энергетическом обмене или мембранном потенциале определенных популяций нейронов. Эти изменения, в свою очередь, делают пораженные нейроны восприимчивыми к эксайтотоксическим эффектам глутамата. Кроме того, широкий спектр нарушений клеточной функции может в конечном итоге привести к метаболической дисфункции или деполяризации нейронов и повысить восприимчивость к NMDA-рецептор-опосредованной эксайтотоксической гибели нейронов (Lipton S.A., 2007).

1.2.2. Глутамат–индуцированные повреждения и гибель ДА-ергических нейронов при болезни Паркинсона.

В 1994 году Бергман и др. предположили, что чрезмерная активация глутаматных рецепторов в нигростриатных нейронах может приводить к гибели клеток из-за эксайтотоксичности глутамата (Bergman H. et al., 1994; Hassani O. K. et al., 1996; Benazzouz A. et al., 2002). Исследования показали, что эксайтотоксичность глутамата может вызывать дегенерацию дофаминергических нейронов и сопутствующую двигательную дисфункцию при БП (Sonsalla P.K. et al., 1998; Meredith G.E. et al., 2009). При БП четко описано избирательное нарушение функции митохондрий и снижение

транспорта электронов комплекса I (Schapira A.H. et al., 1990). Эксперименты с введением глутамата в ЧС крысам с индуцированным МФТП паркинсоническим синдромом показали усиление эксайтотоксичности нейромедиатора, нарастание нейродегенерации и соответственно двигательной симптоматики, а использование мемантина как антагониста NMDA-рецепторов нивелировало данный эффект глутамата (Кучеряну В.Г., Крыжановский Г.Н., 2000). Из-за чрезмерной активации NMDA увеличенный приток Ca^{2+} запускает образование АФК, повреждает митохондрии и увеличивает восприимчивость к нейродегенерации (Рис 2). Кроме того, чрезмерная активация AMPA и KAR-рецепторы вызывает перегрузку клеток Na^+ , что приводит к высокой внутриклеточной проницаемости и быстрому набуханию клеток. Увеличение количества свободных радикалов особенно важно для патогенеза БП, поскольку дофаминергические нейроны в ЧСк особенно чувствительны к окислительному стрессу (Wang J. et al., 2020).

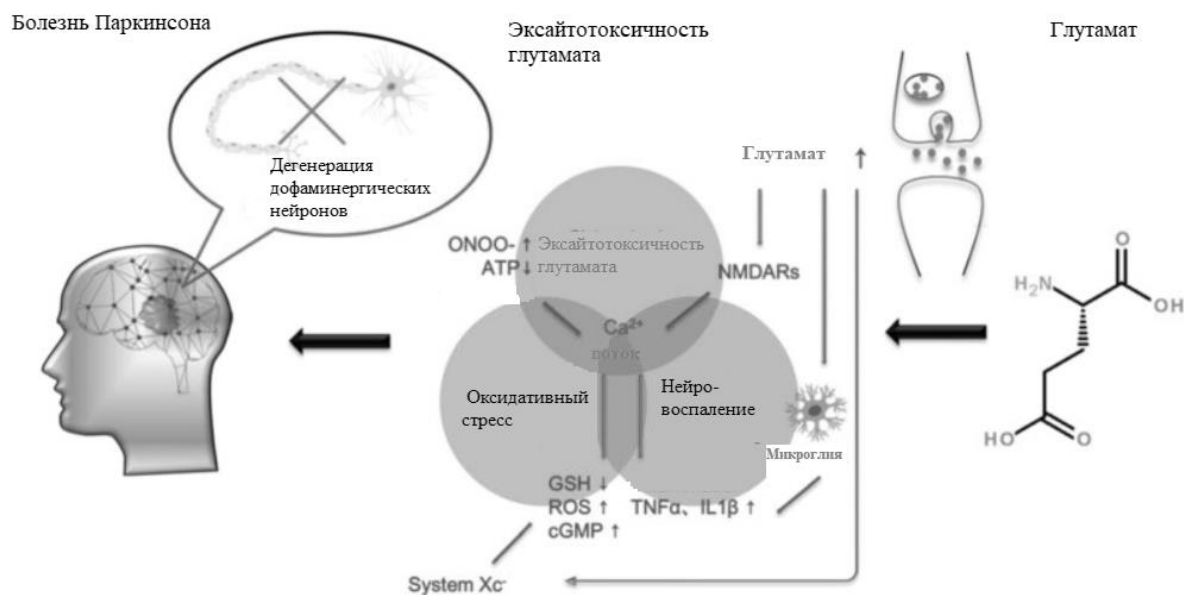


Рис. 2. Механизмы эксайтотоксичности глутамата при БП. Из материалов (Wang J. et al., 2020).

В нейронных синапсах NMDA-рецепторы сгруппированы в постсинаптическом пространстве, которое состоит из многочисленных цитоскелетных и сигнальных белков, некоторые из которых находятся в

тесном контакте с цитоплазматическим доменом глутамат-ионотропных рецепторов в постсинаптической мембране (Kennedy M.B., 2000). Такое накопление NMDA-рецепторов в постсинаптическом компартменте обеспечивает быструю реакцию на высвобождение нейротрансмиттера. Среди белкового комплекса, регулирующего ответ сигнального каскада, α -кальций-кальмодулин-зависимая протеинкиназа II (α -CaMKII) напрямую связана с субъединицами NR2A / NR2B (Gardoni F. et al., 1998) и конкурирует в связывании NR2A с PSD-95. Интересно, что CaMKII- и тирозин-зависимое фосфорилирование NMDA-рецепторов патологически изменено в экспериментальной модели БП (Oh J.D. et al., 1999). С помощью экспериментального моделирования БП установлено, что в нейронах стриатума комплекс NMDA-рецепторов также подвержен выраженному изменению (Ułtas J., Cotman C.W., 1996; Dunah A.W., Standaert D.G., 2001). В настоящее время получены данные о изменениях в структуре самих NMDA-рецепторов как факторе участвующего в патогенезе БП. В частности, неадаптивные формы синаптической пластичности вследствие изменения в составе субъединицы глутаматергических ионотропных рецепторов, то есть NMDA-рецепторов, вносят вклад в клинические особенности БП. Так, неправильная сборка рецепторного комплекса NMDA в синаптическом сайте является основным фактором патогенеза на ранних стадиях БП (Picconi B. et al., 2012).

При БП увеличивать степени эксайтотоксичности глутамата может аномальная агрегация альфа-синуклеина. В эксперименте на модели трансгенных мышей мутантного альфа-синуклеина (A53T) показано, что накопление альфа-синуклеина в астроцитах влияет на транспорт глутамата, вызывая повышение внеклеточных концентраций глутамата и его эксайтотоксичность, что еще больше усугубляет повреждение дофаминергических нейронов (Gu X.L. et al., 2010). Эти данные подчеркивают, что альфа-синуклеин увеличивает высвобождение глутамата. Сама концентрация альфа-синуклеина зависит от высвобождения зависимого от

активности пресинаптического глутамата из окончаний нейронов переднего мозга (Sarafian T.A. et al., 2017). Кроме того, чрезмерная экспрессия альфа-синуклеина увеличивает фосфорилирование NMDA-рецепторов, тем самым, повышая образование субъединиц NR1 и NR2B и чувствительность NMDA-рецепторов NMDAR к развитию эксайтотоксичности глутамата (Yang J. et al., 2016). Альфа-синуклеин также может усиливать эксайтотоксичность глутамата за счет ускорения передачи сигналов AMPA-рецепторов (Hüls S. et al., 2011).

Подходы к уменьшению эксайтотоксичности глутамата при БП помимо использования антагонистов NMDA рецепторов, о чем подробно пойдет речь в других разделах, включали гипотезу, что влияние на уровень обратного захвата глутамата путем увеличения экспрессии EAAT2 будет снижать эксайтотоксическое действие глутамата и предотвратит повреждение нейронов. В основу этой гипотезы легли эксперименты, показавшие, что экспрессия EAAT2 при экспериментальном паркинсоническом синдроме снижена как в моделях с 6-ГОДА, так и с МФТП у мышей в полосатом теле (Holmer H.K. et al., 2005; Chung E.K. et al., 2008). Эпигенетические модификации в гистонах, метилировании ДНК и некодирующей РНК также могут быть перспективной стратегией способствующей уменьшению пагубного действия глутамата в ЧС при БП. Например, вальпроевая кислота (VPA), которая является ингибитором гистондеацетилазы (HDAC), может повышать уровни мРНК / белка GLAST, EAAC1 в астроцитах, тем самым, борясь с нейротоксичностью (Johnson J. Jr. et al., 2018).

1.2.3. Нарушение кальциевого гомеостаза при паркинсонизме

Нарушение гомеостаза Ca^{2+} может представлять собой одно из первых звеньев в патогенезе БП (Cieri D. et al., 2017; Surmeier D.J. et al., 2017; Ludtmann M.H.R., Abramov A.Y., 2018). Избыточное поступление Ca^{2+} внутрь клетки при БП может происходить по нескольким известным путям. В физиологических

условиях потенциал-зависимые Ca^{2+} каналы (L-тип) открываются деполяризацией плазматической мембраны нейронов в ответ на стимуляцию дофамина (Vaarmann A. et al., 2010). При БП каналы Ca^{2+} L-типа автономно активны, что приводит к увеличению цитозольного притока Ca^{2+} (Surmeier D.J., Schumacker P.T., 2013). Недавно было продемонстрировано, что каналы транзистентного рецепторного потенциала (TRPC1) регулирует активность Ca^{2+} каналов L-типа во взрослых дофаминергических нейронах в области ЧСк (Sun Y. et al., 2017). Одновременно, α -синуклеин повышает уровни цитозольного Ca^{2+} за счет образования пор в плазматической мембране, позволяя проходить внеклеточному Ca^{2+} (Angelova P.R. et al., 2016). Но лидирующим по в поставках токсических концентраций Одновременно, α -синуклеин повышает уровни цитозольного Ca^{2+} за счет образования пор в плазматической мембране, позволяя проходить внеклеточному Ca^{2+} (Angelova P.R. et al., 2016). Но лидирующим по в поставках токсических концентраций Ca^{2+} в условиях эксайтотоксичности глутамата являются NMDA рецепторы, что становится определяющим фактором при наблюдаемых поражениях при БП (Doble A., 1999). в условиях эксайтотоксичности глутамата являются NMDA рецепторы, что становится определяющим фактором при наблюдаемых поражениях при БП (Doble A., 1999).

Изучение ионных механизмов глутаматной нейротоксичности на культивируемых клетках гиппокампа, мозжечка или коры головного мозга с помощью флуоресцентной микроскопии доказало, что именно чрезмерное повышение концентрации Ca^{2+} инициирует каскад внутриклеточных процессов, завершающихся гибелью нейрона. Исследования в этой области показали, что гиперстимуляция глутаматом и следующая за этим кальциевая перегрузка нейрона не столько связана с повышенной Ca^{2+} проницаемостью мембраны, сколько с замедленной инактивацией входящего тока Ca^{2+} в ответ на длительное воздействие глутамата на NMDA рецепторы. Имеет место и нарушение выведения избытка концентрации Ca^{2+} из цитозоля посредством $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ обменника, что можно объяснить падением уровня внутриклеточного

АТФ, снижением рН цитозоля, гиперпродукцией АФК и/или NO. Также имеется корреляция между величиной митохондриального потенциала и нарушением процесса восстановления концентрации Ca^{2+} , что связано со снижением захвата Ca^{2+} митохондриями из-за деполяризации их внутренней мембраны в ответ на сильный входящий поток Ca^{2+} внутрь органеллы, что при сохраненном токе Ca^{2+} через глутаматные каналы в цитозоль клетки еще значительно повышает концентрацию Ca^{2+} до достижения уровня высокого плато. Эксперименты показали, что длительное воздействие глутамата на клетку вызывает кальциевую дисрегуляцию из-за глубокого нарушения сигнализации (вход, выход Ca^{2+} , Ca^{2+} -захват митохондриями), что приводит к апоптозу (Ходоров Б.И., 2002). Доказано, что отсроченное накопление Ca^{2+} в нейронах (отсроченная кальциевая дисрегуляция, ОКД) и деполяризация митохондриальной мембраны в ответ на глутамат являются необходимыми условиями для запуска гибели клеток в данных обстоятельствах (Abramov A.Y., Duchen M.R., 2008). Каскад патологических реакций при этом развивается по следующему сценарию: 1) Воздействие эксайтотоксических уровней глутамата на нейроны в культуре приводит к начальному временному увеличению цитозольной концентрации Ca^{2+} с последующим замедленным устойчивым повышением концентрации Ca^{2+} и развитием ОКД, которая совпадает с глубоким коллапсом потенциала митохондриальной мембраны и считается первым триггером гибели нейронов (Abramov A.Y., Duchen M.R., 2008). 2) Вторичное увеличение Ca^{2+} во время продолжительной глутаматной нагрузки происходит в основном из-за глубокой митохондриальной деполяризации, которая делает невозможным митохондриальный захват Ca^{2+} в ответ на непрерывное поступление Ca^{2+} в клетку. Также прогрессирующее снижение митохондриального НАДН во время воздействия глутамата значительно увеличивает чувствительность митохондрий к внутриклеточной Са-нейротоксичности (Частухин Д.С. и др., 2013).

Исследования, посвященные взаимодействию между дофамином и активностью NMDA-рецепторов, показывают, что агонисты рецепторов

дофамина и D2 или D4 значительно подавляют токи через NMDA-рецептор (Higley M.J., Sabatini B.L., 2010). Работы группы Vaarmann показали, что дофамин в культуре способен подавлять эксайтотоксичность глутамата и гибель нейронов, предотвращая или значительно замедляя развитие ОКД (Vaarmann A. et al., 2013). Отсутствие дофамина, вызванное его истощением в полосатом теле при БП, может, таким образом, привести к неингибированной передаче сигналов кальция, индуцированной глутаматом, и усиливать кальциевую дисрегуляцию, создавая замкнутый патологический круг. Известно, что дофаминергические нейроны используют кальциевые каналы типа L_v для автономной стимуляции и поэтому подвергаются воздействию высоких уровней кальция в течение длительных периодов времени. Блокада этих кальциевых каналов с сопутствующим снижением цитозольного кальция в дофаминовых нейронах ЧСк снижает их чувствительность к токсинам, связанным с БП (Chan C.S. et al., 2007).

Другое нарушение кальциевой регуляции в нейронах ЧС имеет генетически-запрограммированные механизмы, изучение которых проливает свет на избирательную чувствительность ДА-нейронов ЧС при БП. Так, исследования Gandhi с использованием нокаутированных по гену PINK1 (митохондриальная киназа, которая выполняет нейропротекторную функцию) мышей показало, что нейроны ЧС таких животных имеют более высокие базальные уровни митохондриального Ca²⁺ из-за нарушения оттока кальция из митохондрий (Gandhi S. et al., 2009). Поэтому в нейронах с дефицитом PINK1 наблюдается индуцированное дофамином достаточное увеличение митохондриального Ca²⁺, чтобы вызвать деполяризацию митохондриальной мембраны. Эту вызванную дофамином деполяризацию мембраны митохондрий можно предотвратить с помощью хелатирования кальция как в нейронах, так и в астроцитах. Таким образом, в работе Gandhi показано, что врожденная дисрегуляция кальция в митохондриях, вызванная потерей функции PINK1, делает нейроны особенно уязвимыми для повторяющихся повышений уровня кальция, индуцированных дофамином. В клетках с

дефицитом PINK1 дофамин способен индуцировать открытие поры с переходной проницаемостью (ППП) на мембране митохондрий посредством двух основных процессов, которые могут действовать, усиливая друг друга: передача сигналов кальция и генерация АФК. Иначе говоря, дофамин не токсичен для нормальных нейронов, но в некоторых патологических состояниях, связанных с дисфункцией митохондрий и дисрегуляцией кальция, дофамин может вызывать токсичность, что увеличивает сомнение в эффективности заместительной терапии БП (Gandhi S. et al., 2012) или увеличивает степень противоречий при рассмотрении вопроса о токсичности и эффективности заместительной терапии при БП (Gandhi S. et al., 2012).

Помимо опосредованного эксайтотоксичностью повышения внутриклеточного кальция, как ранее указано, повторяющееся и продолжительное повышение цитозольных уровней этого катиона за счет активации Ca^{2+} каналов L-типа влияет на деполяризацию митохондрий и продукцию АФК при БП, тем самым, увеличивая восприимчивость к гибели нейронов (Surmeier D.J., Schumacker P.T., 2013). Медленные цитозольные колебания уровней Ca^{2+} в ДА-нейронах ЧСк служат трем дополнительным функциям. Во-первых, даже если они не требуются для поддержания автономной электрической активности, они помогают поддерживать медленные тонические импульсы в этих нейронах (Putzier I. et al., 2009). Во-вторых, ионы Ca^{2+} положительно модулируют экспрессию и активность ферментов, участвующих в синтезе дофамина, обеспечивая адекватный запас нейротрансммиттера (Aumann T., Horne M., 2012). В-третьих, они способствуют проникновению Ca^{2+} в митохондрии в специализированных соединениях с эндоплазматическим ретикулумом; митохондриальный кальциевый вход стимулирует окислительное фосфорилирование и продукцию АТФ. В принципе, этот прямой контроль окислительного фосфорилирования помогает гарантировать, что биоэнергетические потребности клеток будут обеспечены. Внутриклеточные уровни АТФ не попадают в диапазон, который может вызвать защитную активацию каналов K-АТР, которая вызовет прекращение

функциональной деятельности (Dragicevic E. et al., 2015). Но стимуляция окислительного фосфорилирования в отсутствие сильной потребности в АТФ (то есть большую часть времени) приводит к гиперполяризации митохондрий, ретроградному потоку электронов через цепь переноса электронов и увеличению производства АФК и активных форм азота (Pacelli C. et al., 2015). В свою очередь антиоксидантная защита митохондрий значительна, но несовершенна (Scheibye-Knudsen M. et al., 2015; Nicholls D.G., Budd S.L., 2000). АФК могут повреждать белки, липиды и ДНК, особенно в митохондриях. Устойчивый митохондриальный окислительный стресс может быть основным фактором, лежащим в основе снижения митохондриальной функции нейронов группы риска у людей с возрастом (Reeve A. et al., 2014). Чрезмерное высвобождение Ca^{2+} из эндоплазматического ретикулума (ЭР) вызывает постоянную митохондриальную перегрузку Ca^{2+} , ведущую к митохондриальной дисфункции, которая запускает каскад апоптоза в нейронах (Soman S.K. et al., 2019). ЭР является основным внутриклеточным хранилищем Ca^{2+} (Lam A.K., Galione A., 2013), где Ca^{2+} - связывающие шапероны опосредуют сворачивание белка. Известно, что сеть ЭР распространяется по всей клетке и образует соединения с другими клеточными органеллами, такими как митохондрии, плазматическая мембрана и лизосомы, что имеет решающее значение для координации и интеграции внутриклеточных сигналов Ca^{2+} , необходимых для коммуникации и функционирования органелл. Приблизительно 5–20% поверхности митохондрий располагается близко (на расстоянии 10–30 нм) к мембранам ЭР, эти специализированные области ЭР называют митохондриально-ассоциированными мембранами (МАМ). Множество исследований продемонстрировало, что митохондрии связываются напрямую с ЭР через МАМ, чтобы регулировать ряд фундаментальных клеточных процессов. К ним относятся гомеостаз Ca^{2+} , липидный обмен, митохондриальная продукция АТФ, митохондриальный транспорт и биогенез, ЭР стресс и развернутый белковый ответ и аутофагию (Krols M. et al., 2016). Таким образом, любое

повреждение контактов ЭР и митохондрий представляет собой правдоподобный путь объяснения многих особенностей БП. В данном контексте становится интересен факт того, что сверхэкспрессия одного из специфичных для БП маркеров - мутантного α -синуклеина повреждает ряд физиологических процессов, среди которых гомеостаз Ca^{2+} (Cali T. et al., 2012). Так, в работе Paillusson и соавторов демонстрируется, что индуцированное α -синуклеином ослабление контактов ЭР с митохондриями влияет на обмен Ca^{2+} между двумя органеллами и влечет за собой патологический каскад, приводящий к нейродегенерации (Paillusson S. et al., 2017).

Терапевтические подходы, которые стабилизируют нейрональный гомеостаз Ca^{2+} , могут замедлять или предотвращать дегенерацию нейронов при острых и хронических нейродегенеративных состояниях. Хотя многие различные лекарственные средства, влияющие на приток Ca^{2+} , продемонстрировали эффективность на экспериментальных моделях инсульта, БА и других нейродегенеративных расстройств, однако очень немногие были эффективными в клинических испытаниях. Тем не менее, полученные значительные эффекты блокаторов Ca^{2+} -каналов L-типа нимодипина (Tollefson G.D., 1990) и блокатора открытых каналов NMDA мемантина (Bullock R., 2006) у пациентов с БА показали, что Ca^{2+} -регулирующие системы являются перспективными мишенями. Однако лекарства, которые подавляют приток Ca^{2+} , могут нарушать нормальные функции нейронов, что особенно важно при нейродегенеративных расстройствах, требующих длительного лечения, включая БП.

1.2.4. Действие антагонистов NMDA-глутаматных рецепторов

Исследования применения антагонистов NMDA рецепторов ведется в различных направлениях. Так, недавнее одобрение препарата эскетамина в США для лечения большого депрессивного расстройства (БДР) стало

кульминацией почти 30-летних исследований, посвященных рецептору NMDA как мишени для разработки антидепрессантов, применимым в случае фармакорезистентных форм депрессивного расстройства (Pochwat B. et al., 2019). Антагонисты NMDA-рецепторов, такие как кетамин, мемантин, декстрометорфан, препараты магния рассматриваются также в качестве перспективных препаратов для купирования острого болевого синдрома и лечения хронической боли (Kreutzwiser D., Tawfic Q. A., 2019).

Поскольку чрезмерная активация NMDA-рецепторов считается основным фактором, вызывающим эксайтотоксичность глутамата (Choi D.W., 1987), блокирование этих рецепторов является потенциальной стратегией предотвращения эксайтотоксичности и защитой нейронов от повреждения и гибели. Такая терапия применима как для коррекции клинической симптоматики, например в случае БП, так и для нейропротекции. Однако большинство антагонистов NMDA рецепторов являются конкурентными антагонистами, которые могут влиять на физиологическую функцию мозга и иметь негативные побочные эффекты (Lipton S.A., 2006). Антагонисты NMDA-репортеров включают конкурентные антагонисты (например, SDZ 220-581, MDL 100, 453), неконкурентные антагонисты (например, МК-801, декстрорфан, PD 174494, CP-101, 606, мемантин, амантадин, кетамин), а также антагонисты сайтов глицина (например, MC3 2/570, L-701,324, 7-хлорокинуренат, (R) -НА-966) (Johnson K.A. et al., 2009).

Антагонисты NMDA-рецепторов хорошо зарекомендовали себя в борьбе с таким тяжелым побочным эффектом заместительной терапии леводопой при БП как дискинезия (Vanle B. et al., 2018). Антагонисты NMDA-рецепторов могут ослаблять каталепсию и противодействовать ригидности, вызванной антагонистами дофаминовых рецепторов у крыс, а также акинезии и другим двигательным осложнениям у грызунов со сниженным содержанием моноаминов (Melo-Thomas L. et al., 2018). Аналогичные эффекты были также показаны в эксперименте на модели обезьян, обработанных ифенпродиллом, которым предворительно вводили МФТП (Nash J.E. et al., 2000). Кроме того,

было установлено, что подпороговые дозы некоторых антагонистов NMDA-рецепторов синергетически увеличивают антипаркинсоническую эффективность леводопы и других препаратов, таких как 7-нитроиндазол и опиоидный гликопептид лактоморфин, а также профилактически предотвращают появление изменений моторной реакции, связанной с хроническим введением леводопы на моделях БП у крыс и приматов (Flores A.J. et al., 2018). Изображения позитронно-эмиссионной томографии (ПЭТ) подтвердили повышенную активность NMDA-рецепторов в определенных моторных областях коры головного мозга с леводопа-индуцированной дискинезией (ЛИД) у пациентов с БП (Ahmed I. et al., 2011). На фоне использования антагонистов NMDA-рецепторов было показано, что блокада глутаматных рецепторов не только может уменьшить симптомы БП, но может быть также нейропротекторным, предотвращая прогрессирование заболевания путем ингибирования глутаматергической-опосредованной эксайтотоксичности (Majláth Z., Vécsei L., 2014), стимулирования образования синапсов и выброса нейтрофических факторов (Maeng S. et al., 2008).

Для того чтобы быть клинически приемлемой, антиэксайтотоксическая терапия должна блокировать чрезмерную активацию NMDA-рецепторов, сохраняя их нормальную функцию, чтобы избежать побочных эффектов. Препараты, которые конкурируют с глутаматом или глицином (Рис. 3) в сайтах связывания агонистов, блокируют нормальную функцию и до сих пор не прошли клинических испытаний из-за побочных эффектов (сонливость, галлюцинации и даже кома) (Koroshetz W.J., Moskowitz M.A., 1996; Hickenbottom S.L., Grotta J., 1998; Lutsep H.L., Clark W.M., 1999; Olivares D. et al., 2012). Неконкурентные антагонисты, такие как МК-801, являются эффективными супрессорами эксайтотоксичности, которые действуют аллостерически (т.е. его сайт связывания отличается от сайта агониста) в ионном канале, но из-за их высокой аффинности, медленной кинетики и меньшей потенциал-зависимой активности, блокируют канал на клинически неприемлемый период времени (Chen H.S., Lipton S.A., 2006).

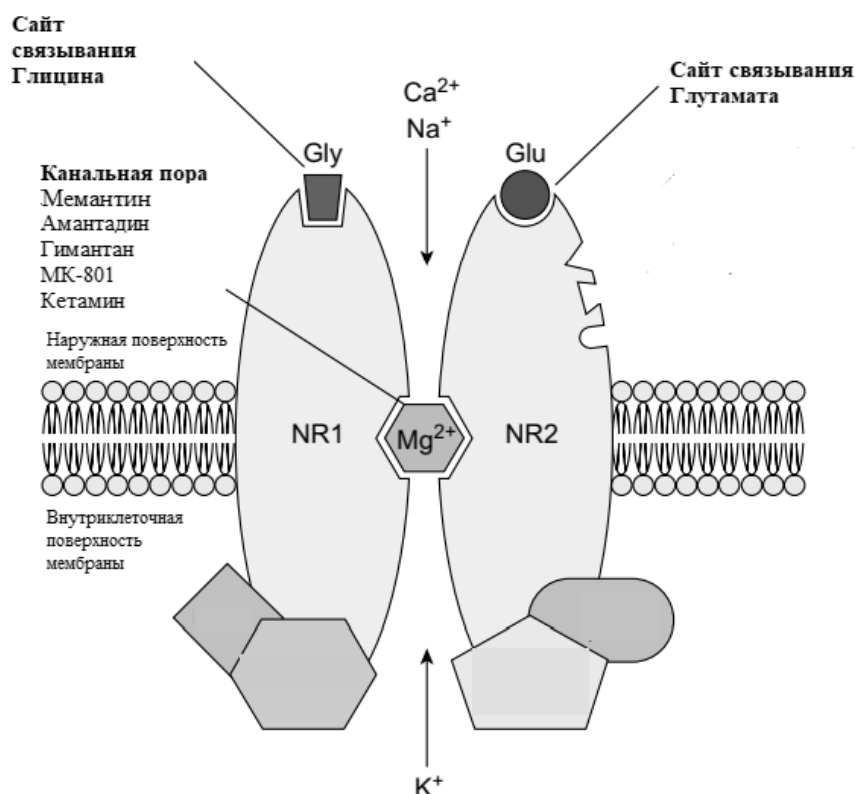


Рис. 3. Возможные места действия препаратов (Мемантин, Амантадин, Гимантан, МК-801, Кетамин) внутри белкового комплекса рецептора NMDA. Внеклеточные сайты включают: сайт связывания глицина (Gly) на субъединицах NR1, сайт связывания глутамата (Glu) на субъединицах NR2 и сайты связывания внутри поры канала, которые перекрываются сайтом связывания магния (Mg²⁺). d-серин является эндогенным коагонистом в сайте связывания глицина. Представлены места действия ранее изученных или применяемых в настоящее время препаратов. Субъединицы NR2 также содержат сайты действия полиаминов, цинка и протонов. Из материалов (Kalia L.V. et al., 2008).

Препараты, которые могут преимущественно блокировать патологические уровни глутамата, являются антагонистами, которые отличаются от неконкурентных антагонистов тем, что им требуется активация рецептора агонистом, прежде чем препарат сможет связываться с отдельным аллостерическим сайтом связывания. Этот механизм действия, в отличие от конкурентных или неконкурентных антагонистов, обусловлен блокадой

канала NMDA-рецептора преимущественно, когда он чрезмерно открыт, и останавливает чрезмерный поток кальция внутрь клетки (Robinson D.M., Keating G.M., 2006). Мемантин существенно не накапливается в канале, чтобы препятствовать нормальной синаптической передаче (Chen H.S., Lipton S.A., 2006). Полученные экспериментальные данные свидетельствуют о том, что мемантин действует по описанному механизму, учитывая, что он является неконкурентным антагонистом NMDA-рецептора с низким, умеренным сродством (Olivares D. et al., 2012).

1.3. Нейровоспаление. Изменение цитокинового статуса при болезни Паркинсона

Нейровоспаление - важная часть патогенеза БП. В нормальных условиях микроглия играет роль в деградации α -синуклеина и фагоцитозе поврежденных нейронов, что является нейропротекторным свойством микроглии при сбалансированной активации. Первоначальная активность про- и противовоспалительных факторов, которые включают цитокины, хемокины и активные формы кислорода и азота, запускают процессы восстановления нейронов. Однако постоянное присутствие агрегатов белка α -синуклеина приводит к длительной активации воспалительного процесса (Phani S. et al., 2012; Goswami P. et al., 2017). Исследования *in vitro* дали основания предположить, что отложение α -синуклеина и воспалительные изменения усиливают патогенную активность друг друга и участвуют в прогрессировании нейродегенерации (Gao H.M. et al., 2011). Активация микроглии отмечалась у крыс после избыточной экспрессии α -синуклеина человека в дофаминовых нейронах среднего мозга (Ulusoy A. et al., 2010). Исследования с использованием неинвазивной позитронно-эмиссионной томографии (ПЭТ) с использованием РК-11195, лиганда периферического бензодиазепинового рецептора (PBR; также известного как митохондриальный транслокаторный белок 18 кДа или TSPO), который селективно экспрессируется активированной микроглией, дополнительно

подтвердили возникновение активации микроглии у пациентов с БП (Gerhard A. et al., 2006).

Обширная активация микроглии внутри и вокруг ЧСк была впервые обнаружена более 30 лет назад при изучении материалов аутопсии пациентов с БП (McGeer P.L. et al., 1988). У макрофагов отмечена патологическая миграция из кровеносных сосудов в ЦНС во время воспаления и трансформация в клетки микроглии, которые задействованы в патофизиологических механизмах заболеваний центральной нервной системы (Chen L. et al., 2016). Микроглия поддерживает хроническое воспаление в патогенезе различных нейродегенеративных заболеваний. Микроглия активируется в течение нескольких минут и может сохранять активное состояние долгое время или на протяжении жизни организма (Ramlackhansingh A.F. et al., 2011). Микроглия активируется за счет увеличения выработки провоспалительных и противовоспалительных цитокинов, хемокинов, а также глутамата (Hoeijmakers L. et al., 2016). Показано, что уровни провоспалительных цитокинов повышены в ЧС, полосатом теле и спинномозговой жидкости у пациентов с БП (Nagatsu T. et al., 2000). Так, ген LRRK2, задействованный в развитии повреждения митохондрий и способный увеличить восприимчивость ДА-ергических нейронов к повреждению, был обнаружен в активированных микроглиальных клетках, а мутация R1441G усиливала высвобождение провоспалительных цитокинов из активированной микроглии и увеличивала гибель клеток в исследуемых образцах (Gillardot F. et al., 2012). Исследования показали, что провоспалительный цитокин фактора некроза опухоли- α (ФНО- α) в органотипических срезах гиппокампа вызывает незначительное повреждение нейронов, однако когда концентрация глутамата повышается, нейротоксичность ФНО- α значительно увеличивается (Zou J.Y., Crews F.T., 2005). Для AMPA-рецепторов, которые являются не проницаемыми для ионов Ca^{2+} , исследования показали, что низкие дозы ФНО- α играют нейропротекторную роль через рецептор фактора некроза тканей-2 (TNFR-2),

в то время как высокие дозы ФНО- α увеличивают синаптический транспорт кальций-проницаемых AMPA через TNFR-1 и увеличивает эксайтотоксичность (Blaylock R.L. et al., 2017). Взаимодействие между рецепторами ИЛ-1 β и NMDAR также может приводить к повышенной эксайтотоксичности, а экспрессия рецепторов ИЛ-1 β на постсинаптической мембране стимулируется активацией NMDA-рецепторов (Gardoni F. et al., 2011). Воспаление может изменять действие провоспалительных цитокинов, таких как ФНО- α и ИЛ-1 β , а также может усиливать действие глутамин и ингибировать глутаминдегидрогеназу и глутаминсинтазу, тем самым усиливая эксайтотоксичность глутамата (Brown G.C., Vilalta A., 2015). Эти два фермента играют решающую роль в метаболизме глутамата, и оба чувствительны к окислительному стрессу в условиях воспаления (Aguirre J, 1989). Глутаминсинтаза катализирует превращение глутаминовой кислоты в глутамин, снижая риск эксайтотоксичности. Глутаматдегидрогеназа, которая превращает глутамат и кетоглутарат, также защищает от повышенного уровня глутамата в нервной ткани. Напротив, обратный переносчик цистеин-глутаминовая кислота (система Хс-) может обменивать внеклеточный цистин на внутриклеточную глутаминовую кислоту, обеспечивая, тем самым необходимое сырье для синтеза глутатиона глиальными клетками. Кроме того, при патологическом состоянии он также становится фактором возбуждающей токсичности глутаминовой кислоты. В целом, когда воспаление вызвано активацией микроглии, существует тесная связь между воспалением и рецепторами глутамата. Воспаление может вызвать чрезмерное высвобождение глутамата. Кроме того, накопление внеклеточного глутамата также может усилить воспаление, образуя порочный круг (Blaylock R.L., 2017).

Введение МФТП подопытным животным в эксперименте приводило к обширной активации микроглии как у мышей, так и у нечеловеческих приматов (Barcia C. et al., 2004). В работе с моделированием паркинсонизма на мышцах с помощью МФТП было показано увеличение уровней

провоспалительных цитокинов (ИЛ-1 β , ИЛ-6, ФНО- α и Интерферон- γ) в среднем мозге по сравнению с контрольной группой (Rodríguez-Cruz A. et al., 2019), что подтверждает ранее выдвинутый тезис, что активация микроглии сопровождается экспрессией и высвобождением провоспалительных цитокинов, включая ФНО- α , ИЛ-1 β , ИЛ-6 и Интерферон- γ (Perry V.H., Holmes C., 2014). Анализ сыворотки пациентов с БП показал повышение экспрессии провоспалительных цитокинов, таких как ИЛ-1 β , ИЛ-2, ИЛ-6, Интерферон- γ , и ФНО- α , а также противовоспалительного цитокина ИЛ-10 (Brodacki B. et al., 2008). Повышенные концентрации ИЛ-6 в плазме были связаны с более высоким риском развития БП (Pereira J.R. et al., 2016). Также наблюдалось повышение сывороточных уровней фактора ингибирования миграции макрофагов (MIF) (Nicoletti A. et al., 2011). В соответствии с этими данными, те же самые провоспалительные цитокины (например, ФНО- α , ИЛ-1 β , ИЛ-6) были обнаружены в образцах спинномозговой жидкости (Blum-Degen D. et al., 1995). Активация микроглии первоначально наблюдалась в ЧС и вдоль нигростриатного тракта в 6-ГОДА модели БП у крыс и мышей (He Y. et al., 2001). Кроме того, реактивные астроциты были идентифицированы в ЧС и полосатом теле крыс после воздействия 6-ГОДА (Rodrigues R.W. et al., 2001). Широко известно, что модель 6-ГОДА вызывает довольно острую массивную дегенерацию дофаминергических нейронов в нигростриатуме. Маккой и др. показали, что нейтрализация провоспалительного цитокина ФНО- α приводила к снижению нигростриатальной дегенерации в этой модели (McCoey M.K. et al., 2008). Результаты мета-анализа 2016 года продемонстрировали более высокие периферические концентрации ИЛ-6, ФНО- α , ИЛ-1 β , ИЛ-2, ИЛ-10, С-реактивного белка у пациентов с БП, усиливая клинические доказательства того, что БП сопровождается воспалительной реакцией (Qin X.Y. et al., 2016). В работе Williams-Gray после изучения 230 случаев ранней БП и 90 пациентов из группы контроля авторы обнаружили доказательства повышения ФНО- α , ИЛ-1 β , ИЛ-2 и ИЛ-10 в крови и отметили, что провоспалительные фенотипы

связаны с более быстрым прогрессированием клинических симптомов чего БП (Williams-Gray C.H. et al., 2016).

Вдобавок ко многим давним сообщениям об устойчивой активации микроглии, особенно в ЧС пациентов с БП, более свежие данные подтверждают роль Т-клеток в патогенезе БП (Sulzer D. et al., 2017). Установлено, что CD8+и CD4+Т-клетки присутствуют в сравнительно больших количествах в ЧС мозга пациентов с БП (Brochard V. et al., 2009).

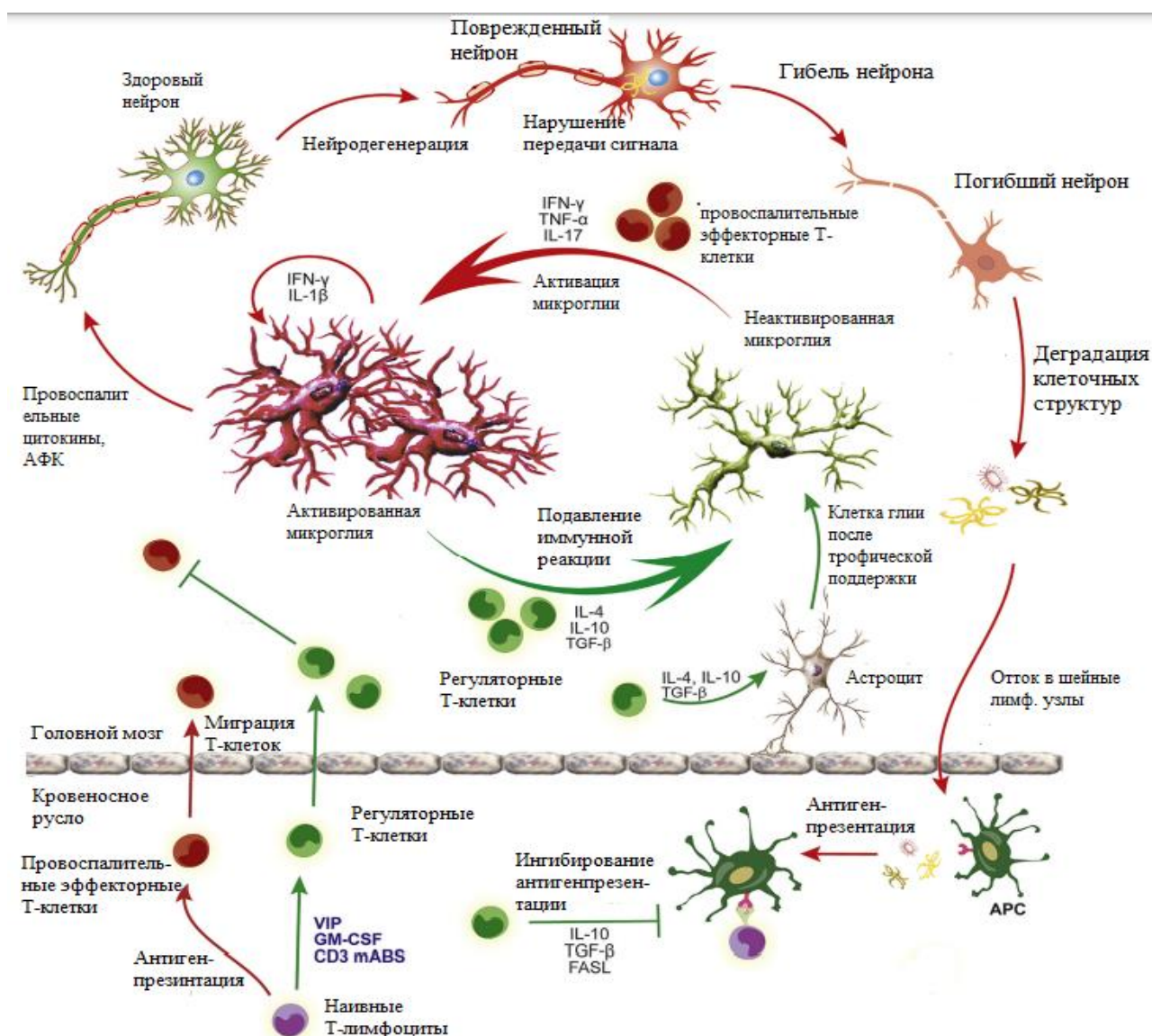


Рис. 4. Нейровоспаление. Активированная регуляторными Т-клетками посредством астроцитов и напрямую микроглия секретирует множество провоспалительных факторов, таких как ФНО-α, интерлейкин-1β (ИЛ-1β),

ИЛ-6, ИЛ-12, АФК, поддерживает нейродегенерацию ДА-нейронов в ЧС. Гибель этих клеток приводит к активации антигенпрезентирующих клеток в лимфатических узлах, что в свою очередь провоцирует трансформацию наивных Т-лимфоцитов и миграцию регуляторных и провоспалительных Т-клеток в ткань головного мозга. **Из материалов** (Schwab A.D. et al., 2020)

Воспаление, связанное с активацией микроглии, увеличивает проницаемость гемато-энцефалического барьера (ГЭБ) и способствует миграции адаптивных иммунных клеток (Рис.4), из-за градиентов хемоаттрактантов, генерируемых воспалительными очагами в головном мозге (Garretti F. et al., 2019). Это увеличение проницаемости ГЭБ, а также инфильтрация Т- и В-клетками было отмечено на экспериментальных моделях БП, вызванных введением 6-ГОДА или МФТП (Zhang Q.S. et al., 2017). Эти адаптивные иммунные клетки расположены в большем количестве в ЧС пациентов с БП, чем в здоровой контрольной группе (Garretti F. et al., 2019). Т-клетки периферической крови пациентов с БП распознают α -синуклеин, при этом большая часть секретируется преимущественно ИЛ-5, а небольшая популяция секретирует Интерферон- γ (Рис 4). Расположение иммунных клеток в ЧСк и распознавание Т-клетками эпитопов, происходящих от α -синуклеина, позволяет предположить, что адаптивные иммунные клетки могут быть тропными к эпитопам, происходящим из дофаминергических клеток, таким образом участвуя в аутоиммунном ответе против α -синуклеина (Sulzer D. et al., 2017).

2. Моделирование паркинсонического синдрома у грызунов

2.1. Моделирование паркинсонического синдрома с помощью пронеуротоксина 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридина (МФТП) у мышей.

МФТП - один из наиболее часто используемых нейротоксинов в моделях БП на животных. МФТП - это липофильная молекула, которая позволяет легко преодолевать гематоэнцефалический барьер (Chia S.J. et al., 2020). После

системного введения МФТП может окисляться до мощного дофаминергического нейротоксина МФП⁺ с помощью моноаминоксидазы В в астроцитах. МФП⁺ является токсичным метаболитом, который легко абсорбируется дофаминергическим нейроном через переносчик дофамина (DAT) из-за его структурного сходства с дофамином (Martí Y. et al., 2017). В последствии МФП⁺ вызывает прогрессирующую гибель ДА-ергических нейронов в ЧС вместе со снижением уровня дофамина в стриатуме (Bezard E. et al., 1999). Механизм гибели клеток индуцируется МФП⁺ ингибированием комплекса I в митохондриальном дыхании. Это приводит к быстрому снижению концентрации АТФ в ЧС и стриатуме с последующим развитием апоптоза и некроза ДА-ергических нейронов (Sayre L.M. et al., 1989). Сообщалось об изменении некоторых биомаркеров у мышей с МФТП-индуцированным ПС, что соответствует аналогично пациентам с БП (Kim A. et al., 2019). Этот результат может подтвердить достоверность модели МФТП-индуцированного ПС у мышей. Топографическая картина потери дофаминергических нейронов в ЧС и стриатуме действительно повторяет картину БП (Petroske E. et al., 2001).

История МФТП начинается с 1979 года, когда нейротоксин стал побочным продуктом при попытке синтезировать синтетический героин (Davis G.C. et al., 1979). Этот синтетический наркотик вызывал развитие выраженного паркинсонического синдрома в короткие сроки (Ballard P.A. et al., 1985), у всех этих пациентов была резкая и почти немедленная реакция на леводопу. Доктор Лэнгстон осознал потенциал этого токсина для создания достоверной модели БП, и вскоре выявил эффекты введения МФТП у приматов и описал нарушения, которые напоминали двигательные нарушения идиопатической формы БП (Langston J.W. et al., 1984). В 1986 году Sonsalla и Heikkila показали, что МФТП может оказывать подобные эффекты на моделях с использованием мышей (Sonsalla P.K., Heikkila R.E., 1986). Модель МФТП-индуцированного ПС безусловно полезна для понимания механизмов гибели ДА-нейронов. Использование модели МФТП-индуцированного ПС на животных для

разработки терапевтических подходов и лекарственных веществ в борьбе с БП на сегодняшний день является перспективным. Эта модель предоставляет возможность анализа патофизиологических механизмов дисфункции митохондрий, истощения энергии (АТФ), продукции свободных радикалов, апоптоза и эксайтотоксичности глутамата в патогенезе БП.

В дополнение к своей актуальности при изучении гибели клеток, модель ПС, индуцированного с помощью МФТП также дает возможность изучать вызванную повреждением изменения в нейропластичности. Так, головной мозг после введения МФТП мыши восстанавливает уровень стриатального дофамина через несколько недель или месяцев после введения токсина. У мышей токсин, который обычно вводят внутрибрюшинно путем повторных болюсных инъекций в течение короткого периода времени (то есть четырех доз МФТП, каждые 2 часа в течение 1 дня), по существу вызывает тоже самое избирательное поражение, которые наблюдаются у обезьян, инъецированных МФТП (Blandini F., Armentero M.T., 2012)

1.1.1. Механизм селективного токсического действия МФТП на ДА-ергические нейроны

МФТП является липофильным соединением и после системного введения быстро пересекает гематоэнцефалический барьер (ГЭБ). Попадая в мозг, МФТП попадает в астроциты и метаболизируется с помощью МАО-В в его активный метаболит в МФП⁺. МФП⁺ переносится нейронами через транспортер дофамина и может накапливаться в везикулах путем поглощения VMAT2 (Javitch J.A. et al., 1985). Почему дофаминергические нейроны чувствительны к действию МФП⁺? Вероятно, МФП⁺ служит отличным субстратом для сайта поглощения дофамина (Shen R.S. et al., 1985), и, таким образом, избирательно поглощаются и концентрируются в ДА-ергических нейронах, тогда как астроциты высвобождают, а не концентрируют его до токсического уровня. Интересно отметить, что дофаминергические нейроны вентральной области покрышки (ВОП) не подвержены выраженной дегенерации при воздействии

МФТП, даже несмотря на то, что они также имеют участки поглощения дофамина (возможные объяснения включают различия в сродстве к захвату (Blanchard V. et al., 1994) или наличие кальбиндина (Lavoie B., Parent A., 1991) в нейронах ВОП, что оказывает нейропротективное действие. После поглощения нейронами МФП⁺ начинает накапливаться в митохондриях против градиента концентрации за счет того, что представляет собой новую систему захвата, которая активируется трансмембранным потенциалом (Ramsay R.R. et al., 1986). Как только он достигает токсичных уровней в митохондриях, ингибируется комплекс I дыхательной цепи митохондрий (Ramsay R.R. et al., 1986), что приводит к высвобождению активных форм кислорода и снижению продукции АТФ. В результате, АТФ быстро уменьшается в областях стриатума и ЧС, которые более восприимчивы к нейротоксичности, вызванной МФТП (Chan P. et al., 1991). Примечательно, что значительное истощение АТФ может быть результатом ингибирования всего лишь 25% комплекса I (Davey G.P. et al., 1998). После воздействия МФТП или МФП⁺ гидропиридин или его метаболит выводится из мозга в течение 12 часов, а истощение АТФ больше не проявляется (Chan P. et al., 1993). Комплекс I контролирует перенос одного электрона от НАДН к коферменту Q и перенос двух протонов в митохондриальное межмембранное пространство, которые затем используются комплексом V для синтеза АТФ из АДФ, основного источника энергии клетки. МФП⁺ связывается с НАДН-дегидрогеназой и ингибирует комплекс I цепи переноса электронов. МФП⁺ может увеличить утечку электронов в комплексе I, тем самым увеличивая митохондриальную генерацию супероксидных радикалов. Ингибирование комплекса I приводит к неполному восстановлению кислорода и образованию потенциально вредных АФК, в том числе супероксидных радикалов, перекиси водорода (H₂O₂) под действием супероксиддисмутаза и гидроксильных радикалов, генерируемых железо-опосредованной реакцией (Sherer T.B. et al., 2002). С другой стороны, *in vitro* МФП⁺ вызывает перераспределение везикулярного дофамина в цитоплазму, что приводит к образованию токсичных АФК (Lotharius J., Brundin P., 2002).

Было также показано, что воздействие средних доз МФТП у приматов, повреждает везикулярный переносчик моноаминов типа 2, что снижает накопление дофамина в клетке, тем самым увеличивая уровень цитозольного дофамина, что также приводит к последующему образованию АФК (Chen M.K. et al., 2008).

Гибель ДА-нейронов после введения МФТП происходит путем апоптоза. Митохондриальный апоптотический путь требует высвобождения цитохрома С из митохондрий в связи с открытием поры митохондриального перехода. МФТП⁺ индуцирует открытие поры митохондриального перехода посредством ингибирования комплекса I и продукции АФК (Cassarino D.S. et al., 1999). О селективности действия МФТП в отношении ДА-нейронов ЧС свидетельствует его сравнительное изучение с использованием моделей ротенона, где МФТП явно вызывал поражение ДА-ергических нейронов как в черной субстанции, так и в стриатуме, активацию глиальных клеток в нигростриатном пути и двигательные нарушения, выявленные в поведенческих тестах. А моделирование ПС с помощью ротенона не показало какого-либо значительного повреждения нейронов в нигростриатном пути, но вызывало нейродегенерацию и активацию глиии только в гиппокампе. МФТП не проявлял таких эффектов в гиппокампе (Bhurtel S. et al., 2019).

МФТП может спровоцировать воспалительную реакцию, инициируя проникновение Т-клеток в черную субстанцию и стриатум, активацию резидентных макрофагов головного мозга, микроглии и повышенную экспрессию генов провоспалительных цитокинов: ИЛ-1 β , ФНО- α и интерферона γ (Kurkowska-Jastrzebska I. et al., 2009). Кроме того, активированная микроглия может быть фагоцитирующей и высвобождать провоспалительные факторы, такие как ФНО- α , простагландин E2 (PGE2), INF γ и АФК, такие как NO⁻, O²⁻, которые являются токсичными для нейронов (Banati R.B. et al., 1993). Активация клеток микроглии в стриатуме происходит уже через 90 минут после введения МФТП (Liu J. et al., 2015). Активация микроглии в нигростриатальном пути автономно снижается до уровня покоя

приблизительно через 9–14 дней после введения МФТП (Kohutnicka M. et al., 1998). Кроме того, NO, липофильный радикал, токсичный для нейронов, является одним из провоспалительных факторов, выделяемых микроглией. NO синтаза (iNOS) активируется у мышей, получавших МФТП, что приводит к увеличению продукции NO. Экспрессия NO в активированной микроглии способствует гибели дофаминергических нейронов при действии МФТП (Liberatore G.T. et al., 1999).

Длительное введение МФТП приводит к образованию α -синуклеин-положительных гранулярных агрегатов (Forno L.S. et al., 1984). Такое длительное и непрерывное введение МФТП у мышей приводило к образованию телец в оставшихся нейронах в ЧС (Lecker S.H. et al., 2006). Результаты экспериментов показали, что дофаминергические волокна стриатума подвержены дегенерации в большей степени, чем тела нейронов ЧС. Очевидно, это является результатом более выраженного токсического влияния МФТП⁺ на аксоны, чем на тела нейронов, и объясняется более высокой концентрацией мембранного транспортера дофамина в аксонах по сравнению с телами нейронов (Nirenberg M.J. et al., 1996). При таком распределении мембранного транспортера дофамина МФТП⁺ в большей степени захватывается в аксоны, чем в тела нейронов (Sundström E., Samuelsson E.B., 1997). Это означает, что дегенерацию тел нейронов, малочувствительных к действию нейротоксина, можно вызвать путем либо увеличения однократной дозы, либо пролонгирования действия токсина, используемого в относительно небольшой дозе.

2.1.2. Влияние МФТП на уровень глутамата.

Существуют доказательства, подтверждающие идею об эксайтотоксичности глутамата, способствующей МФТП-индуцированной смерти дофаминергических нейронов. Истощение клеточного АТФ, вызванное ингибированием комплекса I цепи переноса электронов в митохондриях,

приводит к деполяризации мембранного потенциала нейронов ЧС и повышению уровня внеклеточного глутамата, что, в свою очередь, стимулирует NMDA-рецепторы на дофаминергических нейронах. Введение МФТП приводит к увеличению сродства к глутамату переносчиков глутамата в ЧС. Глутаминергические источники, способствующие этим повышенным уровням неизвестны, но могут включать глию в окружающих областях, усиленное корковое или субталамическое высвобождение из аксонных терминалов дофаминергических нейронов и / или возникают в результате обмена с глутамат / цистинантиспортером, который обменивает глутамат из цитоплазмы нервного окончания, хотя последний тезис остается спорным (Meredith G.E. et al., 2009). В частности, ЧС получает глутаматергические сигналы как от коры, так и от субталамического ядра. Стимуляция NMDA-рецепторов внеклеточным глутаматом приводит к повышению внутриклеточного Ca^{2+} через открытие кальцевых каналов из-за неспособности клетки изолировать и откачивать ионы Ca^{2+} (Rosales M.G. et al., 1994).

2.2. Моделирование ранней и поздней фазы клинической формы болезни Паркинсона

Моделирование БП под действием больших доз нейротоксинов, при которых nigrostriatalная система быстро дегенерирует (для мышей - МФТП 40 мг/кг и более), сопровождается грубыми изменениями моторного поведения (Colotla V.A. et al., 1990). При этом компенсаторные механизмы не успевают развиваться в полной мере, а сами модели воспроизводят позднюю фазу клинической стадии БП у человека. Однако введение МФТП в дозе 12 мг/кг приводит к развитию досимптомной стадии паркинсонизма, сопровождающейся дегенерацией аксонов дофаминергических нейронов в стриатуме, но не тел нейронов в ЧС (Хаиндрава В.Г. и др., 2010). Так, в работах Хаиндровой В.Г. и соавт. через 2 нед после введения МФТП в дозе 12 мг/кг изменения моторного поведения отсутствовали, при этом концентрация дофамина в стриатуме снизилась на 57%, т. е. не достигла порогового уровня

снижения на 70—80%, при котором появляются первые нарушения моторики. В незначительно более высокой дозе - 20 мг/кг - МФТП уже вызывает развитие симптомной стадии на фоне дегенерации не только аксонов в стриатуме, но и тел дофаминергических нейронов в ЧС. Для достижения преклинической стадии используется доза МФТП 12 мг/кг, при которой происходит дегенерация только дофаминергических аксонов в стриатуме (Козина Е.А. и др., 2010), однако его действие пролонгировали за счет повторного введения через 2 ч. В более ранних исследованиях Bezard и др. для моделирования БП с медленным развитием наиболее сходным с естественным прогрессированием заболевания применяли общую дозу вводимого МФТП 80 мг/кг, которая считалась классической кумулятивной дозой, используемой в моделях МФТП-индуцированного ПС у мышей (Date I. et al., 1991). Эта общая доза была разделена на 20 доз по 4 мг / кг, чтобы получить постепенное снижение иммунореактивности тирозин-гидроксилазы (TH-IR). Хотя, это исследование проводилось впервые по подобному протоколу и на обезьянах, оно продемонстрировало постепенное развитие симптомов в соответствии со степенью нейродегенерации. Такая МФТП-индуцированная модель ПС полезна для оценки нейропротективной терапии и для изучения динамических физиопатологических изменений, которые происходят на разных стадиях БП, в том числе для изучения компенсаторных механизмов (Bezard E. et al., 1997).

В других публикациях у мышей использовались две схемы введения МФТП: острое и длительное введение. Острое введение состоит из четырех внутрибрюшинных инъекций 20 мг/кг МФТП с интервалом в два часа в течение одного дня. При хронической схеме МФТП вводили в дозе 30 мг/кг внутрибрюшинно: инъекции один раз в день в течение пяти дней подряд. Первый протокол использовали для оценки степени некроза клеток черной субстанции и приводит к высокой смертности, тогда как второй вызывает апоптоз клеток, и он характеризуется более низкой смертностью, чем при острой схеме (Emborg M.E., 2004). Было разработано несколько вариантов острой модели с использованием разных доз, то есть повторное введение с

низкими, промежуточными и подострыми дозами МФТП (Grandi L.C. et al., 2018). Согласно Gibrat и соав. протоколы, предполагающие разные дозы МФТП в разные дни у мышей, оказывали различные эффекты. Введение 7 доз по 20 мг / кг МФТП в течение 5 дней приводило к снижению числа TH-положительных клеток на 30%, с параллельным снижением на 44% уровня мРНК, кодирующей белок, связанный с ядерным рецептором-1 (Nurr1), экспрессируемый в дофаминергических нейронах (Decressac M. et al., 2013). Действительно, длительное введение МФТП 23 мг/кг/день в течение 28 дней уменьшало количество дофаминергических клеток на 23% (Gibrat C. et al., 2009).

В исследованиях Угрюмова М.В. и соавт. 2011 г. никаких функциональных, метаболических или морфологических изменений не наблюдалось после однократной инъекции МФТП в минимальной дозе 4 мг/кг, тогда как при любых других дозах (8, 12 или 16 мг/кг) концентрация ДА в стриатуме снизилась на 25–50%, по-видимому, в результате дегенерации аксонов. Фактически, 45% аксонов полосатого тела были потеряны после однократной инъекции МФТП в дозе 12 мг / кг. Количество нейронов ЧС при однократной дозе 8, 12 или 16 мг / кг оставалось на уровне контроля (Ugrumov M.V.etal., 2011). Эти данные согласуются с исследованиями Козиной Е.А. и соавт. 2010 г., где после инъекции МФТП 12 мг/кг однократно на 14-й день не наблюдалось каких-либо признаков двигательных нарушений или изменений в содержании ДА и количестве ДА-ергических нейронов в черной субстанции, а потеря ДА в полосатом теле в результате дегенерации около 50% ДА-ергических аксонов (Козина Е.А.и др., 2010). Из приведенных данных следует, что пресимптоматическая (доклиническая) стадия паркинсонизма может имитироваться у мышей однократным введением МФТП в дозе от 8 до 16 мг / кг. В этом случае МФТП оказывает токсическое влияние на ДА-ергические аксоны стриатума, но не на тела клеток ЧС. МФТП в дозе 16 мг/кг спровоцировал подпороговое снижение уровня ДА только в полосатом теле, тогда как при более высокой дозе 20 мг/кг МФТП спровоцировал выше пороговые метаболические и морфологические изменения как в полосатом теле

ДА-ергические аксоны и тельца нигральных клеток, что сопровождалось появлением двигательных симптомов.

При двух самых высоких однократных введениях МФТП в дозах 20 и 40 мг/кг спровоцировал резкое истощение ДА на 69% и 79% в полосатом теле и на 40% и 42% в ЧС, а также потерю 41% и 72%. % тел клеток ЧС соответственно, что сопровождалось появлением двигательных нарушений (Ugrumov M.V. et al., 2011). Так, однократное введение МФТП в дозе 12 мг/кг вызывало дегенерацию только аксонов, тогда как двукратные и четырехкратные инъекции МФТП с 2-часовыми интервалами между инъекциями приводили к дегенерации 35% и 43% клеточных тел соответственно. Согласно литературным данным, МФТП в разовой дозе 40 мг/кг провоцирует быстрое развитие симптоматической стадии паркинсонизма и высокую летальность мышей (Linder J.C. et al., 1987).

Изучение применения низких доз МФТП для моделирования БП дало неожиданные результаты в работе Dovero и др. 2016 г., где вопреки общепринятой аксиоме, чем выше доза МФТП, тем значительнее нейрональное поражение для всех доз в диапазоне от 2 до 80 мг / кг, при применении дозы от 0,1 до 1 мг/кг индуцировался уровень дофаминергической гибели нейронов, сравнимый с уровнями, наблюдаемыми для гораздо более высоких доз. Так, выявлена незначительная разница в количестве нейронов черной субстанции, оставшихся после введения МФТП в дозе 40 мг/кг, и количестве нейронов, оставшемся после 0,1 мг / кг. Полученные данные показали, что у мышей доза 1,35 мг/кг составляет порог между классическими линейными, связанными с дозой, уровнями гибели нейронов и парадоксальной высокой токсичностью более низких доз (Dovero S. et al., 2016).

1.2. Моделирование паркинсонического синдрома у крыс, вызванного интранигральным введением нейротоксина 1-метил-4-фенилпиридина в ионной форме (МФП⁺).

Ионная форма МФП⁺ используется при моделировании паркинсонического синдрома на крысах в виду их устойчивости к системному введению МФТП. Ион 1-метил-4-фенилпиридиния (МФП⁺) является токсичным метаболитом МФТП, нейротоксического вещества, способного вызывать гибель клеток дофаминергических нейронов грызунов и людей (Guo X. et al., 2019). При стереотоксическом введении в стриатум крыс МФП⁺ вызывает изменения, похожие на те, которые наблюдаются у пациентов с БП: истощение запасов дофамина, ингибирование митохондриальной дыхательной цепи и гибель дофаминергических нейронов нигро-стриатального пути (Rubio-Osornio M. et al., 2017). МФП⁺ вызывает дефект комплекса I дыхательной цепи митохондрий. Прекращение подачи АТФ увеличивает продукцию АФК и, следовательно, вызывает гибель нигральных клеток аналогично тому, как это обнаруживается при БП (Matteo D.V. et al., 2006). В работе Shindo и др. оценивали зависящее от дозы и времени изменение жизнеспособности клеток PC12 к токсичности МФП⁺. Воздействие 3 мМ МФП⁺ в течение 24 часов вызывало гибель 50% клеток. В среде, содержащей 3 мМ МФП⁺, жизнеспособность клеток не изменилась в течение 6 часов и снизилась до 90% через 8 часов и до 70% через 16 часов (Shindo Y. et al., 2015).

При интракаудальном и интранигральном введении МФП⁺ крысам регистрировались двигательные симптомы паркинсонизма, олигокинезия, ригидность и тремор, с преобладанием олигокинезии и ригидности. Тремор появлялся после введения нейротоксина и носил кратковременный характер. Наиболее выраженная симптоматика ПС была после интранигрального введения МФП⁺, максимальная выраженность которой была после 24 часов с последующим уменьшением (Кучеряну В.Г. и др., 1989). В других работах введение МФП⁺ в компактную зону ЧС вызвало значительные изменения

биологической активности. Так, в первые 5-10 мин после инъекции во всех исследуемых структурах появились высокоамплитудные медленные волны при регистрации ЭЭГ с расщепленными и заостренными вершинами (2-3 кол/с, амплитуда до 100 мкВ), отдельные пароксизмальные разряды медленных волн (1,5-2 кол/с, амплитуда до 300 мкВ) преобладающие как по амплитуде, так и по продолжительности в ЧС, а через 20-40 мин после введения МФП⁺ пароксизмальная активность (ПА) стала генерализованной, увеличилась частота волн ПА (5-6 кол/с, амплитуда 150-200 мкВ), появились разряды сгруппированных волн. ПА оказалось наиболее устойчивым в хвостатом ядре. Таким образом, введение МФП⁺ непосредственно в ЧСк вызвало весь комплекс симптомов (акинезию, ригидность, адипсию и афагию), а сопоставление электрофизиологических изменений с клиническими проявлениями двигательных изменений показали, что развитие ПС связано с ПА в хвостатом ядре, соответственно ослабление ПС связано со снижением ПА, причем ПА оказывается наиболее устойчивым и сохраняется дольше в других структурах головного мозга (Крыжановский Г. Н. и др., 1989).

3. Нейропротекция при болезни Паркинсона

3.1. Действие производных адамантана

Амантадин (1-аминоадамантан) и мемантин (1-амино-3,5-диметиладамантан) являются антипаркинсоническими препаратами с аналогичными структурами. Оба соединения являются антагонистами NMDA-рецепторов и используются (или предполагаются) в качестве терапевтических средств для различных неврологических состояний, в том числе БП, депрессии с паркинсонизмом (Rabey J.M. et al., 1992), эпилепсии (Drake M.E. Jr. et al., 1991), слабоумия (Erkulwater S., Pillai R., 1989), связанного со СПИДом, гетеродегенеративной атаксии (Rytik P.G. et al., 1991), рассеянного склероза (Cohen R.A., Fisher M., 1989), отравления метилпарахином (Gupta R.C., Kadel W.L., 1990), злокачественных нейролептических синдромов, дистонии (Lustig H.S. et al., 1992), и спастичности. При БП антагонизм адамантанов с NMDA-

рецепторами может объяснять их симптоматические и, возможно, нейропротекторные эффекты. В группе пациентов с БП, принимавших амантадин, выявлена большая продолжительность жизни, чем при стандартной терапии леводопы и в исследовании Uitti R.J. и соавт. (1996) высказано предположение, что в основе замедления прогрессирования заболевания лежит наличие у производных адамантана механизма нейропротекции (Uitti R.J. et al., 1996). Исследования Stoof J.C. и соавт. показали, что симптоматическое улучшение, наблюдаемое при лечении БА амантадином, может быть опосредовано антагонизацией, вызванной NMDA-рецепторным высвобождением ацетилхолина, а не усилением дофаминергической передачи (Stoof J.C. et al., 1992). Экспериментально доказана способность производных адамантана предотвращать или ослаблять развитие выраженности паркинсонизма на МФТП-индуцированной ПС (Greenamyre J.T. et al., 1994). В своем обзоре Zhang Z. и соавт., проанализировав ряд новых исследований, касающихся воздействия веществ на глутаматергические рецепторы с целью коррекции проявлений БП, делают вывод, что антагонисты NMDA-рецепторов оказывают положительное влияние на изменение двигательных симптомов, уменьшение дискинезии, вызванной Леводопой, и замедление прогрессирующей нейродегенерации в доклинических моделях БП. Фармакологическая регуляция mGluRs показывает еще больший потенциал для лечения БП из-за их способности улучшать нейротрансмиссию. Наряду с этим, ингибирование mGluR5 и активация mGluR группы II, а также mGluR4 показали фармакологическую эффективность в различных экспериментальных моделях БП на животных (Zhang Z. et al., 2019). О многообещающих нейропротективных эффектах производных адамантана, в т.ч. и мемантина, сообщалось в работе J. Kornhuber от 1994 года, где утверждалось, что в совокупности имеющиеся данные свидетельствуют о том, что производные адамантана обладают мощными нейропротективными свойствами *in vitro*, могут хорошо переноситься *in vivo* и действуют *in vivo* путем ингибирования NMDA-рецептор-зависимой

глутаматергической передачи. Далее делается вывод, что необходимы дальнейшие исследования, чтобы исключить, что высокие концентрации производных адамантана вызывают нейротоксичность, подобную той, которая наблюдается после воздействия МК-801 и фенциклидина - антагонистов неаминоадамантанового рецептора NMDA (Kornhuber J. et al., 1994).

На сегодняшний день амантадин применяется в клинической практики с целью отсрочить назначение препаратов леводопы на ранних стадиях заболевания, и на более поздних для потенцирования действия других антипаркинсонических средств и влияния на осложнения леводопатерапии, таких как дискинезии и моторные флюктуации. Действие амантадина связано с блокадой глутаматных NMDA-рецепторов и ослаблением возбуждающих кортикостриарных влияний на холинергические нейроны стриатума. Амантадин обладает способностью стимулировать высвобождение накопившегося дофамина из пресинаптических терминалей и блокировать обратный его захват. В частности, в клинко-экспериментальных исследованиях установлено, что благоприятный эффект амантадина связан со способностью уменьшать дисбаланс между дофаминовой и глутаматной нейромедиаторной системой на всех этапах клинического развития БП (Карабань И.Н., 2018).

В ряде исследований на моделях паркинсонизма, деменции, инсульта доказывается нейропротектное действие амантадина (Aarsland D. et al., 2009; Ahmed I. et al., 2011; Blanchet P.J. et al., 1998; Caumont A.S. et al., 2006; Melki R., 2015). О получении прямых доказательств нейропротективного действия амантадина на дофаминергические нейроны в присутствии нейротоксинов, обычно используемых в моделях БП, таких как МФТП и липополисахарид (ЛПС) сообщает Ossola B. и соавт.. В своей работе они исследовали взаимодействие трех видов клеток (нейроны ЦНС, глиарные клетки и астроциты) в культуре, что позволило изучить роль глии в нейропротективном действии амантадина (Ossola B. et al., 2011). В результате, амантадин сохранял как функцию так и количество культивируемых клеток, после обработки их

МФП⁺ и ЛПС. Кроме того амантадин увеличивал количество дофаминергических нейронов в контрольной группе без нейротоксинов, и повышал поглощение дофамина в культуре с нейронами и микроглией, где использовался ЛПС в качестве нейротоксина. В тоже время, амантадин значительно уменьшал вызванное ЛПС высвобождение провоспалительных факторов, таких как ФНО α , простагландин E2 (ПГЕ2) и NO. Далее демонстрируется, что амантадин значительно увеличивает экспрессию глиального нейротрофического фактора (GDNF) в культуре смешанной глиии, в которой большинство факторов роста продуцируется из астроглиальных клеток, которые составляют более 90% от общей популяции клеток. Это открытие согласуется с предыдущими сообщениями, показывающими, что амантадин увеличивает экспрессию GDNF в клетках глиомы (C6) и мозговой нейротрофический фактор мозга (BDNF) в коре головного мозга крыс (Caumont A.S. et al., 2006). Таким образом, данные Ossola свидетельствуют о том, что значительная часть нейропротекторных эффектов амантадина может быть связана с повышенной экспрессией GDNF в астроглии. Интересно, что в нескольких исследованиях утверждается, что амантадин может действовать не так, как другие неконкурентные антагонисты NMDA рецепторов. Например, Otton H.J. и его коллеги в своей работе поставили под сомнение важность ингибирования NMDA-рецептора амантадином в клинической дозировке. В частности, авторы предположили, что предыдущие исследования патч-зажимов, проведенные в отсутствие иона магния, могли переоценить антагонистическое действие амантадина и мемантина на NMDA-рецептор. Фактически, добавление физиологической концентрации иона Mg²⁺ (1 mM) снижало ингибирующую активность амантадина и мемантина в отношении NMDA-рецептора с 49 и 1 mM до 165 и 6,6 mM соответственно (Otton H.J. et al., 2011).

Мемантин, подобно амантадину, оказывает противовоспалительное действие и индуцирует GDNF (Wu H.M. et al., 2009). Тем не менее, амантадин и мемантин, хотя и имеют структурное сходство, проявляют заметно разные

эффекты *in vivo*. Например, мемантин, но не амантадин, стимулирует двигательную активность как у здоровых животных, так и на модели гипокинезии, а также индуцирует ипсилатеральное вращение у крыс с односторонним поражением. С другой стороны, амантадин, но не мемантин, увеличивает высвобождение норадреналина, эффективен на модели каталепсии и улучшает леводопаиндуцированную дискинезию как у животных, так и у людей (Danysz W. *etal.*, 1997).

Пандемия новой коронавирусной инфекции COVID19 заставляет ученых снова обращаться к нейропротективным свойствам производных адамантана ввиду возможной нейротоксичности нового вируса, поскольку изначальное предназначение адамантанов было именно противовирусное действие. Ранние исследования показывали способность мемантина предотвращать гибель нейрональных клеток зараженного вирусом ZIKA организма за счет блокирования рецепторов NMDA, при сохраненном уровне репликации вируса (Costa V.V. *etal.*, 2017). В исследовании на пациентах с рассеянным склерозом ($n = 10$), болезнью Паркинсона ($n = 5$) и когнитивными нарушениями ($n = 7$), страдающими COVID-19 (по данным полимеразной цепной реакции - ПЦР), и лечившимися препаратами адамантанового ряда (15 - амантадином и семь – мемантином) установлено, что ни у одного пациента не развились клинические проявления основного заболевания (Rejdak K, Grieb P. , 2020). Схожие данные были получены и в других аналогичных исследованиях (Grieb P. *etal.*, 2021). Мемантин рассматривается как средство лечения COVID-19 из-за нарушения активности NMDA, ингибирования избыточного высвобождения глутамата в мозговом стволе головного мозга, потенциального нейротоксического эффекта от истощенного ACE2, способствующего развитию острого респираторного дистресс синдрома, а также подавления репликации вирусов через потенциальное взаимодействие с вирусным белком E (Brenner S.R., 2020).

3.2. Фармакологические эффекты гимантана

В клинике в неврологической практике для коррекции двигательных нарушений широко применяются производные адамантана, благодаря их способности блокировать глутаматные рецепторы. Так, при лечении БП применяется амантадин (Kalia L.V. et al., 2008), а мемантин используется при цереброваскулярных расстройствах с целью улучшения когнитивных функций (Parsons CG, Gilling K, 2007). Еще одним перспективным производным адамантана, синтезированным и фармакологически изученным в НИИ фармакологии им. В.В. Закусова является гимантан (N (2 адамантил) гексаметиленимина гидрохлорид), для которого в лаборатории психофармакологии института были. Продемонстрированы противопаркинсонические эффекты (Вальдман Е.А., 2001). При изучении механизма действия гимантана был продемонстрирован его дофаминпозитивный эффект, свойства низкоаффинного неконкурентного блокатора ионного канала глутаматных NMDA- рецепторов подтипа, обратимого ингибитора МАО, умеренная антирадикальная и иммуностропная активность (Вальдман Е.А., 2001). Дофаминпозитивный эффект гимантана заключается в его способности увеличивать содержание внеклеточного дофамина в стриатуме, с соответствующим снижением метаболитов дофамина - ДОФУК и ГВК и метаболита серотонина - 5-гидроксииндолуксусная кислота (5-ГИУК), что трактовалось исследователями как ингибирующая активность по отношению к моноаминоксидазам. В исследовании Елшанской М.В. и соавторов (2001) изучено взаимодействие гимантана с NMDA- каналами изолированных пирамидных нейронов гиппокампа крысы методом patch-clamp регистрации в конфигурации "целая клетка". Гимантан дозозависимо блокировал токи через NMDA-каналы. Скорость блокады увеличивалась с повышением концентрации гимантана, в то время как деблокирование от концентрации не зависело. Степень блокады не зависела от концентрации агониста, но значительно усиливалась с гиперполяризацией клеточной

мембраны. Полученные данные свидетельствуют в пользу предположения, что противопаркинсоническое действие гимантана связано с его способностью блокировать NMDA каналы (Елшанская М.В. и др., 2001). В работе Вальдман Е.А. и соавторов (2003) исследовали взаимодействие гимантана с МАО-А и В — ключевыми ферментами обмена медиаторных моноаминов. Было показано, что гимантан селективно ингибировал МАО-В ($K_f 470 + 70$ мкМ), без влияния на МАО-А (Вальдман Е.А. и др., 2003). Продemonстрирована безопасность эффектов гимантана, который не изменяет спонтанную двигательную активность, процессы обучения и памяти, и не обладает аддитивным потенциалом, а также установлена умеренно выраженная анксиолитическая, антидепрессивная и анальгетическая активность препарата (Вальдман Е.А. и др., 1999; Вальдман Е. А. и др., 2003; Вальдман Е.А., 2001). По данным исследований, гимантан достоверно снижает выраженность олигокинезии, ЭЭГ-проявления паркинсонизма, вызванной МФТП, у мышей линии C57BL/6 (Вальдман Е.А., 2004). Так, при МФТП-индуцированном паркинсонизме развивается диссинхронизация ЭЭГ-картины, уменьшение тета1-активности и рост бета-активности в диапазоне 15 - 30 Гц, что невелируется гимантаном по субхроническому протоколу в дозе 30 мг/кг (Капица И.Г., 2013). У мышей с ПС, вызванным однократным введением МФТП 30 мг/кг, при внутрибрюшинном введении гимантан улучшал показатели горизонтальной двигательной активности, координацию движений и продливал время удержания на стержне, данные эффекты были сходны с мидантаном (Вальдман Е.А. и др., 2012). В модели гемипаркинсонизма, вызванным 6-ГОДА, противопаркинсонический эффект гимантана по выраженности был сопоставим с действием леводопы, а в «шаговом тесте» активность гимантана превышала по длительности эффект леводопы (Иванова Е.А. и др., 2015).

В исследовании с внутримозговым введением в ЧС липополисахарида и 6-ГОДА выявлены противовоспалительные эффекты гимантана, проявляющийся в снижении содержания моноцитарного хемоаттрактивного

протеина -1 (МХП-1), ИЛ-1 α , ИЛ-6 в сыворотке крови животных в сравнении с группой контроля (Таллерова А.В. и др., 2013). Ещё одним доказательством противовоспалительной активности стало моделирование воспалительной реакции на модели уксуснокислого перитонита у мышей, где гимантан достоверно снизил выраженность экссудативной реакции. На модели нейровоспаления, вызванного введением липополисахарида, гимантан (10 мг/кг) препятствовал потере массы тела, развитию акинезии передней конечности, контралатеральной стороне повреждения, и нарушению обоняния у крыс (Иванова Е.А. и др., 2013). Однократное введение гимантана стимулировало активность и пролификацию В-клеток иммунной системы на модели адьювантного артрита, приводящий к усилению проявления артрита на ранней стадии и уменьшению симптомов и выраженности воспаления на поздней стадии (Назаров П.Г. и др., 2003). В другой работе гимантан в терапевтической дозе потенцировал клетки макрофагального ряда из перитониального эксудата к фагоцитозу без увеличения продукции супероксид-аниона (Нежинская Г.И. и др., 2003). На культуре клеток нейробластомы человека, при обработки нейротоксином 6-ГОДА, гимантан показал более выраженный цитопротективный эффект в сравнении с амантадином (Логвинов И.О. и др., 2016). Гимантан препятствовал развитию депрессивноподобного поведения и сохранял когнитивные способности у крыс выраженнее, чем амантадин в эксперименте с билатеральным введением МФТП в ЧС животным (Непоклонов А.В. и др., 2012). Однако на модели интрацеребральной посттравматической гематомы у крыс амантадин более эффективно восстанавливал двигательную активность и ориентировочно-исследовательское поведение, чем гимантан, в то время как последний оказался успешнее в отношении восстановления способности крыс к обучению, сохранению и воспроизведения памятного следа, однако оба препарата снижали частоту гибели животных в сравнении с группой контроля (Котельникова С.О. и др., 2012).

Таким образом, в проведенных ранее экспериментальных исследованиях установлено, что гимантан обладает способностью ослаблять все основные проявления паркинсонического синдрома: олигокинезию, ригидность и тремор, в том числе на субхронической модели МФТП (30 мг/кг в течение 5 дней) и модели с использованием 6-ГОДА. Наряду с этим, гимантан обладает протекторным эффектом на модели интрацеребральной посттравматической гематомы и оказывает умеренно выраженное анксиолитическое, антидепрессивное и анальгетическое действие и иммуностропный эффект. В исследованиях на интактных животных и «in vitro» 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. Установлено также, что в концентрации 10^{-5} М гимантан обладает свойствами обратимого ингибитора МАО-В, а в концентрации 10^{-4} М проявляет умеренную антирадикальную активность.

Вместе с тем, для расширения и углубления представлений о патогенетических механизмах противопаркинсонического, нейропротекторного действия адамантанов и, в частности, гимантана необходимо более глубокое исследование его различных нейрохимических нейропротекторных эффектов не только на интактных животных, но и непосредственно на моделях паркинсонического синдрома.

Настоящая диссертационная работа является продолжением выполненных ранее исследований и ее целью является расширение и углубление представлений о патогенетических механизмах развития ПС и изучения противопаркинсонического, нейропротекторного действия адамантанов, в частности, их различных нейрохимических эффектов не только на интактных животных, но и непосредственно на моделях ПС на ранней и поздней стадиях его развития. Особое внимание в работе уделено новому препарату, производному адамантана – гимантану, с целью расширения

представлений о его влиянии на ведущие звенья патогенеза болезни Паркинсона, механизмах реализации его противопаркинсонических и нейропротекторных эффектов на моделях как ранней, так и поздней стадий паркинсонического синдрома и, в частности, на его способность уменьшать гибель дофаминергических клеток в черной субстанции.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

1. Животные

Исследование проводилось на лабораторных мышах линии C57BL/6J, массой 26-30 г. Возраст животных составлял во всех группах от 5 до 7 месяцев. При отборе брались животные из одной партии, самцы, одинаковые по массе, возрасту и физическому состоянию. Группы делились по 10-12 особей в каждой, включая группу контроля. Для содержания были выбраны стандартные условия вивария при 12-ти часовой продолжительности светового дня с обычным пищевым рационом, индивидуальные клетки для каждого животного. В отношении условий содержания животных соблюдались санитарно-эпидемические правила СП 2.2.1.3218-14 "Санитарно-эпидемиологические требования к устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев)", утвержденными постановлением Главного государственного санитарного врача Российской Федерации от 29 августа 2014 г. N 51. Также в проведении 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.

2. Моделирование паркинсонического синдрома и проведение поведенческих тестов

Для моделирования паркинсонического синдрома животным внутрибрюшинно вводили нейротоксин МФТП. В контроле вводили физ.раствор (0,9% NaCl). МФТП вводили однократно в дозе 16 мг/кг, 30 мг/кг и 40 мг/кг, или многократно (4 раза по 12 мг/кг или 4 раза по 20 мг/кг с интервалом 2 часа).

При введении МФТП мышам по схеме 4×12 мг/кг моделируется ранняя клиническая стадия болезни Паркинсона, а при введении нейротоксина в режиме 4×20 мг/кг моделируется выраженная поздняя клиническая стадия БП (Ugrumov M.V. et al., 2011). В дозе 12 мг/кг четырехкратно (4×12 мг/кг) с 2-часовым интервалом. Моделируется «начальная» симптомная стадия паркинсонического синдрома (Хаиндрава В.Г. и др., 2010), поскольку данная модель отражает падение уровня ДА ниже порогового уровня (80 %) в стриатуме по данным Хаиндрава В.Г. и др. соответствующего наступлению первых симптомов БП у пациентов.

Моделирование «развернутой» стадии паркинсонического синдрома осуществляли посредством введения МФТП в дозе 20 мг/кг четырехкратно с интервалом в 2 часа, что отражает классическую «острую» модель ПС, имитирующую выраженную позднюю клиническую стадию БП (Jackson-Lewis V. et al., 1995).

Оценка выраженности симптоматики ПС проводилась по силе олигокинезии, мышечной ригидности. Оценку олигокинезии проводили в тесте «открытое поле», для чего использовали автоматизированный аналог Opto-Varimex-3 ("Columbus instruments", США), фиксирующий изменение горизонтальной двигательной активности, количество вертикальных движений (стоек), время без движения и пройденный путь. Мышей помещали на 10 мин в пластиковые камеры размером 43х43х15 см, оснащенные системой из 30 горизонтальных и 15 вертикальных инфракрасных датчиков. Для фиксирования и анализа поступающих данных использовалась программа "Auto-Track". Тест проводили спустя 1 и 14 суток после введения МФТП. Для удобства оценки значения двигательной активности мышей в контрольной группе брались за 100%.

Для оценки у мышей мышечной ригидности, а также других нарушений двигательной активности проводился тест «Вращающийся стержень» на аппарате RotaRod для мышей (Ugo Basile, Italy). Аппарат состоит из вращающегося барабана (диаметр 6 см), который разделен на секции дисками

(25 см в диаметре) на 5 секторов для индивидуального размещения мышей. Стержень вращался с постоянной скоростью 10 об/мин, фиксация падения животных осуществляли в течение 180 сек.

Тест «Вертикальный стержень» (Pole Test) представлял собой установку из металлического стержня 50 см высотой, обернутый бинтом, с вершиной из пробкового наполнителя. Стержень крепился к основанию в строго вертикальном положении, и помещался в домашнюю клетку животного для лучшей адаптации. На вершину стержня помещалась мышь носом вверх. Фиксировалось время, потраченное животным на поворот тела в направлении спуска и время самого спуска, суммарно не выходявшее за пределы 120 сек.

Степень развития ригидности количественно также оценивали по длине шага (Stride Length Test), для чего лапки мышей помечались красящим веществом до прохождения 25 см тунеля, после чего измерялось расстояние между следами передних и задних лап животного. Ригидность также оценивали по симптому «горбатости» и выражали в баллах.

3. Культуры клеток

Для приготовления первичных культур нейроном использовались клетки коры головного мозга новорожденных (1 день) крыс породы Вистар. Предварительно животные анализировались, проводилась декапитация и извлекалась кора из головного мозга крыс. Ткань коры головного мозга покрывали папаином, пепетировали для диссоциации и отмывали от клеточного детрита путем центрифугирования. Затем на стекла, фиксированные к лункам чашек Петри (“MatTek”, США) с добавлением растворов 2% Supplement B-27 и 0.5 mM L-глутамин в нейробазальной среде наносили полученные суспензии клеток. Плотность посадок клеток достигала 105 клеток на лунку. 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.

4. Измерение влияния на кальциевый гомеостаз в культуре клеток

Для измерения концентрации внутриклеточного кальция в различных условиях эксперимента заранее приготовленные клеточные культуры использовали спустя 12-15 дней от посадки. Перед экспериментом клетки нагружали кальциевыми индикаторами в зависимости от цели эксперимента (Fura-FF или X-rhod-FF и Na^+ индикатором SBFI в форме ацетоксиметилловых эфиров (соответственно Fura-FF/AM, 4–6 μM , X-rhod-FF/AM, 1 μM и SBFI/AM, 6–8 μM) при 36°C в течение 50–60 мин). Когда в эксперименте изучалась ингибирующая способность гимантана в действии на NMDA-рецепторы, что для сравнения требовало повышения концентрации Mg^{2+} до ингибирующих величин, его концентрацию доводили до 10мМ в буфере, без изменения концентрации остальных компонентов буфера. Удаление агониста NMDA проводилось с использованием баскальциевого буфера путем замещения 2 мМ CaCl_2 на 0.1 мМ Ca^{2+} -хелатора ЭГТА (этиленгликоль-бис(β-аминоэтиловый эфир)- N,N,N',N'-тетрауксусная кислота), такие манипуляции требовались в опыте длительного воздействия высоких концентрация NMDA 500 μM в течение 16 мин.

Требования эксперимента подразумевали фиксацию момента наступления отсроченной кальциевой дизрегуляции (лаг-период ОКД). Это происходило как регистрации сигнала второго пика концентрации кальция внутри клетки от индикатора X-rhod-FF, т.е. отношение производной интенсивности флуорисценции ΔF к производной времени с начала действия агониста NMDA ΔT : $\Delta F/\Delta T$ от T, шаг дифференцирования 10 с.

Регистрация митохондриального потенциала $\Delta\Psi_m$ требовала добавления потенциал-чувствительного зонда Родамин-123 с флюоресцентных излучением, для чего клетки нагружали в течение 15 мин 2,5 μM концентрации индекатора в термостате с фиксированной температурой 36°C.

Во всех экспериментах на культуре клеток буферные растворы содержали в мМ:): 134 NaCl, 5 KCl, 2 CaCl₂, 1 MgCl₂, 20 HEPES, 5 glucose; pH = 7.4 при температуре 27–29°C. После окончания каждого эксперимента проводилась калибровка кальциевых сигналов с помощью добавления 2 μM Ca²⁺-ионофора иономицина в присутствии 5 мМ CaCl₂.

Фиксацию флуоресцентных излучений индикаторов осуществляли благодаря инвертированному микроскопу Olympus IX-71 (Япония), включающей 175 Вт лампу, систему освещения с фильтровыми колесами каналов возбуждения и эмиссии Sutter Lambda 10-2 (США), перемещение которых синхронизовано с регистрацией изображений охлаждаемой CCD-камерой CoolSnap HQ-2 (Photometrics, США). 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).

5. Гистологическое исследование

5.1 Приготовление препаратов.

С целью изготовления гистологических препаратов головного мозга у мышей через 14 дней после введения нейротоксина МФТП после анестезии извлекали головной мозг и заключали его в гистологическую кассету. Затем препарат фиксировали в холодном растворе Карнуа (60% этанол; 30% хлороформ; 10% ледяная уксусная кислота) при 4°C в течение 16 часов.

После истекшего срока препарат помещали в 4% параформальдегид, затем отмывали образцы тканей в фосфатно-солевом буфере (ФСБ) в течение часа и дегидратировали по следующей схеме, в которой концентрация спирта в растворах поэтапно увеличивалась:

96% этанол 5 минут (X3)

100% этанол 10 минут

100% этанол 30 минут

1:1 Хлороформ : 100% этанол 30 минут

Хлороформ 1 час

Хлороформ ночь при 4°C

После дегидратации препараты заключали в парафин в условиях термостата с фиксированной температурой 60°C с трехкратной сменой парафина длительностью 60 мин, далее формировали парафиновые блоки, заключение в блоки проводили на автоматизированной станции Leica EG1160 (Leica Biosystems, Германия). Срезы толщиной 8 мкм получали с помощью ротационного микротом Leica RM2265, полученные срезы в водяной бани с дистиллированной водой подогретой до 40°C выкладывали на предметные стекла, покрытые поли-L-лизин (Thermo Scientific, Великобритания) и оставляли сохнуть на ночь при комнатной температуре. Для депарафинизации использовали раствор ксилола, куда стекла погружались 3 раза по 5 мин, далее их регидратировали сквозь батарею спиртов с убывающей концентрацией (100%, 95%, 50 % длительностью 10 мин, 5 и 5 мин соответственно), завершая промывание дистиллированной водой 10 мин.

5.2. Иммуногистологическое окрашивание

После регидратации для лучшей фиксации крашенных антител к эпитопам препараты погруженные в цитратный буфер 0,1М (0,087М $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$, 0,013М $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$, 0,1% Tween-20 на 1 л дистиллированной воды, pH 6.0) нагревали в течении 10 минут. Активность эндогенной пероксидазы нивелировалась 30-ти минутным погружением препаратов в 3% раствор пероксида водорода и метанола с последующей отмывкой 30 мин в фосфатно-солевом буфере (10% сыворотки крови козы и 0,4% ФСБ-Твин 20 (ФСБ-Т)). Далее препараты обрабатывали в первичными поликлональными мышными антителами к тирозингидроксилазе (Santa Cruz, США, 1:2000) в течении 2 часов с последующей отмывкой в фосфотно-солевом буфере. Далее

обрабатывали вторичными лошадиными антителами (Vectastain ABC kit, Vector Laboratories, Великобритания) в растворе ФСБ-Т с разведением 1:1500 1,5 часа. Затем после окрашивания антителами наносился аведин-биотиновый комплекс ABC (Vector Laboratories, Великобритания) на 30 минут, и для визуализации ДА-нейронов использовали 3,3-диаминобензидин (Sigma, США) 10 мин, дистиллированная вода 5 мин. Дегидратация осуществлялась по стандартному протоколу с повышением концентрации спиртов, замачивании в ксилоле 10 мин.

5.3. Морфометрический анализ дофаминергических нейронов в ЧС

Подсчет нейронов в ЧС осуществляли согласно топографическому расположению на основании стерейотоксического атласа (Franklin. K.B.J., Paxinos G., 2001). Нейроны левой и правой части ЧС считали отдельно с последующей суммацией общего числа нейронов в каждой анатомической области каждого животного. В связи с тем, что размер нейрона превышает толщину одного среза, для учета ошибок подсчетов осуществлялась поправка по формуле Абберкромби

$$N(A) = \frac{1}{f} * N * (\frac{D}{D + M})$$

$N(A)$ – число нейронов в популяции с учетом поправки Абберкромби,

N – сумма посчитанных ТГ(+) клеток в анатомической области,

f – частота подсчёта клеток (т.е. 1/5 или 0.2),

M – толщина среза (8 мкм),

D – средний диаметр ядра.

Для вычисления среднего диаметра ядер случайно брались значения диаметров ядер 30 нейронов у каждого животного, вычисляли средний показатель и подставляли в указанную формулу.

6. Исследование биоэлектрической активности мозга мышей (ЭЭГ-исследование)



Рис. 5 Стереотоксическое вживление электродов мыши.

Для регистрации биоэлектрической активности мозга мышам после введения 50 мг/кг небутала внутривентриально с целью наркоза и наступления медикаментозного сна вживлялись электроды в структуры сенсомоторной коры, хвостатого ядра, черной субстанции по координатам стереотаксического атласа (Franklin. K.B.J., Paxinos G., 2001). Регистрацию электро-энцефалографии проводилось через 14 дней после моделирования ПС путем введения МФТП, и не ранее чем через 3 суток после вживления электродов. ЭЭГ проводилась в условиях свободного передвижения животных по собственной клетке с использованием 21-го канального аппаратно-компьютерного комплекса «Нейро-КМ» (Статокин, Россия). Запись ЭЭГ каждого животного продолжалась в течении 10 минут. Фильтрацию с визуальным анализом полученных данных, выделения и удаление артефактов электрокортикограмм проводились с помощью программы «Brainsys» (разработчик А.А. Митрофанов).

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

Подопытных мышей после анальгизации декапитизировали, извлекали структуры стриатума из головного мозга, помещали в жидкий азот. В ходе приготовления экстрактов для количественного определения катехоламинов выделенные структуры стриатумов извлекали из жидкого азота, размельчали в гомогенизаторе стекло-тефлон (0,2 мм) в "холодной комнате" (+10° С) при скорости вращения пестика 3000 об/мин в среде 0,1 м НСlO₄, для достижения соотношения в объеме между тканью и средой 1:20. В среду добавлялся 100 нг/мл 3,4-диоксибензиламин (ДОБА) – синтетическое вещество катехолоподобной структуры, затем образцы центрифугировались и фильтровались через устройства "Millipore" GS (Millipore, США) (0,22 мкм диаметром пор). Далее образцы подвергались исследованию методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) для количественного определения ДА, ДОФУК, ГВК и серотонина (5-НТ) (Kissinger РТ, 1981). Для процесса разделения неподвижной фазой был RP-18 (октадецилсилан), а подвижной раствор состава 0,02 М лимонной кислоты; 0,02 М NaH₂PO₄ и 0,27 мМ ЭДТА) с водой в соотношении 2,4:1, куда добавляли октилсульфат натрия 0,3мМ, ацетонитрил 4%, Н₃PO₄ для доведения рН до 3,6, с последующим фильтрованием и дегазированием вакуумным насосом. Регистрировали вещества электрохимически амперометрический детектором LC-4В с ячейкой TL-5 с потенциалом +850мВ, для сравнения брали хлорсеребряный электрод RE-I. Время наблюдения 10 минут при температуре 30° С при скорости прохождения через систему 1,0 мл/мин подвижной фазы. Концентрации катехоламинов в образцах нг/мл определяли соотношением величины пиков в мм для моноамина и добавленного синтетического катехоламина ДОБА в опытном образце и в стандартной пробе ((hKA/hДОБА)СТ), где концентрация составляла 100 нг/мл. Выражения полученных данных проводили в нмоль

вещества на 1 мг ткани. Смеси стандартных веществ в соотношении 100 нг/мл (100 мкг/мл в 0,1 н. HClO_4 ; 0,2 мМ метабисульфита) использовались для калибровки хроматографа.

8. Методы исследования определения общего окислительного статуса, общего антиоксидантного статуса и индекса окислительного стресса

Для определения уровня ООС, ОАС и ИОС после извлечения мозга, выделения комплекса ЧС и стриатума на охлажденной льдом поверхности, взвешивания, замораживания и хранили в жидком азоте -80°C . Далее перед исследованием препарат превращали в суспензию в гомогенизирующей среде: 150 мМ NaCl , 3 мМ ЭДТА, 10 мМ Трис $-\text{HCl}$, $\text{pH}=7,3$ в соотношении 1 мг ткани 9 мл среды.

8.1. Определение общего окислительного статуса (ООС)

Для определения ООС в нигростриатном комплексе использовали спектрофлуориметрический метод (Erel, 2005). К 675 мкл реактива-1 (150 мкМ ксиленолового оранжевого, 140 мМ NaCl и 1,35 М глицерина в 25 мМ растворе H_2SO_4 , $\text{pH}=1,75$) добавляли 105 мкл гомогената нигростриатумаплазмы и затем добавляли 33 мкл реактива-2 (5 мМ $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ и 10 мМ о-дианизидина, растворенных в 25 мМ растворе H_2SO_4). Оптическую плотность измеряли после смешивания реактива-1 и плазмы 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 и выражали в микромолярном эквиваленте H_2O_2 на литр (мкмоль H_2O_2 Экв / л).

8.2. Определение общего антиоксидантного статуса (ОАС)

Общий антиоксидантный статус (ОАС) используется для отображения емкости многоуровневой антиоксидантной системы организма. ОАС в плазме

крови измеряли колориметрическим методом (Erel, 2004). К 600 мкл реактива-1 (о-дианизидин (10 мМ), ионы железа $(\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \times 6\text{H}_2\text{O})$ 45 мкМ) в растворе Кларка и Лубса (75 мМ, pH=1,8) добавляли 15 мкл плазмы и затем 30 мкл реактива-2 (7,5 мМ H_2O_2 в растворе Кларка и Лубса). Оптическую плотность измеряли после смешивания реактива-1 и плазмы при длине волны 444 нм (фон) и спустя 4 мин после добавления реактива-2 при той же длине волны на спектрофотометре Hitachi 320 (Япония). Калибровочную кривую строили с помощью антиоксиданта Trolox (6-гидрокси-2,5,7, 8-тетраметилхроман-2-карбоксилевой кислоты), водорастворимого аналога витамина Е. Результаты выражали в миллимолярных эквивалентах Trolox на литр (ммоль Trolox Экв./ л).

8.3. Определение индекса окислительного стресса (ИОС)

ИОС рассчитывали как отношение ООС (мкмоль H_2O_2 Экв / л) к ОАС (ммоль Trolox Экв/ л) (Bajrai, 2014). Все использованные реактивы были от компании «Sigma» (USA).

9. Исследование уровня провоспалительных цитокинов

После извлечения мозга отделяли нигрокудатный комплекс, взвешивали и гомогенизировали в буфере для лизиса следующего состава: 150 mM NaCl, 5 mM ЭДТА, 50 mM Tris, 1.0% NP-40 (IGEPAL CA-630, 0,5% Диоксихолат натрия, 0,1% SDS. После центрифугирования 10000 g в течение 5 мин. супернатанты замораживали и хранили при температуре -85°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 $\lambda=450$ нм. Чувствительность

метода для каждого цитокина составлял 3,0 пг/мл. Концентрацию цитокинов в нигрокаудатном комплексе нормировали на мг ткани.

10. Производные адамантана

Препарат гимантан – $[C_{16}H_{28}N]HCl$ (N-2-адамантил-гексаметиленimina гидрохлорид) (синтезирован в НИИ фармакологии имени В.В. Закусова) и амантадин гидрохлорид $C_{10}H_{17}N$ (мидантан, Борисовский ЗМП, Беларусь), указанный далее как мидантан, внутривенно вводились мышам в дозе 20 мг/кг однократно или 4-кратно за 30 мин до введения МФТП.

11. 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 постхок тестом Ньюмена-Кулза (Newman-Keuls: N-K тест) или непараметрическому критерию Kruskal-Wallis ANOVA с последующим анализом по тесту Манна-Уитни. Данные представлены как среднее значение $\pm$ ошибка среднего (стандартное отклонение) – Mean $\pm$ SEM (SD). Отличия считали достоверными при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В основе патогенеза БП лежит прогрессирующая потеря дофаминергических нейронов и компенсация их функциональной недостаточности (Угрюмов М.В., 2015). Поскольку потеря ДА-нейронов достигает 60-70% прежде, чем БП клинически проявит себя, лечение таких пациентов начинается на развернутой стадии заболевания, когда фармакологические мишени для терапии практически отсутствуют. Целью современной фармакологии нейродегенеративных заболеваний в таком случае должна быть разработка препаратов с нейропротективным потенциалом, способных продлить доклиническую стадию заболевания, сохранив функциональный пул ДА-нейронов, тем самым позволив избежать пациенту инвалидности и смерти от БП. Создание модели доклинической и ранней стадии БП (сразу же после появления первых моторных симптомов) с помощью нейротоксина МФТП позволяет осуществлять исследования новых нейропротекторных препаратов-кандидатов (Хаиндрава В.Г. и др., 2010). Преимуществом нейротоксина МФТП перед другими нейротоксинами, используемыми для моделирования БП, в данном случае будет схожесть с эндогенным нейротоксином с N-метилнорсалинолом, присутствие которого было обнаружено в спинномозговой жидкости и аутопсийном материале головного мозга (а именно ЧС) пациентов с БП (Moser A. et al., 1995), и наиболее близкие моторные нарушения у мышей после введения МФТП с клинической картиной БП (мышечная ригидность, тремор, брадикинезия). Введение МФТП в высоких дозах (40 мг/кг и более) по данным других исследований сопровождается быстрой дегенерацией нейронов ЧС и грубыми моторными нарушениями у мышей, при которых компенсаторные механизмы не успевают развиться полноценно и таким образом воспроизводится развернутая стадия БП (Colotla V.A. et al., 1990). Использование относительно небольшой дозы однократно 16 мг/кг не сопровождалось в других работах развитием моторных симптомов, а морфологически вело к потере аксонов ДА-нейронов, что соответствует

доклинической стадии ПС (Хаиндрава В.Г. и др., 2010), в дозе 20 мг/кг развиваются моторные симптомы на фоне поражения не только аксонов но и тел ДА-нейронов ЧС. При двухкратном введении 12 мг/кг в том же исследовании моторные симптомы отсутствовали, регистрировалось снижение концентрации дофамина в стриатуме на 57% по результатам ВЭЖХ, но сохранялось на прежнем уровне в ЧС. Однако введение той же дозы 4 раза с интервалом в 2 часа через две недели приводит к появлению моторных симптомов в виде уменьшения длины пробега на 42% и длины пробега на 23%, а снижение концентрации дофамина в ЧС достигло 75%, уровень при котором для человека наступает симптомная стадии БП (Bernheimer H. et al., 1973). В исследованиях подострой модели ПС, где МФТП вводили в дозе 30 мг/кг в течении 5 дней, не привело к типичным двигательным дефектам, несмотря на серьезное повреждение дофаминергических нейронов и заметное снижение содержания дофамина, а в тесте вращающегося стержня было продемонстрирована гиперактивность мышей из группы МФТП, которые дольше удерживались на стержне в сравнении с контролем (Zhang Q.S. et al., 2017), что объясняется авторами увеличением норэпинефрина, истощение которого в голубом ядре усиливает токсичность МФТП и вызывает грубые моторные дефициты у мышей. И хотя, данная модель подострого ПС в других исследованиях используется для оценки эффективности нейропротекторных свойств препаратов-кандидатов (Xu S.F. et al., 2019), она ограничена рядом недостатков. Компенсаторные механизмы дофаминергической системы в данной случае работают за счет усиления чувствительности нейронов полосатого тела к дофамину и повышение синтеза ТГ (Bezard E., Gross C.E., 1998) и обуславливают гиперактивность подопытных животных в поведенческих тестах при использовании данной модели, что требует преодоления путем использования других протоколов введения МФТП.

В связи с вышеперечисленным, для исследования влияния производных адамантана на выраженность ПС нами были выбраны модели доклинической (МФТП внутрибрюшинно 16 мг/кг однократно), начальной (МФТП 12 мг/кг х

4) и развернутой стадии (МФТП 30 мг/кг однократно или МФТП 20 мг/кг х 4) с проведением контрольных исследований через 2 недели после инъекций нейротоксина. Анализ материала в данной работе мы проводили через 2 нед после введения МФТП, поскольку именно к этому времени наиболее выражены нейродегенеративные процессы (Mitsumoto Y. et al., 1998).

Специфичность теста RotaRod (вращающий стержень) для оценки двигательных дефицитов при ПС основана на координации движений, за которую ответственны базальные ядра и структуры мозжечка (Shiotsuki H. et al., 2010), а также способности к обучению. Обучение двигательным навыкам по данным литературы осуществляется за счет работы стриатума, и снижено у мышей с генетическим поражением полосатого тела (Kishioka A. et al., 2009), однако в исследованиях с мышами, обработанными МФТП, истощение дофамина в ЧС не коррелировало с моторными нарушениями в указанном тесте (Ayton S. et al., 2013). Наиболее часто в литературе описано использование тестов «Вертикальный стержень» и «Открытое поле» для оценки двигательных нарушений мышей с ПС (Jiang P.E. et al., 2019). Тест «открытое поле» - это экспериментальный тест, обычно используемый для определения уровня общей двигательной активности, скорости движения, время без движения, количества вертикальных стоек. Тест «вертикальный стержень» применяется для оценки силы передних конечностей животного и их координационное использование и пространственное мышление, при ПС с помощью этого теста производится оценка олигокинезии.

1 Проявления паркинсонического синдрома при однократном введении МФТП и влияние на них производных адамантана

В тесте «открытое поле» однократное введение МФТП (16 мг/кг внутрибрюшинно) приводило к развитию двигательных нарушений у мышей (олигокинезии и мышечной ригидности) (см. Рис. 6 А). При увеличении дозы нейротоксина до 30 мг/кг однократно показатели двигательной активности

значительно снизились, длина пройденного пути достигла 230 ± 56 см в сравнении с группой контроля 891 ± 150 см, число стоек с $8,5 \pm 3$ уменьшилось до 4 ± 2 , а время без движения со 184 ± 50 сек увеличилось до 290 ± 98 сек. На фоне введения МФТП в дозе 40 мг /кг показатели двигательной активности были минимальны, пройденный путь снизился до 25 ± 10 см, кроме того высокая токсичность приводило к большой смертности во всех группах с введением МФТП 40 мг/кг.

На фоне увеличения дозы нейротоксина до 30 мг/кг отмечалось противопаркинсоническое действие производных адамантана (гимантана и мидантана) (Рис 6 Б), так, пройденный путь в группе с предварительным введением гимантана составлял 486 ± 126 см, в сравнении с мидантаном 181 ± 89 см. При увеличении дозы вводимого МФТП до 40 мг/кг какая-либо разница в степени ригидности отсутствовала во всех группах.

Гимантан (20 мг/кг внутрибрюшинно), как и мидантан (20 мг/кг внутрибрюшинно), при предварительном введении за 30 мин оказывали положительный эффект в виде уменьшения выраженности дискинезии в тесте «открытое поле» (Рис 6 и 7). Параметры локомоторной активности мышей в группе с применением гимантана были выше, чем в группе с ПС: горизонтальная активность (длина пробега) составляла соответственно $487 \pm 11,4$ и 157 ± 16 см ($p < 0,05$), вертикальная активность (число стоек) – $6,7 \pm 0,9$ и $1,8 \pm 0,8$ ($p < 0,01$). В группе с введением мидантана длина пробега составила 253 ± 14 см, что значимо больше, чем у животных с ПС, но уступало значению в группе гимантана (в обоих случаях $p < 0,05$). Число стоек в группе мидантана составило $3,1 \pm 0,4$, что также значимо отличалось от обеих групп сравнения ($p < 0,05$) рис.6, 7.

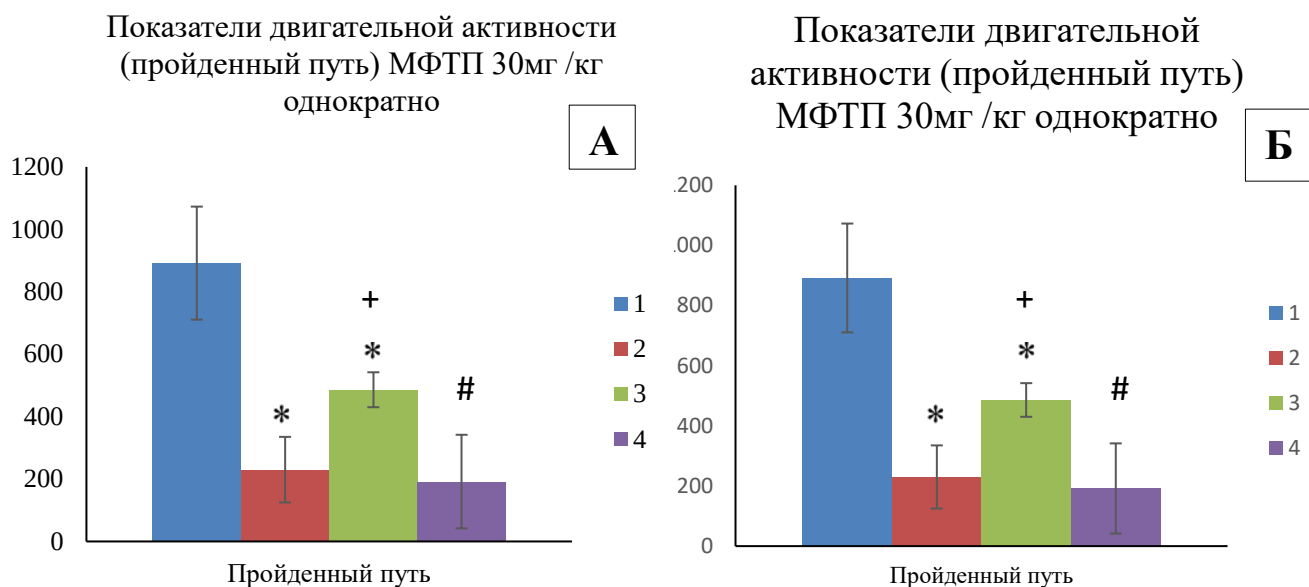


Рис. 6. Показатели двигательной активности (длина пробега) в группах с однократным введением МФТП 16 мг/кг (А), МФТП 30 мг/кг (Б). 1 – Группа контроля с физ. раствором, 2 – Гр. МФТП 16 мг/кг(рис. А) и 30 мг/кг (рис. Б), 3 – Гр. с предварительным введением гимантана, МФТП, 4 – Гр. с предварительным введением мидантана, МФТП.

Примечание: * - $p < 0,01$ в сравнении с группой контроля + - $p < 0,01$ в сравнении с группой МФТП.; # - $p < 0,05$ при сравнении с группой МФТП + гимантан.

ПОКАЗАТЕЛИ ДВИГАТЕЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ (ЧИСЛО СТОЕК)

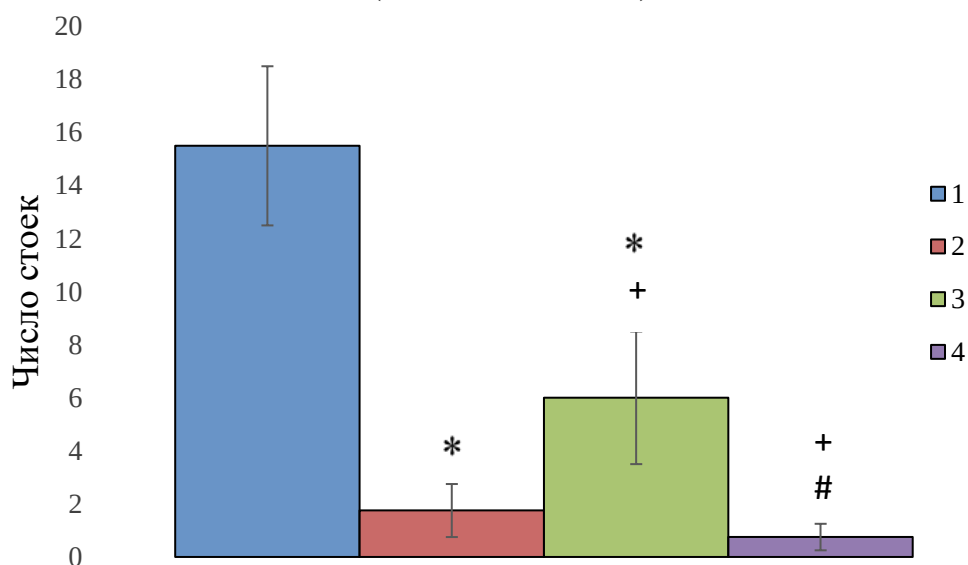


Рис. 7. Показатели двигательной активности (число стоек) в группах с однократным введением МФТП 16 мг/кг. 1 – Группа контроля с физ. р-ром, 2 – Гр. МФТП 16 мг/кг, 3 – Гр. с предварительным введением гимантана, МФТП, 4 – Гр. с предварительным введением мидантана, МФТП.

Примечание: *- $p < 0,01$ в сравнении с группой контроля + - $p < 0,01$ в сравнении с группой МФТП; # - $p < 0,05$ при сравнении с группой МФТП + гимантан.

При предварительном введении гимантана показатели ригидности в тесте «горбатости» улучшились и достигли $0,6 \pm 0,1$ балл (отличия от группы с ПС значимы: $p < 0,01$). В группе мидантана тоже наблюдалось умеренное улучшение показателя ригидности $1,1 \pm 0,2$ балла (отличия от других групп статистически значимы: $p < 0,01$ при сравнении с группой МФТП, $p < 0,05$ при сравнении с группой МФТП + гимантан) (Рис. 8).

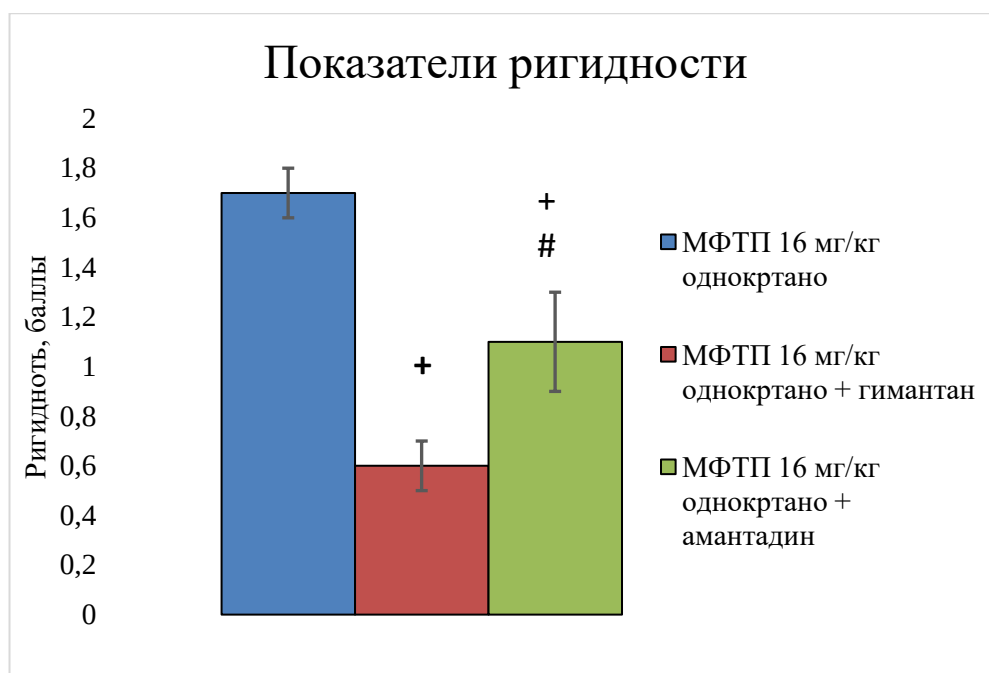


Рис. 8. Показатели ригидности в группах с моделированием ПС (МФТП 16 мг/кг однократно). 1 – Гр. МФТП 16 мг/кг, 2 – Гр. с предварительным введением гимантана + МФТП, 3 – Гр. с предварительным введением мидантана + МФТП.

+ - $p < 0,01$ в сравнении с группой МФТП; # - $p < 0,05$ при сравнении с группой МФТП + гимантан.

Предварительное применение гимантана и мидантана животным при моделировании ПС введением МФТП в дозе 40 мг/кг не оказывало влияние на параметры локомоторной активности и выраженность ригидности животных.

Таким образом, гимантан по сравнению с мидантаном при предварительном введении более эффективно предупреждал снижение локомоторной активности и развитие ригидности у мышей при введении МФТП в дозе 16 мг/кг и менее эффективно при индукции ПС в дозе 30 мг/кг. При моделировании ПС однократным введением МФТП в дозе 40 мг/кг оба препарата не оказывали влияния на развитие паркинсонической симптоматики.

Следующим этапом исследования явилось изучение нейропротективных и антипаркинсонических эффектов производных адамантана на модели с

многократных введением МФТП в разных дозировках, моделирующих начальную симптомную и развернутую (позднюю) стадии ПС.

1.1. Влияние производных адмантана на поведение мышей на ранней и поздней стадиях ПС при 4-х кратном введении МФТП

Инъекция МФТП в дозах 12 мг/кг х 4 и 20 мг/кг х 4 во всех группах вызывало развитие моторных дисфункций в виде олигокинезии и мышечной ригидности, выраженность которых возрастала с увеличением дозировки нейротоксина (Табл. 1). В модели ранней стадии ПС (МФТП 12 мг/кг х 4) спустя 2 недели регистрировали существенное снижение горизонтальной и вертикальной двигательной активности мышей, выраженное в увеличении времени без движения и длительности спуска в тесте «Вертикальный стержень», подтвердив развитие олигокинезии. Время спуска животных в тесте «вертикальный стержень» при введении МФТП в дозе 20мг/кг х 4 увеличивалось с $2,8 \pm 0,5$ с до $11,2 \pm 2,4$ с ($p < 0,01$). Отмечалось также снижение длины шага животных с $6,7 \pm 0,1$ см до $5,0 \pm 0,1$ см у животных с ПС ($p < 0,01$). Выраженность ригидности в тесте «горбатости» составила $2,1 \pm 0,1$ балла. Ригидность у животных с начальной стадии ПС (МФТП 12 мг/кг х 4) составляла $1,5 \pm 0,1$ балла. На ранней клинической стадии ПС, вызванной введением МФТП в дозе 12 мг/ кг, 4 раза снижалось время удержания мышей на стержне на 67%, что свидетельствует о нарушении координации и снижении мышечной силы животных. На поздней клинической стадии ПС, вызванной введением МФТП в дозе 20 мг/ кг, 4 раза время удержания мышей на стержне уменьшалось на 87% ($p < 0,05$).

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	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

Табл. 1 Влияние гимантана и мидантанана параметры локомоторной активности мышей на разных стадиях развития экспериментального паркинсонического синдрома.

Примечание: статистическая значимость отличий (по One-Way ANOVA) обозначена ^{**} – при сравнении с Гр.1 ($p < 0,01$); ⁺ – при сравнении с гр. 2 ($p < 0,05$; ^{**} $p < 0,01$; [#] при сравнении с Гр.3-1 ($p < 0,05$))

(Воронина Н. А. и др. Эффекты производных адамантана на поведенческую активность мышей на разных стадиях экспериментального паркинсонического синдрома //Патогенез. – 2019. – Т. 17, №. 4. – С. 57-62.).

Анализ результатов поведенческих тестов показал, что в группах животных с предварительных введением Гимантана и Мидантана наблюдается снижение или почти полное невилирование проявлений действия МФТП (Рис.9).

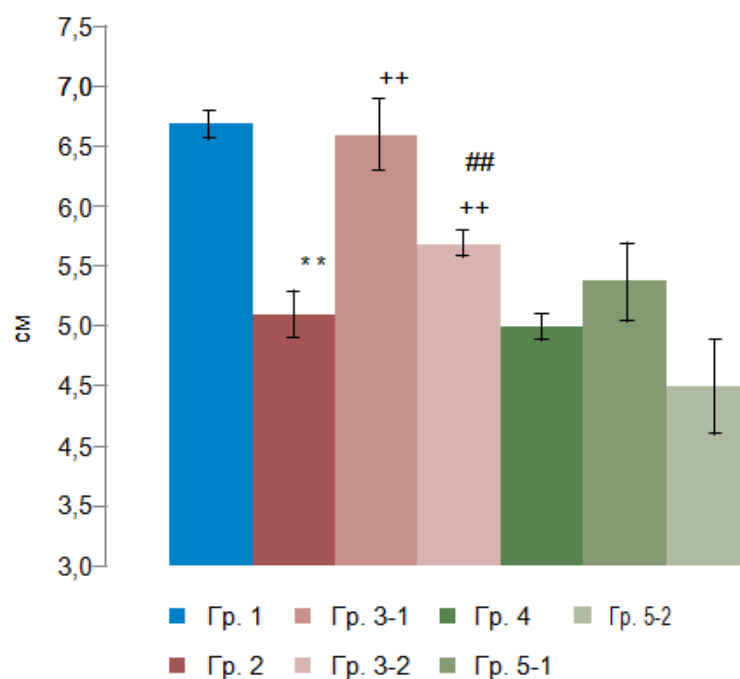


Рис. 9. Влияние гимантана и мидантана на изменение длины шага мышей на разных стадиях развития экспериментального паркинсонического синдрома.

По оси ординат: длина шага в см.

Группы животных:

Гр.1 – животные, которым вводили раствор NaCl (контроль);

Гр.2- животные, которым вводили МФТП по схеме 4×12 мг/кг;

Гр.3 – животные, которым вводили МФТП по схеме 4×12 гимантан (Гр.3-1) или мидантан (Гр.3-2); Гр.4 – животные, которым вводили МФТП в режиме 4×20 мг/кг;

Гр.5 – животные, которым вводили МФТП в режиме 4×20 мг/кг и гимантан (Гр.5-1) или мидантан (Гр.5-2).

Статистическая значимость отличий: ** – от Гр.1 ($p < 0,01$), ++ – от гр.2 ($p < 0,01$), ## – от Гр.3-1 ($p < 0,01$).

(Воронина Н. А. и др. Эффекты производных адамантана на поведенческую активность мышей на разных стадиях экспериментального паркинсонического синдрома //Патогенез. – 2019. – Т. 17, №. 4. – С. 57-62.)

Так, исследование изменения длины шага показало отсутствие ригидности у мышей на ранней стадии ПС (МФТП 12 мг/кг х 4) на фоне введения гимантана, в этой группе длина шага составляла $6,6 \pm 0,3$ см ($p < 0,01$), что максимально приблизилось к значениям контрольной группы $6,7 \pm 0,1$ см. что контрастирует с результатами гр.2 $5,7 \pm 0,2$ см с аналогичной дозой МФТП 12 мг/кг х 4 без применения гимантана и группы мидантана ($p < 0,01$).

Фиксирование изменения длины пробега как горизонтальной активности показало, что на начальной стадии ПС Гимантан увеличил этот показатель с 305 ± 59 см до 699 ± 119 см по сравнению с группой МФТП 12 мг/кг х 4. Введение мидантана 20 мг/кг на начальной стадии ПС менее выраженно повлияло на этот показатель $427,7 \pm 79,3$ см, при сравнении с гр. Гимантана отличие достоверное ($p < 0,05$). На развернутой стадии ПС МФТП 20 мг/кг х 4 наибольшая длина пробега наблюдалась в группе с Гимантаном $310,0 \pm 96,7$, и практически одинаковые показатели наблюдались в группах ПС и с применением Мидантана $156,2 \pm 112,1$ и $157,1 \pm 55,6$ соответственно $p < 0,01$, что свидетельствует о некотором положительном эффекте Гимантана и на развернутой стадии в уменьшении олигокинезии (Рис. 10).

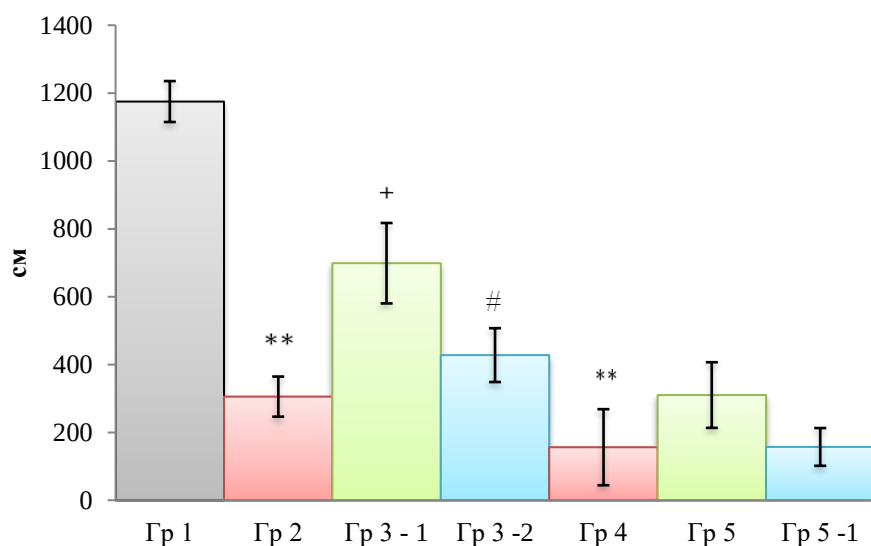


Рис. 10. Влияние гимантана и мидантанана параметры локомоторной активности (длина пробега) мышей на разных стадиях развития экспериментального паркинсонического синдрома

- Гр.1. NaCl (мыши линии C57Bl wt)
- Гр.2. МФТП 4×12 мг/кг
- Гр.3-1. МФТП 4×12 мг/кг + гимантан
- Гр.3-2. МФТП 4×12 мг/кг + мидантан
- Гр.4. МФТП 4×20 мг/кг
- Гр.5. МФТП 4×20 мг/кг + гимантан

Гр.5-1. МФТП 4×20 мг/кг + мидантан

Примечание: статистическая значимость отличий (по One-Way ANOVA)

** – при сравнении с Гр.1 ($p < 0,01$);

+ – при сравнении с Гр.2 ($+ - p < 0,05$);

– при сравнении с Гр.3-1 ($p < 0,05$).

Показатели вертикальной активности (число стоек) измеренные также в тесте «Открытое поле» при введении гиманатана на начальной стадии ПС приближались к значениям контрольной группы $11,7 \pm 2,2$ и $15,1 \pm 1,9$ соответственно, в группе Мидантана этот показатель составил $5,6 \pm 0,5$, а в группе ПС (МФТП 12 мг/кг х 4) $3,9 \pm 1,5$, что опять демонстрировало большую эффективность гимантана. Однако при исследовании групп с моделированием развернутой стадии ПС, где МФТП применялся в дозе 20 мг/кг х 4 улучшения на фоне введения гимантана и мидантана выявлено не было $3,2 \pm 2,1$ группа ПС, $2,0 \pm 1,0$ в группе с Гимантаном и $1,2 \pm 0,4$ в группе Мидантана (Рис. 11).

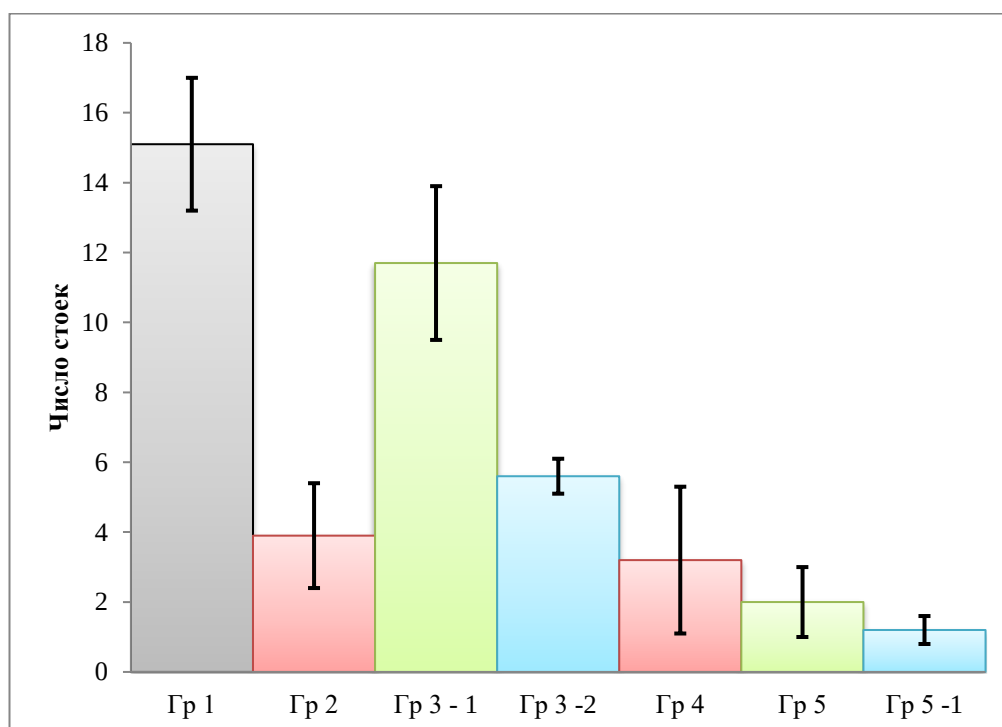


Рис. 11. Влияние гимантана и мидантанана параметры локомоторной активности (число стоек) мышей на разных стадиях развития экспериментального паркинсонического синдрома.

Гр.1. NaCl (Контроль мыши линии C57Bl w), **Гр.2.** МФТП 4×12 мг/кг, **Гр.3-1.** МФТП 4×12 мг/кг + гимантан, **Гр.3-2.** МФТП 4×12 мг/кг + мидантан
Гр.4. МФТП 4×20 мг/кг, **Гр.5.** МФТП 4×20 мг/кг + гимантан, **Гр.5-1.** МФТП 4×20 мг/кг + мидантан, Примечание: статистическая значимость отличий (по One-Way ANOVA) обозначена ** при сравнении с Гр.1 ($p < 0,01$); + при сравнении с Гр.2 ($+ - p < 0,05$; $++ - p < 0,01$); # при сравнении с Гр.3-1 ($p < 0,05$).

Показатель времени, проведенного животным без движения, также характеризует выраженность олигокинезии. В группе контроля Гр.1 (введения физиологического раствора) оно составило $176,4 \pm 12,4$, наиболее близким к этому значению была группа начальной стадии ПС с введением гимантана $181,7 \pm 11,5$ ($p < 0,01$). Группа Мидантана на начальной стадии ПС показала $238,3 \pm 15,3$ с на фоне $285,6 \pm 11,8$ группы ПС ($p < 0,05$). На развернутой стадии в трех группах наблюдались схожие показатели, что означает что Мидантан и Гимантан не оказали антипаркинсонического эффекта (Рис. 12).

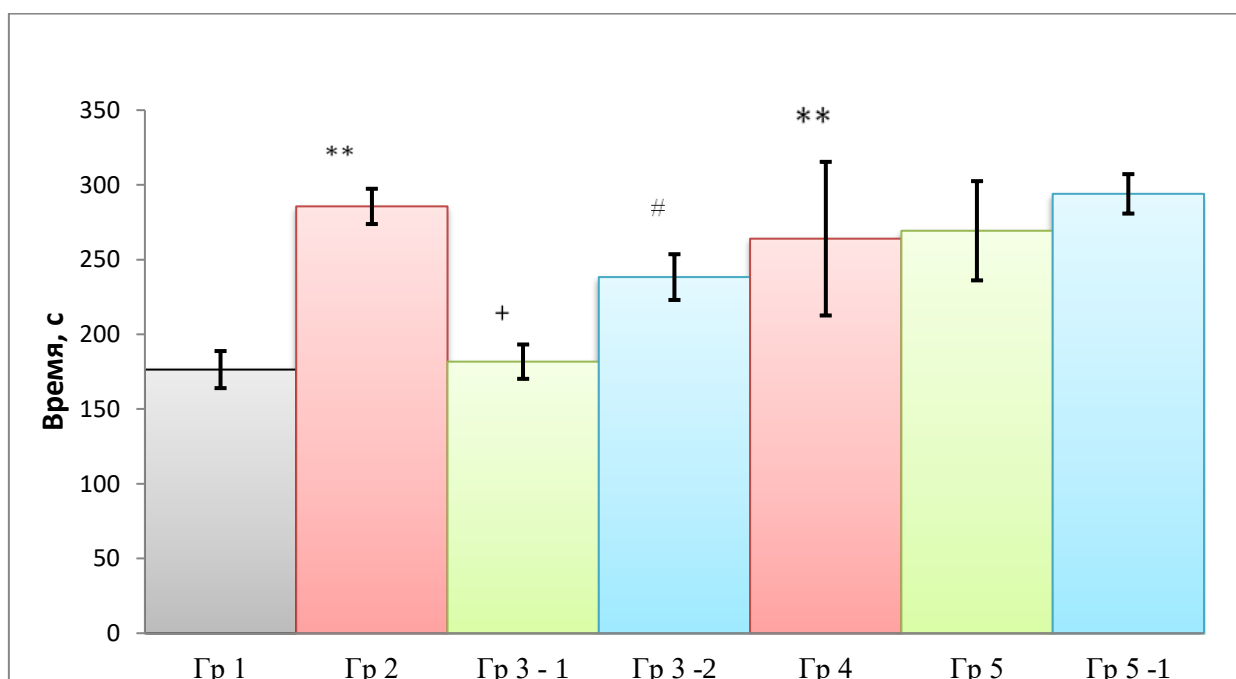


Рис. 12. Влияние гимантана и мидантанана параметры локомоторной активности (время без движения) мышей на разных стадиях развития экспериментального паркинсонического синдрома. Обознаения как на Рис 11. Примечание: статистическая значимость отличий (по One-Way ANOVA)

** $p < 0,01$ при сравнении с Гр.1; + $p < 0,05$ при сравнении с Гр.2; ++ $p < 0,01$ при сравнении с Гр.2

Анализ двигательной активности в группах с введением МФТП 20 мг/кг 4 раза не выявило значимых отличий в выраженности брадикинезии и ригидности после предварительного введения препаратов.

Результаты изучения влияния производных адамантана - гимантана и мидантана на время удержания мышей на стержне на ранней и поздней клинической фазе МФТП-индуцированного ПС (Тест Ротарод) представлены в табл. 2.

Табл. 2.

Сравнительное изучение влияния производных адамантана - гимантана и мидантана на время удержания мышей на стержне на ранней и поздней клинической фазе МФТП-индуцированного ПС (Тест Ротарод)

Экспериментальные группы	Время удерживания на стержне, сек
Контроль (NaCl)	178,7±0,8
МФТП 4x12 мг/кг	78,3±6,0*
МФТП 4x12+Гим	150±7,3*#§
МФТП 4x12+Ам	102±7,0*#
МФТП 4x20мг/кг	23,8±4,1*
МФТП 4x20+Гим	47,2±4,8*+
МФТП 4x20+Ам	28,6±3,4*

Примечание: * - $p < 0,05$ в сравнении с гр. контрольных животных; # - $p < 0,05$ с группой МФТП 4x12 мг/кг; +- $p < 0,05$ с группой МФТП 4x20 мг/кг; § - $p < 0,05$ с группой МФТП 4x12 мг/кг + Мемантин.

Предварительное применение гимантана мышам с ПС на этой фазе развития увеличивало время удержания животного на стержне до 84% от контроля ($p < 0,05$). Эффект влияния гимантана на удержание животных с ПС

был больше, чем эффект, вызванный мидантаном в тех же условиях, который составил 57% ($p < 0,05$). Применение гимантана мышам с ПС в группе с применением МФТП в дозе 20 г/кг х 4 время удержания животного на стержне повышалось только до 26 % от контроля ($p < 0,05$). Предварительное применение мидантана мышам с ПС на этой фазе развития время в тех же условиях не влиял на этот показатель.

Таким образом, гимантан при предварительном применении более эффективно по сравнению с мидантаном предупреждал нарушение координации движения мышей на ранней клинической фазе ПС. Эффект гимантана на поздней клинической фазе ПС был меньше, а эффект мидантана отсутствовал. Основные результаты раздела опубликованы (Воронина Н.А. и др., 2019).

Таким образом, предварительное введение производных адамантана – гимантана и мидантана – при моделировании ПС ослабляет выраженность олигокинезии, мышечной ригидности и степень нарушения координации движений животных на начальной и промежуточной стадиях развития паркинсонизма. При этом гимантан оказался эффективнее в сравнении с мидантаном. Однако оба препарата не оказывали значимого влияния на параметры поведенческой активности животных на поздней клинической стадии ПС. Соответственно в связи с очевидным успехом гимантана в поведенческих тестах, дальнейшие исследования проводились с целью более глубокого анализа свойств препарата и изучения выраженности его нейропротективных свойств с помощью различных методов, сосредоточенных на патофизиологических механизмах развития паркинсонизма, таких как эксайтотоксичность глутамата, нейровоспаление, оксидативный стресс приводящих к нейродегенерации, изменениям биоэлектрической активности головного мозга и, наконец, двигательным нарушениям.

2. Сравнительное изучение влияния производных адамантана при предварительном применении на уровень дофамина и его метаболитов ДОФУК и ГВК в стриатуме мышей на ранней и поздней клинической фазе ПС.

2.1. Исследование влияние производных адамантана на уровень дофамина и его метаболитов после однократного введения МФТП.

Дофамин является 2-(3,4-дигидроксифенил)-этиламином и относится к основным нейромедиаторам головного мозга. ДА образуется из аминокислоты тирозина. Основные пути метаболизма дофамина в организме показаны на схема1 (Под ред. Крыжановского, 2002).

Результаты влияния гимантана и мидантана при предварительном применении (20 мг/кг) на уровень дофамина и его метаболитов ДОФУК и ГВК в стриатуме мышей на ранней и поздней клинической фазе ПС, вызванного однократным введением МФТП представлены в Таб.2. Как видно из таб. 3., на ранней клинической фазе ПС, вызванной однократным введением МФТП в дозе 16 мг/кг в стриатуме головного мозга мышей снижается по сравнению с контролем уровень ДА с $9,24 \pm 2,4$ нмоль/мг ткани до $1,75 \pm 0,32$ нмоль/мг ткани ($p < 0,05$), ДОФУК $0,86 \pm 0,14$ нмоль/мг ткани до $0,13 \pm 0,03$ нмоль/мг ткани ($p < 0,05$) и ГВК с $2,23 \pm 0,3$, до $1,37 \pm 0,09$ ($p < 0,05$). Кроме того, отмечается рост оборота дофамина (отношения ГВК/ДА) с $0,42 \pm 0,1$ до $1,37 \pm 0,09$ ($p < 0,05$), что свидетельствует об усилении компенсаторных механизмов ДА в стриатуме животных на этой фазе развития ПС.

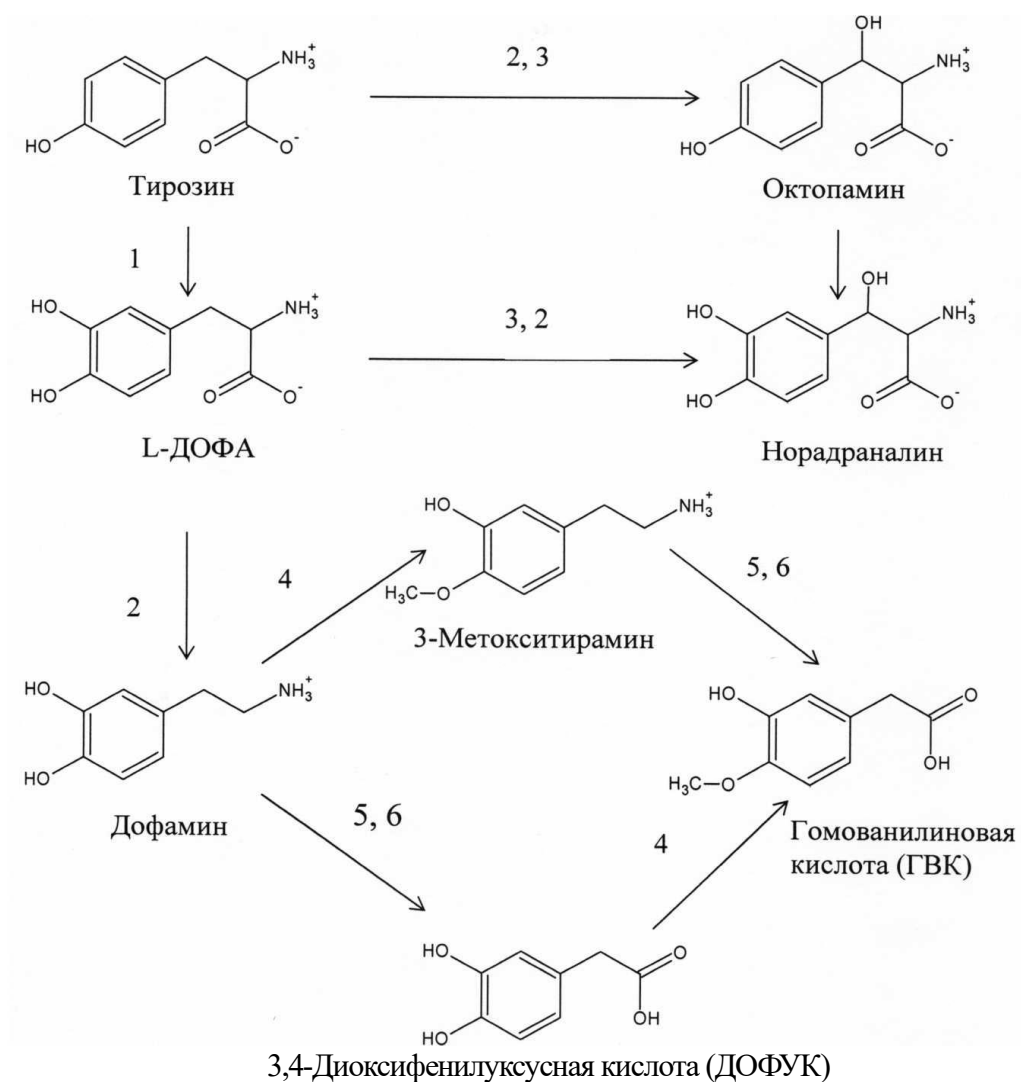


Схема 1 - Основные пути образования и обмена дофамина

1 – тирозингидроксилаза, 2 – ДОФА-декарбоксилаза, 3 – катехоламин-О-гидроксилаза, 4 – катехоламин-О-метилтрансфераза, 5 – моноаминоксидаза, 6 – альдегиддегидрогеназа

Таблица 3.

Влияние производных адамантана при предварительном применении на уровень дофамина и его метаболитов ДОФУК и ГВК в стриатуме мозга мышей на ранней и поздней клинической фазе ПС, вызванного однократным введением МФТП.

	МФТП 16 мг/кг					МФТП 40мг/кг				
Эксперим. группы	ДА, нмоль/мг ткани	ДОФУК, нмоль/мг ткани	ГВК, нмоль/мг ткани	ДОФУК/ДА	ГВК/ДА	ДА, нмоль/мг ткани	ДОФУК, нмоль/мг ткани	ГВК, нмоль/мг ткани	ДОФУК/ДА	ГВК/ДА
Контроль	9,24±2,4	0,86±0,14	2,23±0,3	0,12±0,03	0,42±0,1	9,24±2,4	0,86±0,14	2,23±0,3	0,12±0,03	0,42±0,1
МФТП	1,75±0,32*	0,13±0,03*	1,37±0,09*	0,07±0,01*	1,37±0,09*	0,78±0,41*	0,09±0,37*	0,15±0,03*	0,16±0,14	0,33±0,14
МФТП+ Гимантан	5,93±0,77#	0,4±0,04#	2,38±1,41	0,04±0,02#	0,84±0,2	1,7±0,6	0,1±0,01	0,97±0,45	0,02±0,01#	0,77±0,27
МФТП+ Мидантан	0,9±0,17*	0,3±0,01	1,05±0,36*	0,05±0,01*	1,05±0,36	0,46±0,37	0,05±0,04*	0,58±0,43	0,09±0,04	0,12±0,06

Примечание: * - $p < 0,05$ в сравнении с гр. контрольных животных; # - $p < 0,05$ в сравнении с группой МФТП.

Предварительное введение гимантана уменьшало падение содержания ДА, ДОФУК и ГВК до 64%, 46,5% и 61,4% от контрольных значений, соответственно ($p < 0,05$).

МФТП в дозе 40 мг/кг наблюдалось более глубокое снижение содержания ДА, ДОФУК и ГВК в стриатуме мышей, чем на ранней фазе. Предварительное введение как гимантана, так и мидантана не влияло на изменение содержания ДА, ДОФУК и ГВК в стриатуме мышей на поздней клинической фазе ПС.

2.2. Сравнительное изучение влияния производных адамантана при предварительном применении на моноаминов в стриатуме мышей на ранней и поздней клинической фазе 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 фазе ПС, вызванного многократным введением МФТП представлены в Таб.4.

На ранней клинической фазе ПС, вызванной многократным введением 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 фазе ПС отмечается также рост оборота дофамина ДОФУК/ДА и ГВК/ДА. Предварительное применение гимантана, в отличие от мидантана, повышало уровень ДА до 66% от контрольных значений, а также увеличивало содержание ДОФУК, ГВК, НА в 2, 4,6, 3,6 раза, соответственно. Повышение уровня метаболитов ДА, по-видимому, свидетельствует об усилении метаболизма этого катехоламина. На поздней клинической фазе 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.

Таблица 4.

Влияние производных адамантана при предварительном применении на уровень моноаминов в стриатуме мозга мышей на ранней и поздней клинической фазе ПС, вызванного многократным введением МФТП.

Экспериментальны е группы	Дофамин, нмоль/ мг ткани	ДОФУК нмоль/ мг ткани	ГВК, нмоль/ мг ткани	ДОФУК/Д А	ГВК/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 4х12 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 4х12+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 4х12+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 4х20мг/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 4х20+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 4х20+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: * - < 0,05 в сравнении с гр. контрольных животных; # -< 0,05 с группой МФТП 4х12 мг/кг.

На этой клинической фазе ПС предварительное применение гимантани 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 клинической фазе и не оказывало влияние на поздней клинической фазе ПС.

3. Морфометрический анализ дофаминергических нейронов ЧС

Разработка препаратов с нейропротективным действием предполагает глубокий анализ влияния исследуемого вещества на выраженность ПС у экспериментальных животных по средствам скрининговых анализов моторных дефицитов, метаболизма дофамина и тирозингидроксилаз-иммунореактивных ДА-нейронов в нигростриатной системе при различных схемах введения нейротоксина (Хаиндрава В.Г. и др., 2010). Важным количественным показателем нейродегенерации при моделировании ПС является потеря ДА-нейронов в ЧС.

В различных схемах введения нейротоксина МФТП в исследованиях других авторов демонстрировалось потеря ДА-нейронов в ЧС коррелирующая с величиной дозы нейротоксина и протоколом введения. Так, при введении МФТП в дозе 2×12 мг/кг в ЧС наблюдалось снижение количества нейронов на 26%, а при дозе МФТП 4×12 мг/кг — на 43% (Хаиндрава В.Г. и др., 2010). При моделировании развенутой симптомной стадии ПС введением МФТП 20 мг/кг х 4 отмечалось резкая потеря дофаминергических нейронов до 67% потерю TH-положительных нейронов в ЧС по сравнению с контрольной группой ($p < 0,001$), а плотность дофаминергических волокон полосатого тела, окрашенных TH, снижалось до 60% по сравнению с контрольной группой ($p < 0,001$) (Song M.K. et al., 2020).

При субхроническом протоколе введения МФТП (30 мг/кг в течении 5 дней) регистрировалась значительная потеря ТН-положительных нейронов в черной субстанции у обезьян (79,9%, $p < 0,0001$), а подсчет нейронов, окрашенных по Ниссли, подтвердил нейродегенерацию ($F(2,10) = 12,46$, $p < 0,01$) в группе МФТП (-66%, $p < 0,01$), сопровождающуюся значительным астроглиозом в ЧС (Deffains M. et al., 2021). Подходящим временем анализов результатов после введения МФТП в литературе считается срок от 14 дней до 21 дня (Witzig V.S. et al., 2020), (Mitsumoto Y. et al., 1998). Начинается дегенерация в течении первых 3х часов после последнего введения МФТП с поражения сначала аксонов, а затем тел нейронов, это окно считается, оптимальным для введения нейропротектора поскольку далее число нейронов не подвергается значительным колебаниям (Колачева А.А. и др., 2014). Хотя при исследовании на культуре тканей, было показано, что морфологические изменения начинаются с аксонов через 6 ч после введения МФП+ (Сурков С.А. и др., 2019) Прогрессирование нейродегенерации происходит и в других отделах мозга, к примеру, в тубероинфундибулярной системе, голубом пятне среднего мозга, затрагивает недофаминергические нейроны в ядре шва (Halliday G.M. et al., 1990). Дегенерация идет от дорсального моторного ядра вагуса и переднего обонятельного ядра к голубому пятну, ЧС и базальным отделам переднего мозга, а уже в поздней клинической стадии захватывает неокортекс, лимбическую кору, кору лобной и височных долей (Braak H. et al., 2004), вовлекается в патологический процесс со временем периферическая нервная система, иннервирующая сердце, желудочно-кишечный тракт, слюнные железы, надпочечники и ряд других органов (Braak H. et al., 2006). Появление симптомов только на поздней стадии дегенерации мозговых структур объясняется пластичностью мозга, проявляющаяся в длительном сохранении ингибирующего дофаминергического контроля гамма-аминомасляной кислоты (ГАМК-системы) стриатума, действующей через D2 рецепторы путем усиление синтеза дофамина, снижение продукции мембранного переносчика дофамина, частичная блокада ферментов

разложения дофамина и т.д. Таким образом можно объяснить несоответствие между незначительной выраженностью ПС в поведенческих тестах и весомой степенью нейродегенерации при морфологическом анализе (Угрюмов М.В., 2011).

Для анализа выживаемости популяций нейронов в ЧС в условиях моделирования ПС с помощью нейротоксина МФТП и способности препарата гимантана замедлять гибель ДА-нейронов проводилась визуализация дофаминергических нейронов методом иммуногистохимической окраски с помощью антител против тирозингидроксилазы. Морфометрического подсчета количества нейронов ЧС проводился в 5ти группах:

1. Группа контроля (введение физиологического раствора внутрибрюшинно)
2. Группа, с введением МФТП внутрибрюшинно в дозе 12 мг/кг 4 раза через 2 часа
3. Группа, с предварительным введением Гимантана в дозе 20 мг/кг 4 раза через 2 часа за 30 минут до введения МФТП 12 мг/кг (аналогично 4 раза через 2 часа).
4. Группа, с введением МФТП внутрибрюшинно в дозе 20 мг/кг 4 раза через 2 часа
5. Группа, с предварительным введением Гимантана в дозе 20 мг/кг 4 раза через 2 часа за 30 минут до введения МФТП 20 мг/кг (аналогично 4 раза через 2 часа).

В каждой группе по 4 мыши, анализировался каждый 5 срез, т.е. 60 срезов для одного животного в анатомической зоне головного мозга (Рис. 13).

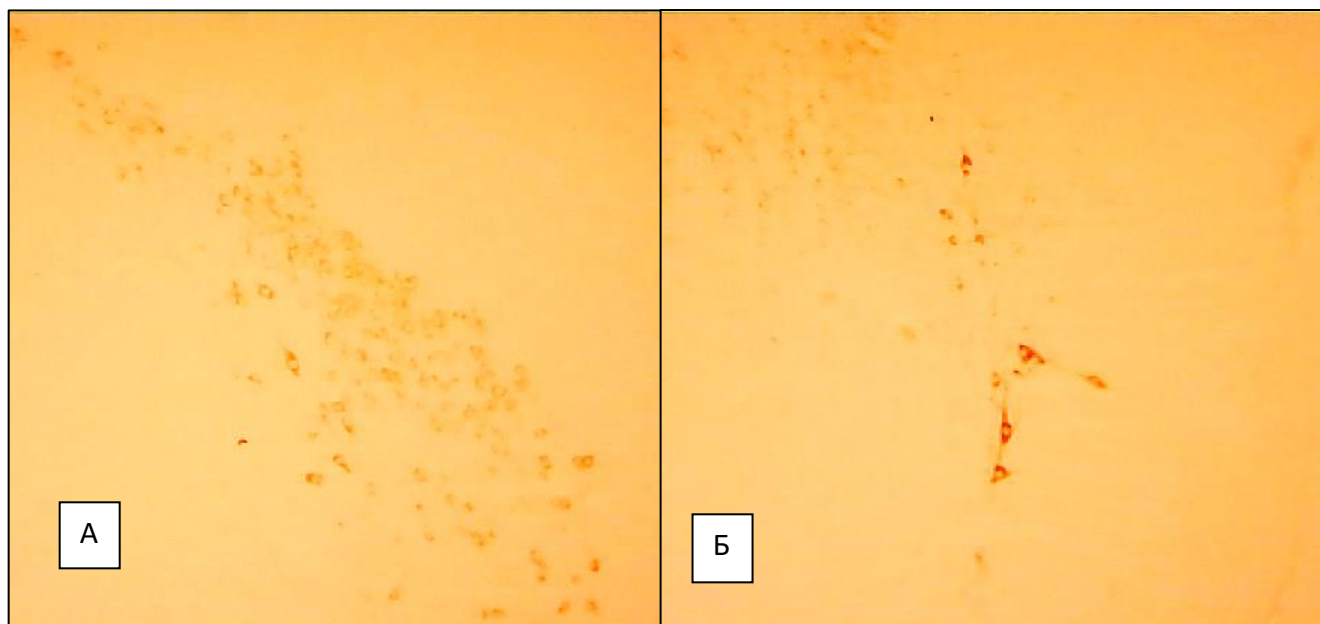


Рис. 13. Пример среза головного мозга в области подсчёта ТГ-позитивных нейронов ЧС. А – Животное из группы контроля (Гр.1). Б – Животное из Группы 4 (МФТП 20 мг/кг x 4 раза).

Проведение иммуногистохимического окрашивания на ТН и дальнейший количественный анализ нейронов показал достоверно $p < 0,05$ в группе контроля (Гр. 1) наибольшее в сравнении число нейронов ЧС $926,0 \pm 236,0$ среди всех групп. Нейроны, подверженные окраски ТН считались дофаминергическими. Внутривентрикулярное введение МФТП вызывает потерю $ТН^+$ нейронов в ЧС у мышей, количественно прямо коррелирующую с дозой нейротоксина. На ранней фазе ПС, вызванной ведением МФТП в дозе 12 мг/кг x 4 количество $ТН^+$ нейронов в ЧС снижается от контроля до 67% ($P < 0,05$), а на поздней фазе, 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. 14). При

моделировании поздней стадии ПС гимантан не столь эффективен и сохраняет лишь ~27% нейронов ЧС от контроля, что не достаточно для поддержания полноценной работы дофаминергической системы базальных ганглиев и, вероятно, не оказывает существенного положительного эффекта на выраженность ПС (Рис. 14). Так, нами обнаружено почти двухкратное увеличение потери нейронов при повышении дозы МФТП с 12 мг/кг х 4 до 20 мг/кг х 4, что в целом согласуется с исследованиями других авторов (Laloux S. et al., 2008). Следует отметить, что моделирование начальной и поздней стадии ПС по средствам введения разных доз нейротоксина МФТП приводит к нейродегенерации в ЧС, снижению уровня ДА и его метаболитов и к развитию бракинезии и ригидности у мышей в разной степени выраженности (Табл. 5).

	МФТП-индуцированный ПС у мышей					
	Контроль (NaCl п/к х 4)	Ранняя стадия ПС (МФТП 12 мг/кг х 4)		Поздняя стадия ПС (МФТП 20 мг/кг х 4)		
Тест «Открытое поле» дл. пробега, число стоек, время покоя		1175 ± 60,3 15,1 ± 1,9 176,4 ± 12,4		305,4 ± 59,1** 3,9 ± 1,5** 285,6 ± 11,8**		156,2 ± 112,1 3,2 ± 2,1 264,0 ± 51,4**
Тест Ротарод		178,7±0,8		78,3±6,0*		23,8±4,1*
Дофамин, ДОФУК, ГВК нмоль/ мг ткани		14,49±2,39 (100%) 0,86±0,14 (100%) 2,23±0,3 (100%)		~16,6% (2,41±0,63*) ~44,7% (0,52±0,15) ~44,8% (1,0±0,21)		~2,7% (0,4±0,11) ~10,5% (0,09±0,02) ~3,1% (0,7±0,23)
Кол-во TH+ нейронов		926,0±236,0		~32% (299,7± 54,0)		~13,2% (122,2±21,6)

Табл. 5 Сравнение модели ранней и поздней стадии ПС по результатам теста «Открытое поле», уровня ДА и его метаболитов в стриатуме, плотности TH⁺- позитивных нейронов.

Снижение плотности нейронов в ЧС было обнаружено в 5 группе $250,6 \pm 33,2$, где МФТП вводили также в дозе 20 мг/кг х 4 раза, но с предварительным введением Гимантана 20 мг/кг ($p=0,0156$). В группе 3 с применением Гимантана 20 мг/кг, где количество нейронов составило $716,7 \pm 99,7$ ($p=0,001473$), что наиболее близко из всех 4 групп с введением МФТП к результатам контрольной группы (Табл. 6, Рис. 14).

Экспериментальные группы	Число ТН+ нейронов ЧС	Р
Контроль	$926,0 \pm 236,0$	
МФТП 4х12мг/кг	$299,7 \pm 54,0$	0,01701
МФТП 4х12мг/кг + Гимантан 20 мг/кг х 4	$716,7 \pm 99,7$	0,001473
МФТП 4х20 мг/кг	$122,2 \pm 21,6$	
МФТП 4х20 мг/кг + Гимантан 20 мг/кг х 4	$250,6 \pm 33,2$	0,0156

Таблица 6. Результаты анализа среднего количества ТН-позитивных нейронов в ЧС при подсчете с интервалом в 5 срезов.

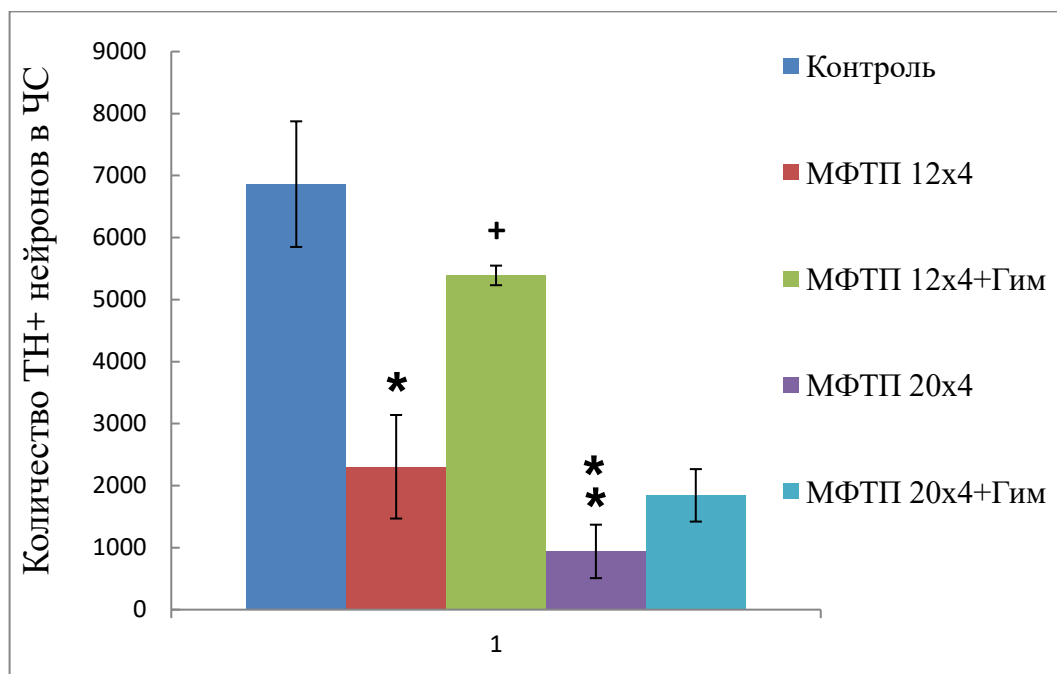


Рис. 14. Среднее число выживших (ТН⁺) нейронов в черной субстанции на ранней и поздней клинической форм паркинсонического синдрома у мышей C57BL/6J с поправкой на диаметры ядер по формуле Аберкромли.

Примечание: *-< 0,05 , **-<0,01 в сравнении с гр. контроля; + - <0,05 в сравнении с гр. МФТП 12х4.

Для выяснения механизма нейропротективного эффекта гимантана изучали его воздействие на уровень провоспалительных цитокинов ИЛ-1 β , ИЛ-6, Интерферона- γ , ФНО- α , ООС, АОС и ИОС в nigrocaudate complex мышей на ранней и поздней клинической фазе ПС у мышей. Мы также изучали влияние hemantane на кальциевый гомеостаз.

4. Изучение уровня провоспалительных цитокинов на ранней и поздней клинической стадии паркинсонического синдрома.

Воздействие гимантана

Болезнь Паркинсона (БП) является тяжелым нейродегенеративным заболеванием, часто приводящим к инвалидности, которая характеризуется повреждением и гибелью дофаминергических нейронов в черной субстанции и резким снижением уровня дофамина в стриатуме головного мозга. Одним из главных механизмов гибели nigrostriatal нейронов при паркинсонизме является нейровоспаление в результате активации микроглии, что приводит к усиленному выделению провоспалительных цитокинов в мозге, которые активируют фермент циклооксигеназа-2 и транскрипционный фактор NF- κ B, вызывающий апоптоз ядра (Кучеряну В.Г. и др., 2012), (Pajares M. et al., 2020).

В предыдущих наших исследованиях показано, что производный адамантана – гимантан оказывал антипаркинсонический и нейропротективный эффекты, снижая выраженность паркинсонической симптоматики на ранней фазе развития ПС у мышей, вызванного введением пронеуротоксина МФТП (Воронина Н.А. и др., 2019). Гимантан на экспериментальной модели нейровоспаления, индуцированной инъекцией липополисахарида, предотвращал потерю массы тела, развитие акинезии

животных, а также снижал уровень цитокина ИЛ-6 в крови (Таллерова А.В. и др., 2013; Ivanova E.A. et al., 2014).

Для выяснения механизма нейропротективного эффекта гимантана изучали его воздействие на уровень провоспалительных цитокинов ИЛ-1 β , ИЛ-6, Интерферона- γ и ФНО- α в нигрокаудатном комплексе мышей на ранней и поздней клинической фазе ПС у мышей.

Результаты по влиянию предварительного введения гимантана на содержание цитокинов в нигрокаудатном комплексе мозга мышей на разных стадиях развития паркинсонического синдрома представлены на рис.15 - 18.

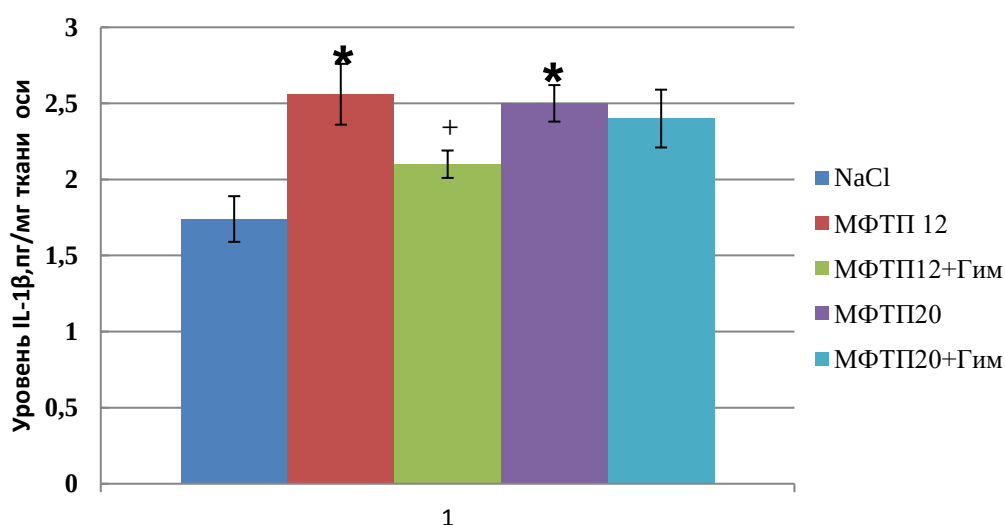


Рис.15. Уровень ИЛ-1 β в нигрокаудатном комплексе мышей на ранней и поздней клинической фазе ПС «NaCl» - животные, которым вводили внутривбрюшинно раствор NaCl (контроль); «4x12 МФТП» - животные, которым вводили внутривбрюшинно раствор МФТП в дозе 12 мг/кг, 4 раза с интервалом 2 часа; «4x20 МФТП» - животные, которым вводили внутривбрюшинно раствор МФТП в дозе 20 мг/кг, 4 раза с интервалом 2 часа.

Примечание: * - <0,05 в сравнении с групп. NaCl; +-<0,05 в сравнении с групп. «4x12 МФТП».

(Воронина Н.А. и др. Изучение влияния гимантана на уровень провоспалительных цитокинов в нигрокаудатном комплексе мозга мышей при экспериментальном паркинсонизме // Патогенез. - 2021 — Т. 19, № 1. - С. 45-49.).

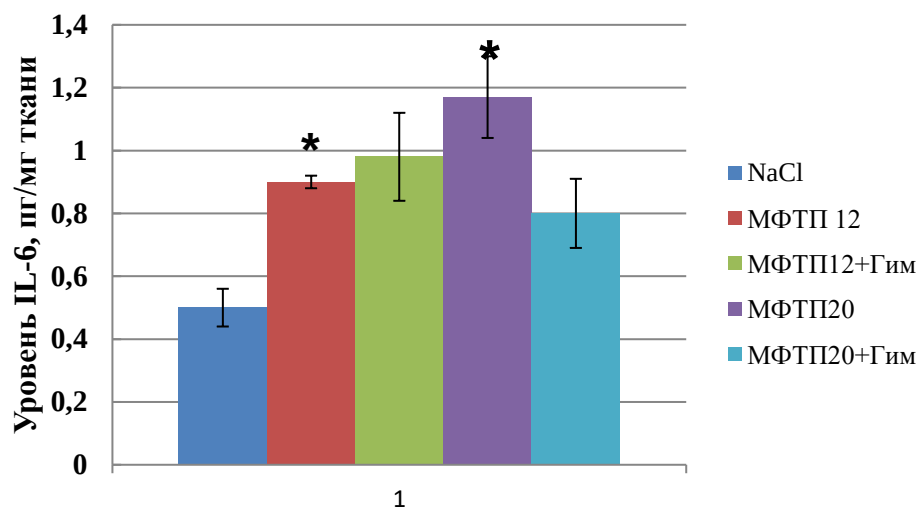


Рис.16. Уровень IL-6 в nigrocaudate complex мышей на ранней и поздней клинической фазе ПС. Примечание: Остальные обозначения как на рис. 15

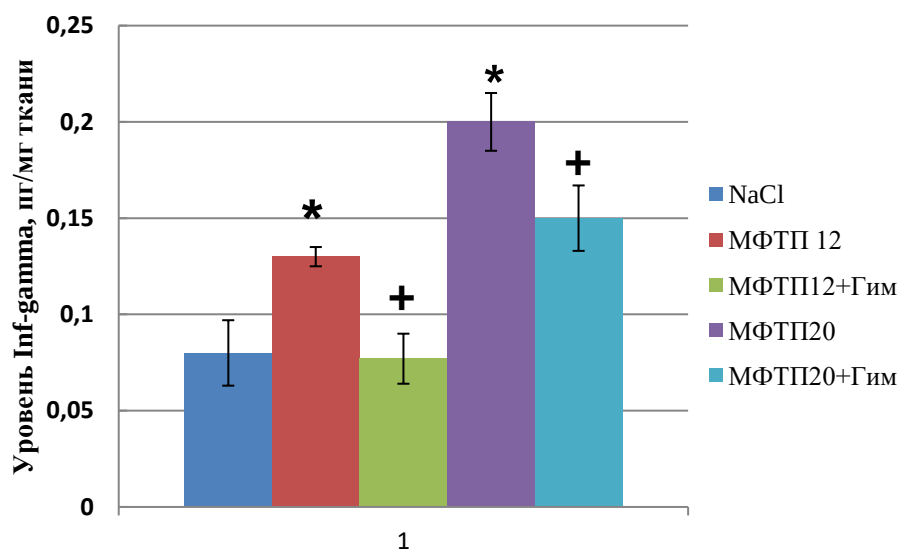


Рис.17. Уровень интерферона- γ в nigrocaudate complex мышей на ранней и поздней клинической фазе ПС. Примечание: Остальные обозначения как на рис. 15

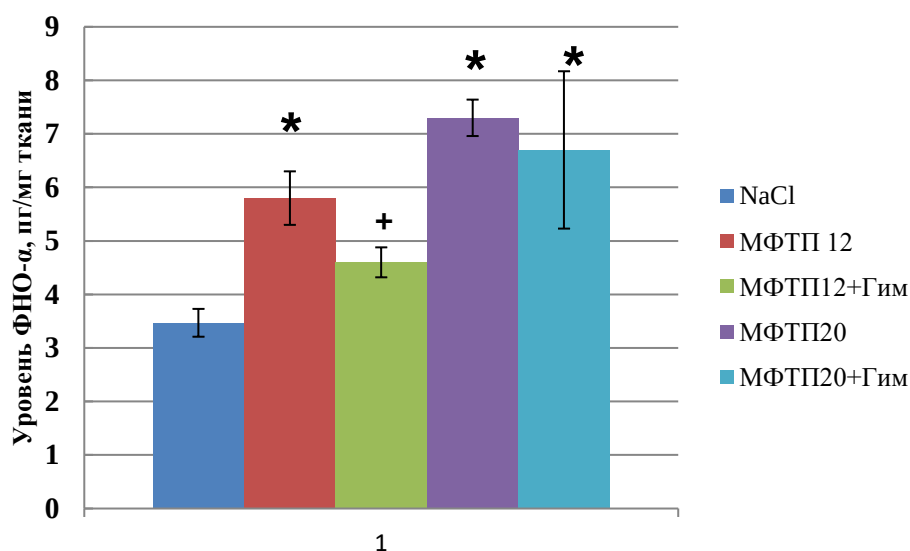


Рис. 18. Уровень ФНО-α в nigrocaudate complex мышей на ранней и поздней клинической фазе ПС. Примечание: Остальные обозначения как на рис. 15.

(Воронина Н.А. и др. Изучение влияния гимантана на уровень провоспалительных цитокинов в nigrocaudate complex мозга мышей при экспериментальном паркинсонизме // Патогенез. - 2021 — Т. 19, № 1. - С. 45-49.).

На ранней клинической фазе ПС, вызванной введением МФТП (4 раза по 12 мг/кг) в nigrocaudate complex мышей было обнаружено увеличение уровня ИЛ-1β, ИЛ-6, Ин-γ и ФНО-α по сравнению с контролем. Предварительное введение гимантана приводило к снижению содержания цитокинов ИЛ-1β с $2,56 \pm 0,2$ пг/мг ткани до $2,1 \pm 0,09$ пг/мг ткани ($p=0,38$), Ин-γ с $5,96 \pm 0,5$ пг/мг/ткани до $4,6$ пг/мг ткани ($p=0,02$) и ФНО-α с $5,96 \pm 0,5$ пг/мг ткани до $4,6 \pm 0,28$ пг/мг ткани ($p=0,024$) в nigrocaudate complex мышей после введения МФТП в дозе 4 x 12 мг/кг. На поздней клинической фазе ПС, вызванной введением МФТП в дозе 4 x 20 мг/кг наблюдали увеличение уровня всех изученных цитокинов. Предварительное введение гимантана уменьшало только уровень цитокина ИЛ-6 с $1,22 \pm 0,8$ пг/мг/ткани до $0,8 \pm 0,1$ пг/мг ткани ($p=0,02$) в nigrocaudate complex мышей с поздней стадией ПС.

Таким образом, гимантан, при предварительном применении, был способен более эффективно предотвращать образование провоспалительных

цитокинов на ранней клинической стадии паркинсонизма, чем на поздней. Предполагается, что антипаркинсонический эффект гимантана осуществляется, в том числе, за счет снижения уровня провоспалительных цитокинов в nigrostriatalной системе. Основные результаты раздела опубликованы (Воронина Н.А. и др., 2021).

Повышение уровня провоспалительных цитокинов ИЛ-1 β , ИЛ-6, Ин- γ и ФНО- α в мозге также было выявлено у мышей линии C57BL/6J с ПС, вызванным введением МФТП в дозе 30 мг/кг, 1 раз в день в течение 7-и дней (Rodríguez-Cruz A. et al., 2019).

Нейровоспаление - важная часть патогенеза БП. Микроглия играет роль в деградации α -синуклеина и фагоцитозе поврежденных нейронов, что является нейропротекторным свойством микроглии при сбалансированной активации. Первоначальная активность про- и противовоспалительных факторов, которые включают цитокины, хемокины и активные формы кислорода и азота, запускают процессы восстановления нейронов, позволяющие контролировать удаление клеточного дебриса и агрегированные формы α -синуклеина. Однако постоянное присутствие агрегатов белка α -синуклеина приводит к длительной активации воспалительного процесса в мозге (Phani S. et al., 2012; Goswami P. et al., 2017). Исследования *in vitro* дали основания предположить, что отложение α -синуклеина и воспалительные изменения усиливают патогенную активность друг друга и участвуют в прогрессировании нейродегенерации при болезни Паркинсона (Gao H.M. et al., 2011). Активация микроглии отмечалась у крыс после избыточной экспрессии α -синуклеина в дофаминеских нейронах среднего мозга (Ulusoy A. et al., 2010). Исследования с использованием неинвазивной позитронно-эмиссионной томографии (ПЭТ) с использованием РК-11195, лиганда периферического бензодиазепинового рецептора (PBR; также известного как митохондриальный транслокаторный белок 18 кДа или TSPO), который селективно экспрессируется активированной микроглией, дополнительно подтвердили возникновение активации микроглии у пациентов с БП (Gerhard A. et al., 2006).

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

БП является хроническим и прогрессирующим нейродегенеративным заболеванием, развивающимся в результате повреждения и гибели дофаминергических нейронов в субстанции Нигра (Крыжановский Г.Н., 2002; Угрюмов М.В., 2011). Причина смерти этих нейронов неясна. Однако исследования показали, что окислительный стресс (ОС) и факторы, способствующие его развитию, такие как нарушение дисфункций митохондрий, образование фибрилл α -синуклеина, окисление дофамина, снижение мощности антиоксидантной системы, стресс эндоплазматического ретикулума являются одними из главных механизмов гибели нигростриатных дофаминергических нейронов при БП (Puspita L. et al., 2017; Feitosa C.M. et al., 2018; Singh A. et al., 2019).

ОС - процесс повреждения клеток в результате окисления (Меньщикова Е.Б. и др., 2006). ОС представляет собой значительное увеличение клеточного редокс-потенциала или существенное снижение восстановительной способности клеточных редокс-пар, таких как окисленный/восстановленный глутатион. Эффект окислительного стресса зависит от силы его выраженности. Клетки могут вернуться в исходное состояние при небольших нарушениях. Однако более выраженный окислительный стресс вызывает клеточную смерть. ОС индуцируется активными формами кислорода (АФК), в их состав входит свободные радикалы и пероксиды. Одним из наиболее реактивных АФК является O^{2-} , который может дисмутировать спонтанно с водой в O^2 и H_2O_2 . (O^{2-}) в присутствие ионов металлов, например Fe^{2+} , превращается в наиболее агрессивные гидроксильные радикалы, которые могут вызвать повреждение клеточных компонентов (плазматических мембран, липидов ДНК, белков). АФК постоянно образуются в клетке, но их

уровень в норме небольшой, вследствие того, что клетки инактивируют их с помощью антиоксидантной системой. Если уровень АФК превышает защитные возможности клетки, то наступают срезные клеточные повреждения, например истощение запасов АТФ. Нейроны мозга особенно подвержены ОС, поскольку их мембраны содержат большое количество ненасыщенных жирных кислот, а они сами используют обильно кислород. В зависимости от силы ОС клетки погибают либо от апоптоза, либо от некроза (Крыжановский Г.Н., 1997; Cadet J.L., Brannock C., 1998; Кучеряну В.Г., 2000; Угрюмов М.В., 2011; Угрюмов М.В., 2014; Puspita L. et al., 2017; Singh A. et al., 2019).

С целью выяснения роли гимантана в нарушении процесса перекисного окисления липидов на ранней и поздней стадии развития ПС мы изучали его воздействие на изменение уровня ООС, АОС и ИОС в нигростриатном комплексе мозга мышей с разными фазами развития ПС.

Результаты по измерению ООС, ОАС и ИОС в нигрокаудатном комплексе мышей контрольной группы и мышей, которым вводили МФТП в дозе 4 x 12 мг/кг МФТП и 4 x 20 мг/кг МФТП представлены на Рис. 19-21.

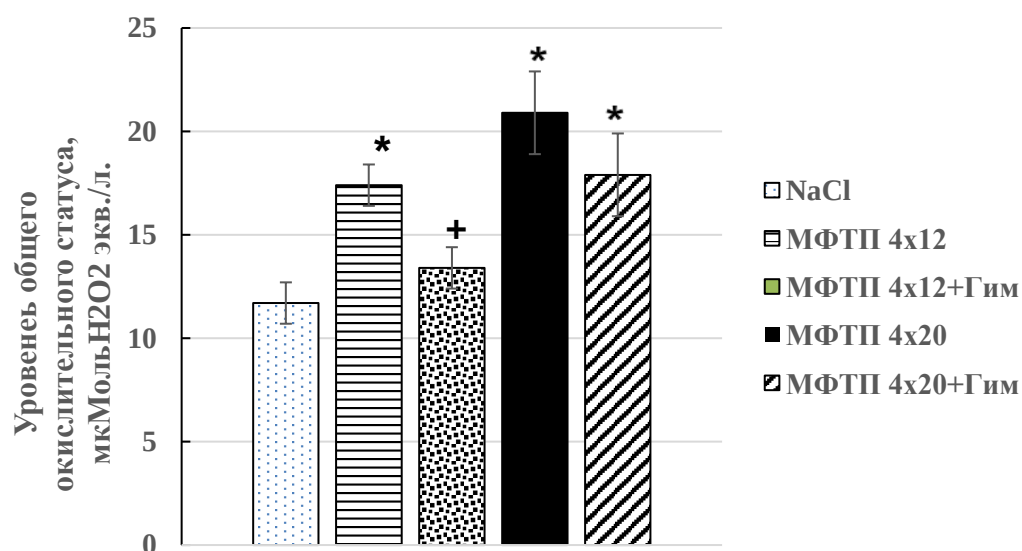


Рис. 19. Уровень общего окислительного статуса в нигростриатном комплексе группы мышей C57BL/6J на разных клинических стадиях паркинсонического синдрома. «NaCl» - животные, которым вводили внутривенно раствор

NaCl (контроль); «4 х 12 МФТП» - животные, которым вводили внутривбрюшинно раствор МФТП в дозе 12 мг/кг, 4 раза с интервалом 2 часа; «4 х 20 МФТП» - животные, которым вводили внутривбрюшинно раствор МФТП в дозе 20 мг/кг, 4 раза с интервалом 2 часа.

Примечание: * - $<0,05$ в сравнении с групп. NaCl; +- $<0,05$ в сравнении с групп. «4 х 12 МФТП».

На ранней клинической стадии ПС, вызванной введением МФТП (4х12 мг/кг) наблюдается увеличение уровня ООС в нигрокаудатном комплексе мышей ($p<0,05$). На поздней клинической стадии ПС, вызванной введением МФТП (4 х 20 мг/кг) наблюдается еще больше увеличение уровня ООС в нигрокаудатном комплексе мышей ($p<0,05$). Предварительное введение гимантана за 30 мин до начала введения МФТП снижало уровень ООС в нигрокаудатном комплексе мышей на ранней стадии развития ПС ($p<0,05$) и не изменяло уровень ООС в нигрокаудатном комплексе мышей на поздней стадии развития ПС. (Рис.19).

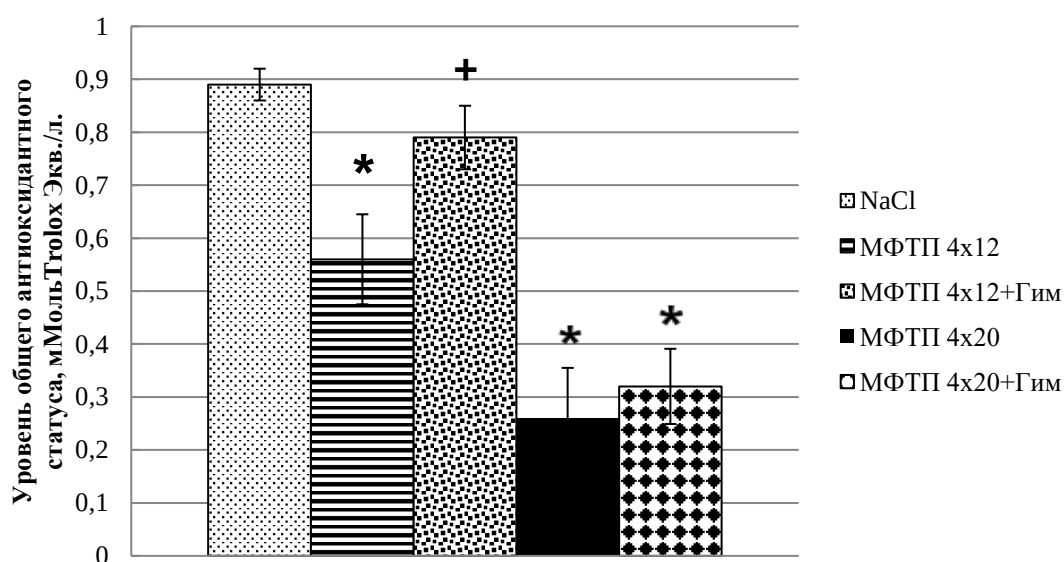


Рис. 20. Уровень общего антиокислительного статуса ОАС) в нигростриатном комплексе группы мышей C57BL/6J на разных клинических стадиях паркинсонического синдрома.

«NaCl» - животные, которым вводили внутривбрюшинно раствор NaCl (контроль); «4x12 МФТП» - животные, которым вводили внутривбрюшинно раствор МФТП в дозе 12 мг/кг, 4 раза с интервалом 2 часа; «4x20 МФТП» - животные, которым вводили внутривбрюшинно раствор МФТП в дозе 20 мг/кг, 4 раза с интервалом 2 часа.

Примечание: * - $p < 0,05$ в сравнении с групп. NaCl; +/- $p < 0,05$ в сравнении с групп. «4x12 МФТП».

*

На ранней клинической стадии ПС, вызванной введением МФТП (4x12 мг/кг) наблюдается снижение уровня ОАС в нигрокаудатном комплексе мышей ($p < 0,05$). На поздней клинической стадии ПС, вызванной введением МФТП (4x20 мг/кг) наблюдается еще более значительное снижение уровня ОАС в нигрокаудатном комплексе мышей ($p < 0,05$). Предварительное применение гимантана за 30 мин до начала введения МФТП предотвращало снижение уровня ОАС в нигрокаудатном комплексе мышей на ранней стадии развития ПС ($p < 0,05$) и не влияло на уровень ОАС в нигрокаудатном комплексе мышей на поздней стадии развития ПС. (Рис.20).

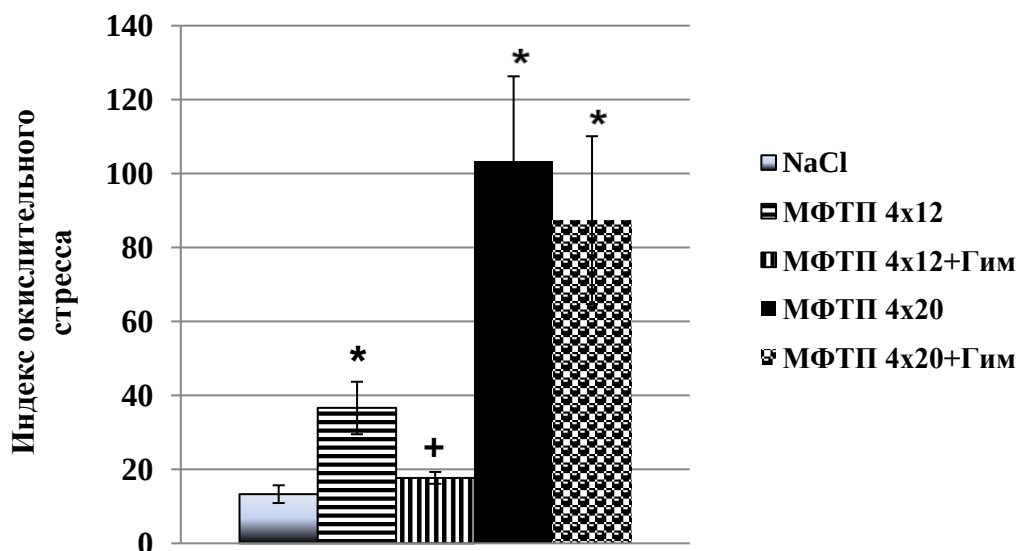


Рис. 21. Уровень индекса окислительного статуса (ИОС) в нигростриатном комплексе группы мышей C57BL/6J на разных клинических стадиях паркинсонического синдрома. Другие обозначения как на рис.19.

На ранней клинической стадии ПС, вызванной введением МФТП (4х12 мг/кг) наблюдается увеличение уровня ИОС в нигрокаудатном комплексе мышей ($p < 0,05$). На поздней клинической стадии ПС, вызванной введением МФТП (4х20 мг/кг) ИОС возрастал в 7,9 раз по отношению к контролю. Предварительное введение гимантана снижало уровень ИОС в нигрокаудатном комплексе мышей на поздней стадии развития ПС (Рис.21).

Таким образом, нами было выявлено повышение уровня ООС и ИОС и снижение уровня ОАС в нигрокаудатном комплексе мышей, как на ранней стадии, так и на поздней стадии развития ПС. При этом изменения отмеченных параметров были более выражены на поздней стадии развития ПС. Предварительное ведение гимантана предотвращало повышение уровня ООС и ИОС и снижение уровня ОАС нигрокаудатном комплексе мышей только на ранней стадии развития ПС. По-видимому, на поздней клинической стадии ПС, гимантан не в состоянии увеличивать мощность антиоксидантной системы для предотвращения усиления окислительного стресса в нигростриатной системе. Обнаруженный антипаркинсонический и нейропротекторный эффекты гимантана на ранней стадии развития ПС можно объяснить его способностью предотвращать увеличение уровня ООС и снижение уровня ОАС, предотвращая нарушение регуляции процесса перекисного окисления липидов, и тем самым, защищая нигростриатных дофаминергических нейронов от повреждения и гибели.

В проведенных клинических исследованиях на большом количестве образцов плазмы больных с БП (240 пациентов) и 150 здоровых лиц показано достоверное увеличение ООС, ИОС и снижение ОАС (Verma A.K. et al., 2015). В физиологических условиях АФК через митоген-активированной протеинкиназный и фосфоинозитид-3-киназный пути участвуют в регуляции ответов клеток на ростовые факторы и цитокины (Seo J.H. et al., 2005).

Снижение активности ферментов антиоксидантной системы (супероксид дисмутаза, каталаза, глутатион редуктаза) и уровня антиоксидантов (аскорбиновой кислоты, мочевой кислоты, α -токоферола,

восстановленного глутатиона) приводит к развитию ОС, который вызывает окислительное повреждение липидов, ДНК и белков и часто смерть нейронов (Rego A.C., Oliveira C.R., 2003; Sies H. et al., 2017; Feitosa C.M. et al., 2018). Есть публикации, в которых сообщается о наличии ОС путем обнаружения окисленных липидов, ДНК и белков в тканях мозга больных как семейных, так и спорадических форм БП (Nakabeppu Y. et al., 2007). Увеличение уровня ООС и снижение ОАС выявлено также в плазме больных с БП (Verma A.K. et al., 2015). У здоровых людей в ЧС концентрация окисленных белков была в 2 раза выше, чем в хвостатых ядрах, скорлупе и коре, что свидетельствует о восприимчивости нигральных ДА-ергических нейронов к ОС, способствующему их дегенерации (Floor E.; Wetzel M.G., 1998).

Основным источником образования АФК, в частности супероксидный радикал, является дыхательная цепь переноса электронов в поврежденных митохондриях при БП (Drose S., Brandt U. , 2008).

Другим источником повышенного образования АФК может быть эндоплазматический ретикулум, в матриксе которого происходит синтез белков. Во время сборки белка возникают дисульфидные связи и этот процесс сильно зависит от окислительно-восстановительного статуса, а АФК образуются как побочный продукт. Количественный анализ показал, что возникновение дисульфидных связей во время сборки белков приводит к образованию 25 % от общего количества АФК (Princiotta M.F. et al., 2003).

Предполагается, что процесс олигомеризации мономерных форм α -синуклеина сопровождается усилением ОС. Большое количество фибрилл α -синуклеина было обнаружено в тельцах Леви при БП. Обнаруженное в некоторых исследованиях обильное накопление растворимых мономерных форм α -синуклеина, из которых образуются фибриллы этого белка, было предложено использовать в качестве патологического индикатора на ранних стадиях БП (Volles M.J.; Lansbury P.T. Jr., 2003; Bellucci Zaltieri M. et al., 2012). Кроме того, накопление α -синуклеина наблюдалось в нейронах, полученных от пациентов с мутациями PINK1 или Parkin, наряду с морфологическими

нарушениями митохондрий и повышенной чувствительностью к окислительному стрессу (Chung S.Y. et al., 2016). В нейронах олигомеры α -синуклеина, запускали окислительный стресс сильнее, чем мономеры и фибриллы. В нейронах, обработанных только олигомерным α -синуклеином, обнаружено снижение уровня глутатиона и увеличение интенсивности перекисного окисления липидов (Bellucci Zaltieri M. et al., 2012). Химические свойства липидов также сильно влияют на кинетику мембран-индуцированной агрегации α -синуклеина (Brown J.W.P. et al., 2016; Baekelandt V. et al., 2020).

Сам дофамин является высокореактивным, поэтому при нейродегенеративном процессе его метаболизм, может быть источником образования АФК. Поскольку ДА легко окисляется, и в цитоплазме с помощью VMAT2 заключаются в синаптические пузырьки. Свободный ДА подвергается деградации MAO B, в результате образуются ДОФАЛ и H_2O_2 - продукты, обладающие высокими окислительными свойствами. ДОФАЛ может превратиться в менее реактивный продукт ДОФУК (Goldstein D.S. et al., 2013; Meiser J. et al., 2013).

6. Биоэлектрическая активность мозга на фоне введения гимантана у мышей с экспериментальным паркинсоническим синдромом.

Изменения в структурах включенных в патогенез при БП оказывают влияния на ЭЭГ активность разных участков головного мозга. При ПС наблюдается усиление медленной ЭЭГ-активности диффузно в диапазоне дельта и тета волн (Neufeld M.Y. et al., 1988), степень которой сопоставима с выраженностью двигательных нарушений у пациентов с БП. Исследование функциональной активности головного мозга больных БП на основе спектрально-когерентного анализа ЭЭГ показало, что на начальных стадиях заболевания биоэлектрическая активность мозга сохраняется в пределах возрастной нормы, однако появляется характерная пачкообразная бета-активность, с источником её генерации в срединных структурах головного (Неробкова Л.Н., и др., 2002; Аракелян Р.К. и др., 2005). Запись локальных

потенциалов субталамических ядер у пациентов с БП продемонстрировала выраженную активность в бета-диапазоне 15-30 Гц (Weinberger M. et al., 2006).

У животных с экспериментальным ПС на фоне введения МФТП также обнаруживаются изменения биоэлектрической активности головного мозга. Так, у крыс с ПС после МФТП регистрируются пароксизмальные разряды быстрых и медленных волн, повышение мощности ЭЭГ в спектре медленных волн в области сенсомоторной коры (СК) и ЧС, а в хвостатом ядре (ХЯ) эти пароксизмы становятся устойчивыми (Неробкова Л.Н., и др., 2000). Исследования корреляции между выраженностью ПС у обезьян после длительного введения МФТП и изменениями ЭЭГ также подтвердили такую взаимосвязь (Devergnas A. et al., 2014). В том же исследовании показано, что лечение леводопой не противодействует или не нормализует патологические спектральные паттерны в субталамическом ядре, но, по-видимому, в более общем плане снижает мощность на более низких частотах и увеличивает мощность на более высоких частотах этих сигналов. Так тяжесть паркинсонизма коррелирует с когерентностью между базальными ганглиями или моторной корой в диапазоне частот 7,8–15,5 Гц и 15,6–23,3 Гц. Связанное с паркинсонизмом повышение когерентности не было отменено противопаркинсоническими дозами леводопы. Из чего делается вывод о недофаминергическом происхождении таких изменений на ЭЭГ, а следовательно потребности в дальнейших исследованиях влияния препаратов-кандидатов для лечения ПС на выраженность изменений биоэлектрической активности. В связи с вышеизложенным нами был проведен анализ биоэлектрической активности разных структур головного мозга (ЧС, СК, ХЯ) у мышей с ПС на начальной и развернутой стадии ПС, и изучено влияние гимантана на ЭЭГ изменения.

Визуальный анализ полученных электрограмм выявил дизритмичный характер фоновой биоэлектрической активности мозга мышей контрольной группы (введение физ. раствора) с наличием быстрых и медленных волн в широком диапазоне частот (от 1,0 до 32 Гц), в котором выделяются

стандартные группы: дельта-, тета1-, тета2-, бета1-, бета2-частот (1-3,5; 4-7; 8-12; 13-20; 21-30 Гц, соответственно), с амплитудой от 0,5 до 80 мкВ (Рис. 22).

В электрограммах сенсомоторной области коры отмечалась более низкая амплитуда биоэлектрической активности, чем в других структурах (Рис. 22), при этом во всех анализируемых структурах более регулярной была активность в диапазоне дельта- (1-3,5 Гц) и тета1- частот (4-7 Гц), с некоторым превалированием тета1-волн в диапазоне 4-5 Гц, особенно в ЧС (Рис. 23). Отмеченный характер фоновой биоэлектрической активности отражает работу мозга животных в спокойном состоянии, в норме, и соответствует общепринятым стандартам (Buzsáki G. et al., 2003).

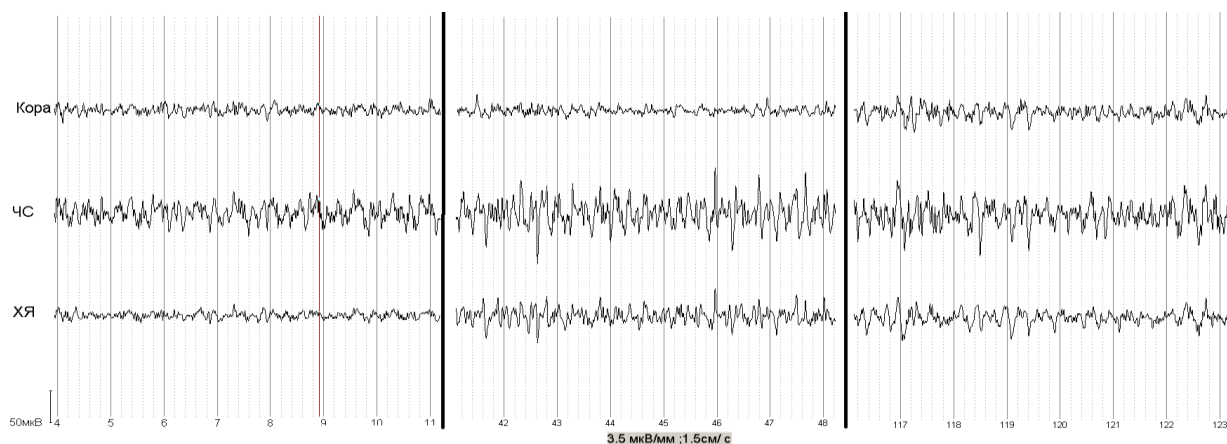


Рис. 22. Примеры электрограмм мышей C57Bl/6 группы «Контроль» (введение физ. раствора).

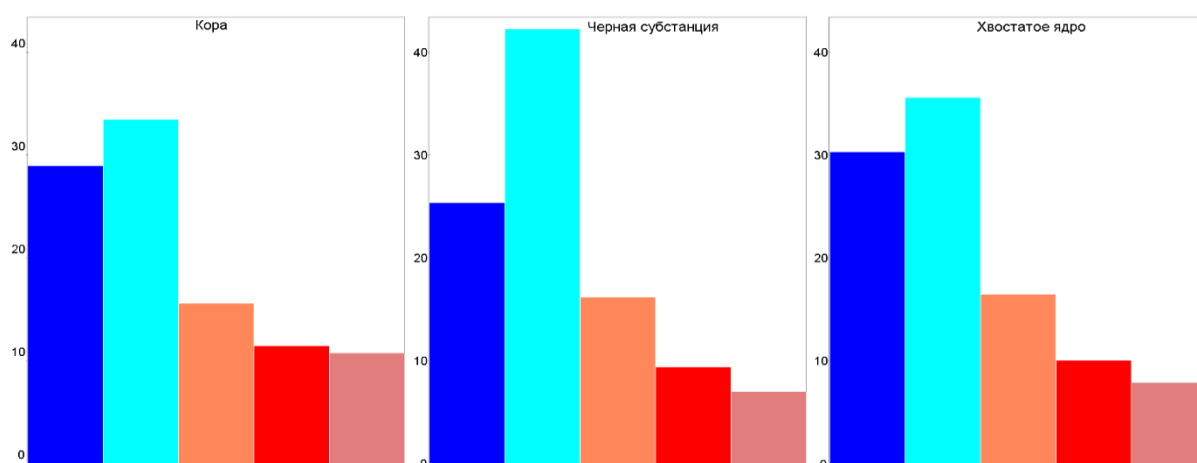


Рис. 23. Автоспектры процентной мощности диапазон волн от всего диапазона волн (%) в электрограммах мышей группы «Контроль» (введение физ.раствора).

По оси ординат – %; по оси абсцисс – диапазон волн биоэлектрической активности мозга мышей: где ■ (1-3,5 Гц) дельта, ■ (4-7 Гц) тета1, ■ (8-12 Гц) тета2, ■ (13-20 Гц) бета1, ■ (21-30 Гц) бета2.

Введение мышам МФТП в дозе 12 мг/кг х 4 вызвало характерные изменения биоэлектрической активности во всех исследуемых структурах мозга животных, что регистрировалось и через 14 дней после воздействия токсина. Визуальный и спектральный анализы полученных электрограмм мозга мышей группы «МФТП 12х4» выявили повышение амплитуды всех групп волн во всех отведениях (Рис. 24; Рис. 25), достигавшее значимости в диапазоне дельта-волн в СК, ЧС и ХЯ, и в диапазонах тета- и бета-волн в ЧС и ХЯ, а также увеличение спектра мощности в области дельта-волн и её снижение во всех других диапазонах волн во всех анализируемых структурах по сравнению с животными контрольной группы (Рис. 26).

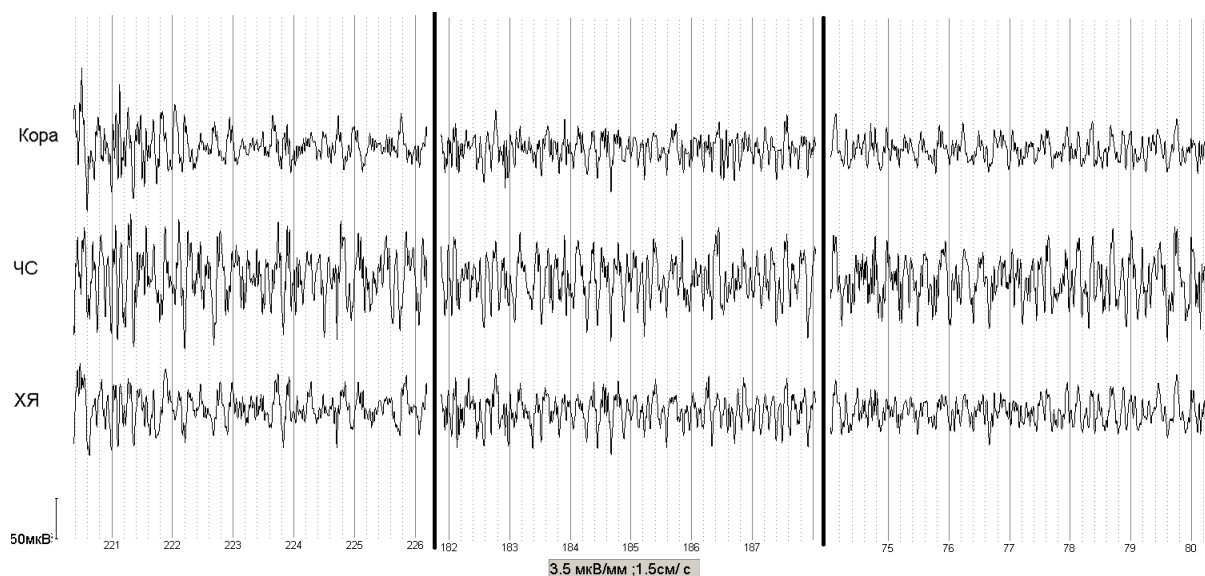


Рисунок 24. Примеры электрограмм мышей C57Bl/6 группы «МФТП 12х4».

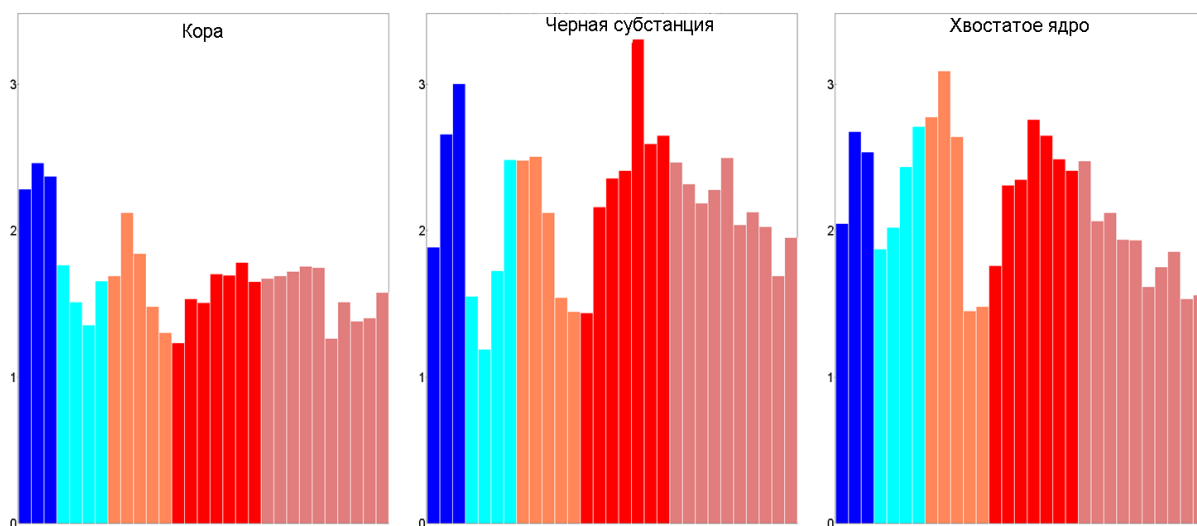


Рисунок 25. Изменение амплитудных автоспектров отдельных волн от всего диапазона волн (%) в электрограммах мышей (сравнение по критерию Стьюдента двух групп ЭЭГ файлов (N1-N2). Достоверность различий при $p < 0,05$ при $t > 1,9$. По оси ординат – величина t Стьюдента со знаком (N1-N2), где N1 – выборка из ЭЭГ записей группы «МФТП 12х4», а N2 – группы «Контроль». По оси абсцисс: диапазоны волн с шагом 1 Гц:

■ - дельта, ■ - тета1, ■ - тета2, ■ - бета1 и ■ - бета2.

Наиболее выраженными на фоне введения МФТП в дозе 12 мг/кг были изменения в спектре мощности в диапазоне дельта-волн (1-3,5 Гц) (Рис. 25). Так доля данной активности составляла 46% в коре, 34% – в черной субстанции и 41% – в хвостатом ядре, превышая значения, отмечаемые в группе «Контроль» на 17%, 9% и 11%, соответственно (Табл. 7). МФТП в дозе 12 мг/кг х 4 вызывало значимое снижение спектра мощности в диапазоне тета1-волн в СК и ЧС. А также уменьшение бета2-активности в СК. Уменьшения представленности волн остальных диапазонов, отмечаемые в группе «МФТП 12х4» по сравнению с контрольной группой, не достигали уровня значимости (Табл. 7).

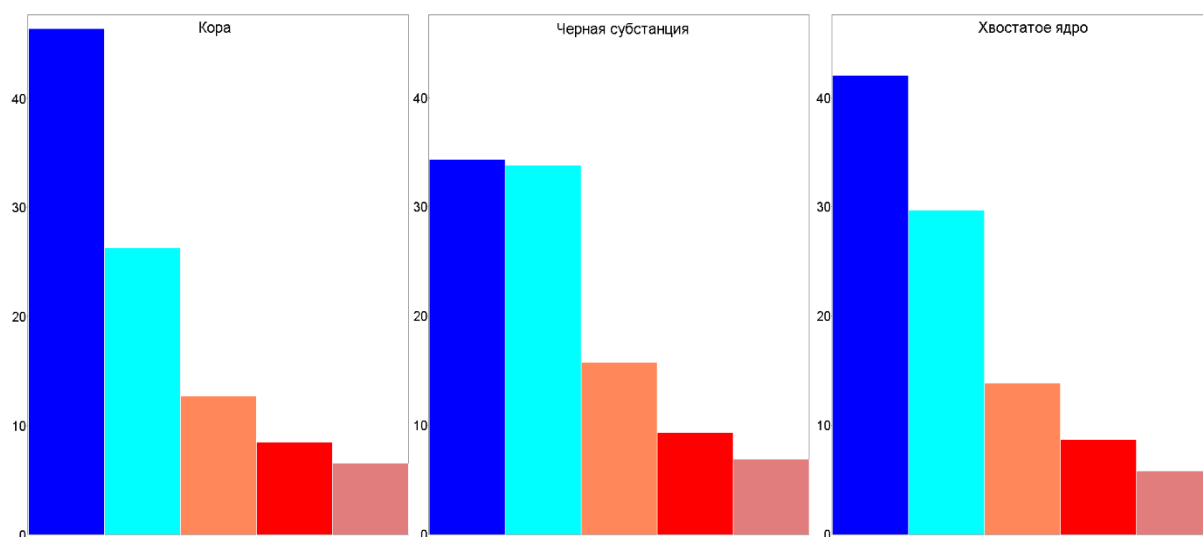


Рисунок 26. Автоспектры процентной мощности диапазон волн от всего диапазона волн (%) в электрограммах мышей группы «МФТП 12х4».

По оси ординат – %; по оси абсцисс – диапазон волн биоэлектрической активности мозга мышей: где ■ (1-3,5 Гц) дельта, ■ (4-7 Гц) тета1, ■ (8-12 Гц) тета2, ■ (13-20 Гц) бета1, ■ (21-30 Гц) бета2.

Таблица 7. Влияние гимантана на изменение автоспектров процентной мощности волн биоэлектрической активности мозга мышей C57Bl/6 с ПС вызванным введением МФТП в разных дозах, % (Mean+SEM)

Группа	Структуры	Дельта (1- 4 Гц)	Тета1 (4- 8 Гц)	Тета2 (8-13 Гц)	Бета1 (13-20 Гц)	Бета2 (20-30 Гц)
Контроль	Кора	28,9±4,6	33,4±2,3	15,6±2,7	11,4±1,9	10,7±1,9
	Черная субстанция	25,3±3,7	42,2±1,6	16,1±1,9	9,3±0,7	7,0±0,7
	Хвостатое ядро	30,3±5,7	35,5±1,4	16,4±3,7	10,0±1,9	7,8±1,7
МФТП 12х4	Кора	45,9±3,9 *	26,4±1,5 *	12,7±1,6	8,5±0,9	6,5±0,5 *
	Черная субстанция	34,1±4,6	33,9±2,4*	15,8±2,5	9,3±1,2	6,87±0,6

	Хвостатое ядро	41,4±4,5	30,0±2,1	14,0±2,7	8,7±1,6	5,9±0,6
МФТП 20х4	Кора	36,7±2,9	32,8±1,6	13,7±1,1	9,0±1,5	7,8±1,5
	Черная субстанция	37,3±4,4 т	31,2±1,5 **	13,5±1,3	9,7±1,4	8,19±1,0
	Хвостатое ядро	37,7±3,8	32,3±1,8	13,5±1,5	9,1±1,7	7,3±1,0
Гимантан 20х4 +	Кора	23,8±3,6 ##	35,2±3,5 т#	20,1±1,2 ##	12,4±0,5 ##	8,5±0,9
	Черная субстанция	26,8±4,1	38,3±2,1	18,4±1,6	10,3±1,1	6,2±0,4
	Хвостатое ядро	29,7±6,5	34,5±2,9	19,1±2,5	11,0±1,4	5,8±0,4
Гимантан 20х4 +	Кора	18,2±4,5 #	34,4±8,5	18,2±2,6 т#	22,3±11,6 т#	6,8±1,2
	Черная субстанция	19,9±2,4 т#	35,8±9,0	18,6±2,3 т#	18,6±9,2	7,1±0,4
	Хвостатое ядро	23,0±6,9 т#	31,1±4,5	16,8±3,2	21,4±9,3	7,8±1,0

*, ** - $p < 0,05$, $p < 0,01$, соответственно, достоверность отличий по сравнению с контрольными значениями в той же структуре;

т-р $< 0,07$ – достоверность отличий по сравнению с контрольными значениями в той же структуре; #, ## - $p < 0,05$, $p < 0,01$, соответственно, – достоверность отличий по сравнению с значениями в группе получавшей МФТП в той же дозе и в той же структуре; т#-р $< 0,07$ – достоверность отличий по сравнению с значениями в группе получавшей МФТП в той же дозе и в той же структуре .

Подробный анализ изменений биоэлектрической активности мозга мышей группы «МФТП 12х4» (с шагом 1 Гц) представлен на рис. 27. Так в

спектре мощности биоэлектрической активности черной субстанции, хвостатого ядра и сенсомоторной коры мышей с ПС по сравнению с контрольными значениями. Так, наиболее выраженные изменения, по сравнению с контрольными значениями были выявлены в СК, где наблюдалось усиление спектра мощности в диапазоне дельта-частот ($p < 0,05$), снижение активности в диапазоне тета1- ($p < 0,05$) и тета2-частот, а также бета1- и бета2-частот ($p < 0,05$). Статистически значимое снижение спектральной мощности биоэлектрической активности мозга мышей группы «МФТП 12х4» в ЧС отмечали только в диапазоне тета1-частот, а в ХЯ – в диапазонах тета1- и бета2- частот (Рис. 27).

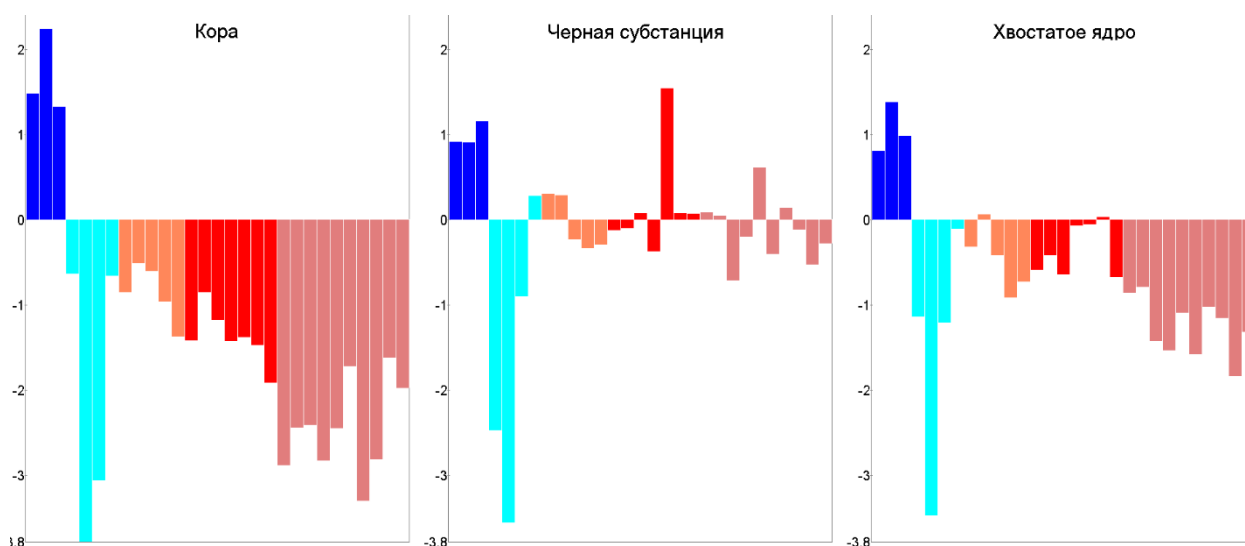


Рис. 27. Изменение автоспектров процентной мощности одного диапазона частоты в % от всего диапазона (сравнение по критерию Стьюдента двух групп ЭЭГ файлов (N1-N2). Достоверность различий при $p < 0,05$ при $t > 1,9$.

По оси ординат – величина t Стьюдента со знаком (N1-N2), полученная при сравнение 2-х независимых групп ЭЭГ-файлов мышей C57Bl/6, где N1 – выборка ЭЭГ-файлов группы «МФТП-12х4», а N2 – группы «Контроль»; по оси абсцисс – диапазон волн биоэлектрической активности мозга с шагом 1 Гц: где ■ - дельта, ■ - тета1, ■ - тета2, ■ - бета1 и ■ - бета2.

На фоне введения МФТП в дозе 20 мг/кг х 4 отмечался более выраженный рост амплитуды всех групп волн во всех отведениях (Рис. 28; Рис. 29), причем амплитуда волн в СК превышала таковую в других структурах. Визуальный анализ электрограмм мозга мышей группы «МФТП 20х4» выявил как усиление активности в диапазоне дельта-, так и бета-волн (Рис. 29). Анализ изменений спектров мощности группы волн также выявил значимое усиление дельта-активности во всех структурах и уменьшение мощности в диапазоне тета1-волн (Рис. 30, Табл. 7) мощности в по сравнению со значениями контрольной группы.

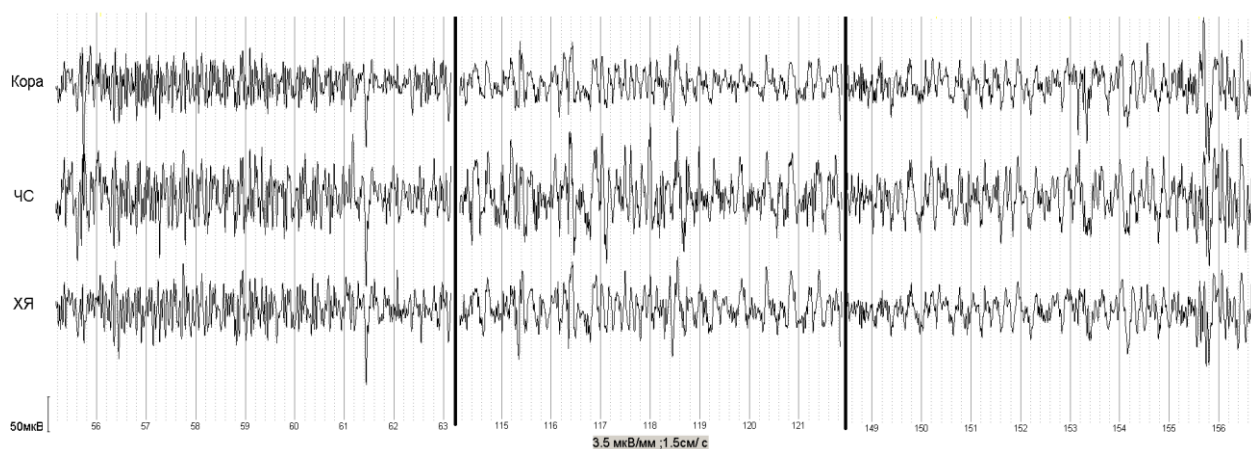


Рис. 28. Примеры электрограмм мышей C57Bl/6 группы «МФТП 20х4».

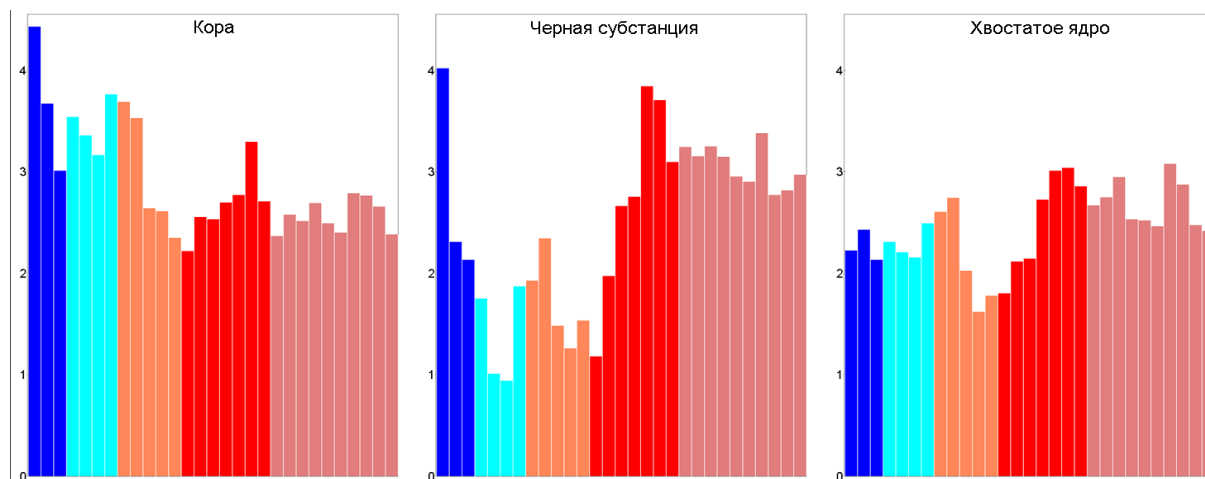


Рис. 29. Изменение амплитудных автоспектров отдельных волн от всего диапазона волн (%) в электрограммах мышей (сравнение по критерию Стьюдента двух групп ЭЭГ файлов (N1-N2). Достоверность различий при $p < 0,05$ при $t > 1,9$. По оси ординат – величина t Стьюдента со знаком (N1-N2),

где N1 – выборка из ЭЭГ записей группы «МФТП 20х4», а N2 – группы «Контроль»; по оси абсцисс – диапазоны волн с шагом 1 Гц; где,

■ - дельта, ■ - тета1, ■ - тета2, ■ - бета1 и ■ - бета2.

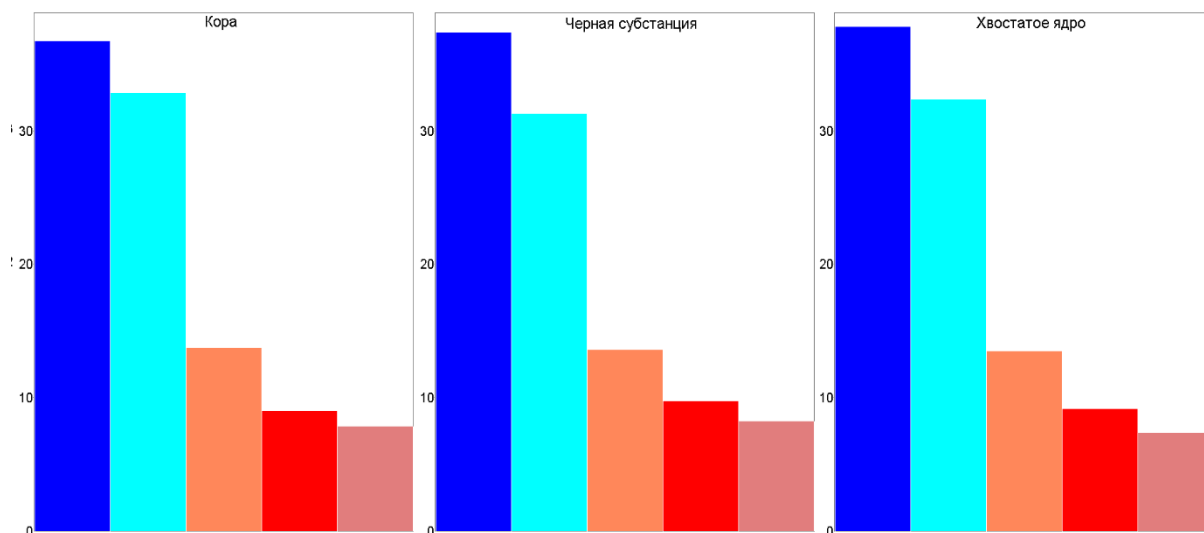


Рис. 30. Автоспектры процентной мощности диапазон волн от всего диапазона волн (%) в электрограммах мышей группы «МФТП 12х4».

По оси ординат – %; по оси абсцисс – диапазон волн биоэлектрической активности мозга мышей: где ■ - (1-3,5 Гц) дельта , ■ - (4-7 Гц) тета1, ■ - (8-12 Гц) тета2, ■ - (13-20 Гц) бета1, ■ - (21-30 Гц) бета2.

Детальный анализ изменений биоэлектрической активности мозга мышей группы «МФТП 20х4» (с шагом 1 Гц) по сравнению с соответствующими контрольными значениями показал, что наряду с усилением дельта активности во всех структурах, отмечалось снижение спектра мощности в диапазоне тета1-частот, достигавшее уровня значимости в ЧС и ХЯ (Рис. 31). При этом в ЧС наблюдалось усиление спектра мощности в диапазоне бета1- и бета2-частот, а в ХЯ - усиление спектра мощности в диапазоне бета1-частот в диапазоне 18-19 Гц.

Предварительное введение гимантана в дозе 20 мг/кг за 30 минут перед каждым введением МФТП в дозе 12 мг/кг x 4 выявило уменьшение амплитуды волн во всех структурах по сравнению с группой «МФТП 12х4», что особенно сказалось в диапазоне дельта-волн и было более выражено в СК (Рис. 32).

Незначительное превышение амплитуды наблюдалось в ЧС и ХЯ в диапазоне 10-13 Гц.

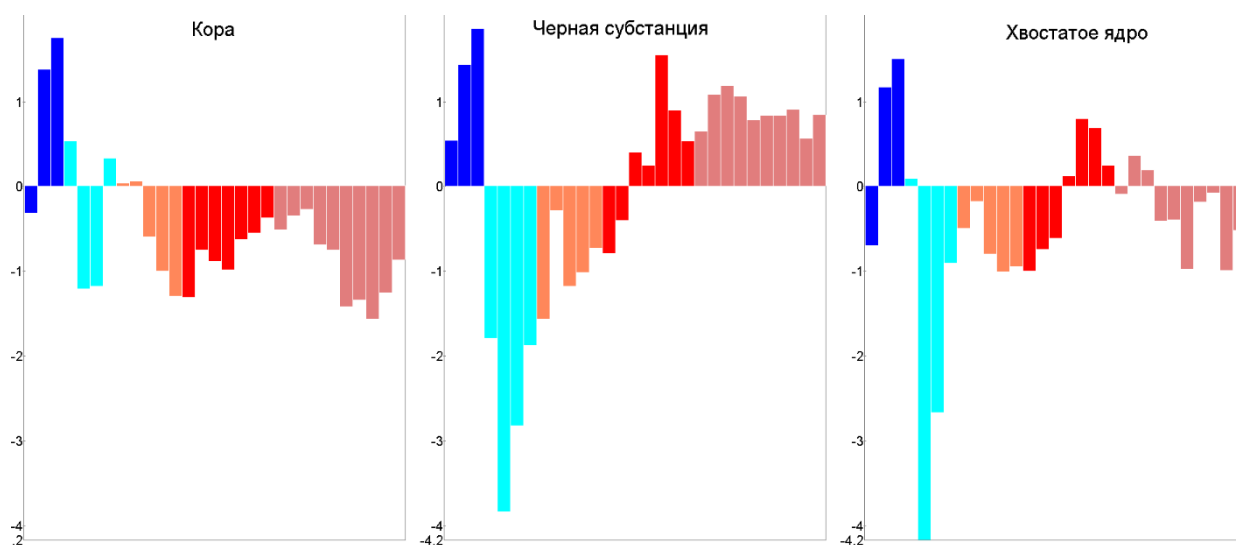


Рисунок 31. Изменение автоспектров процентной мощности одного диапазона частоты в % от всего диапазона (сравнение по критерию Стьюдента двух групп ЭЭГ файлов (N1-N2). Достоверность различий при $p < 0.05$ при $t > 1,9$.

По оси ординат – величина t Стьюдента со знаком (N1-N2), полученная при сравнение 2-х независимых групп ЭЭГ-файлов мышей C57Bl/6, где N1 – выборка ЭЭГ-файлов группы «МФТП- 20х4», а N2 – группы «Контроль»; по оси абсцисс – диапазон волн биоэлектрической активности мозга с шагом 1 Гц: где ■ - дельта, ■ - тета1, ■ - тета2, ■ - бета1 и ■ - бета2.

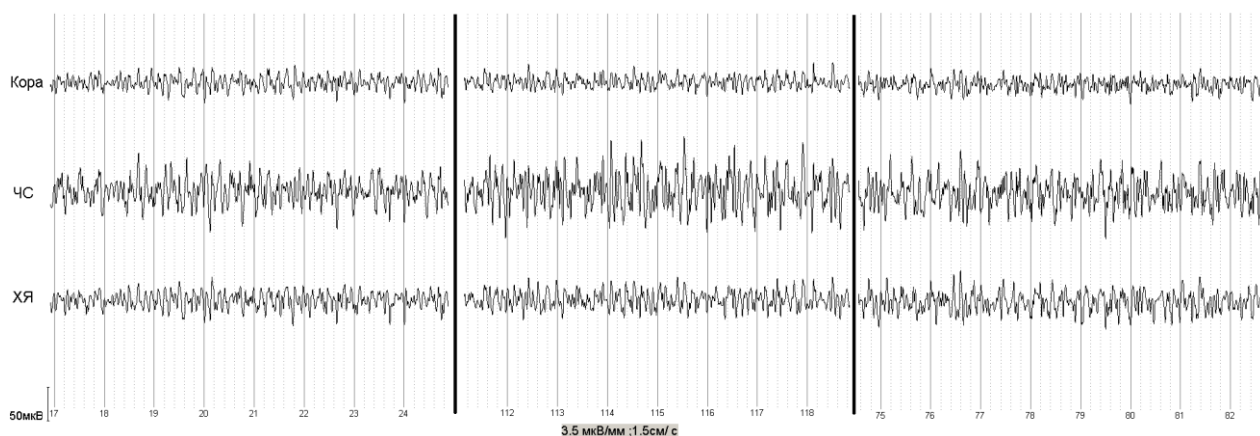


Рисунок 32. Примеры электрограмм мышей C57Bl/6 группы «Гимантан 20 + МФТП 12х4».

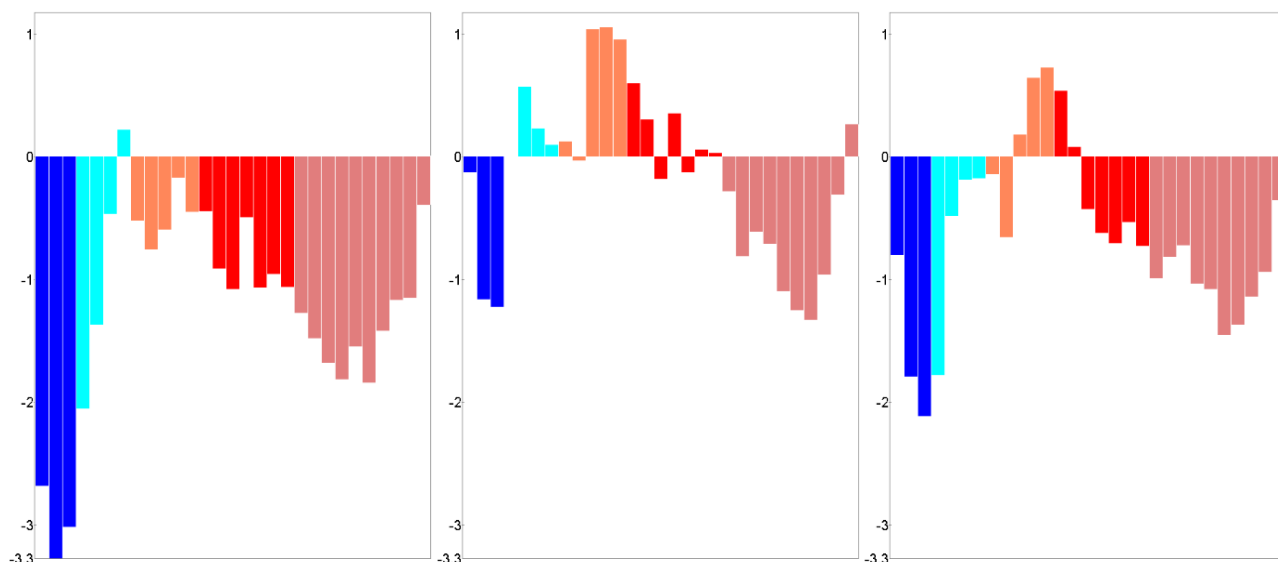


Рисунок 33. Изменение амплитудных автоспектров отдельных волн от всего диапазона волн (%) в электрограммах мышей (сравнение по критерию Стьюдента двух групп ЭЭГ файлов (N1-N2). Достоверность различий при $p < 0,05$ при $t > 1,8$. По оси ординат – величина t Стьюдента со знаком (N1-N2), где N1 – выборка из ЭЭГ записей группы «Гимантан 20x4 + МФТП 12x4», а N2 – группы «МФТП 12x4», по оси абсцисс - диапазоны волн с шагом 1 Гц: где, ■ - дельта, ■ - тета1, ■ - тета2, ■ - бета1 и ■ - бета2.

Гимантан в дозе 20 мг/кг х 4 у мышей C57BL/6 с ПС, индуцированным введением МФТП в дозе 12 мг/кг х 4, вызвал снижение спектра мощности в диапазоне дельта-волн (1-3,5 Гц), наиболее выраженное в СК (Рис. 33 - 34, Табл. 7) по сравнению с группой «МФТП 12x4». Кроме того, на фоне введения гимантана мышам с ПС в спектре мощности биоэлектрической активности мозга преобладали тета1-волны во всех структурах (Рис. 33).

При детальном анализе изменений биоэлектрической активности мозга мышей в ответ на введение Гимантана и МФТП в дозе 12 мг/кг х 4 выявлено значимое усиление спектра мощности всех групп волн в СК и повышение активности в диапазонах тета- и бета1-частот в ЧС и ХЯ по сравнению с группой «МФТП 12x4» (Рис. 34). Необходимо отметить, наличие незначимого снижения спектра мощности в диапазоне бета2- частот в ЧС и ХЯ в группе «Гимантан 20x4+ МФТП 12x4», регистрируемое только при проведении

пошагового спектрального анализа, по сравнению с данными группы «МФТП 12х4».

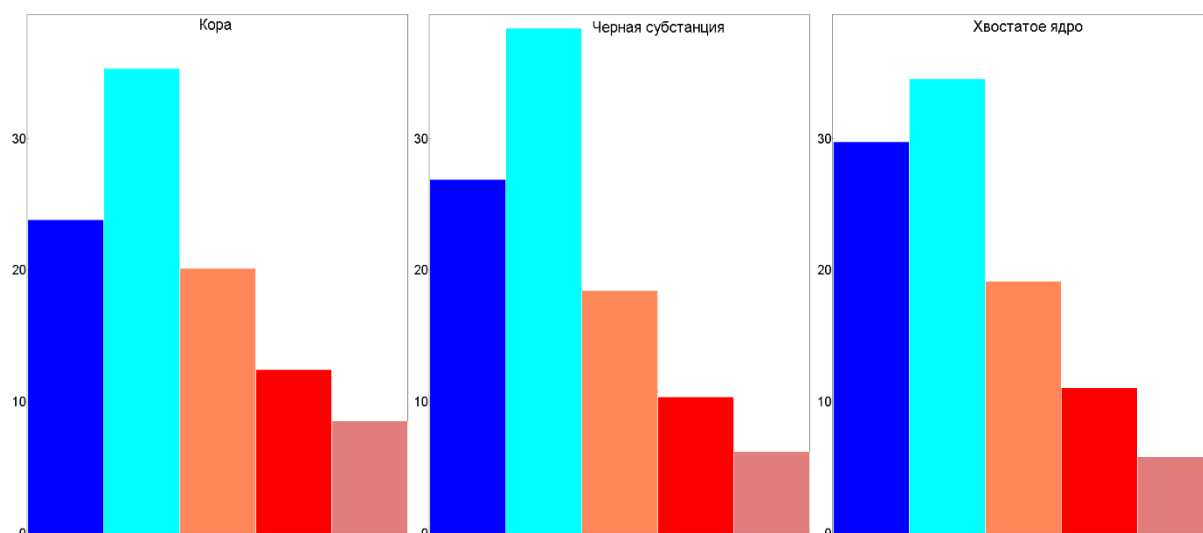


Рисунок 34. Автоспектры процентной мощности диапазон волн от всего диапазона волн (%) в электрограммах мышей группы «Гимантан 20х4 + МФТП 12х4».

По оси ординат – %; по оси абсцисс – диапазон волн биоэлектрической активности мозга мышей: где ■ (1-3,5 Гц) дельта, ■ (4-7 Гц) тета1, ■ (8-12 Гц) тета2, ■ (13-20 Гц) бета1, ■ (21-30 Гц) бета2.

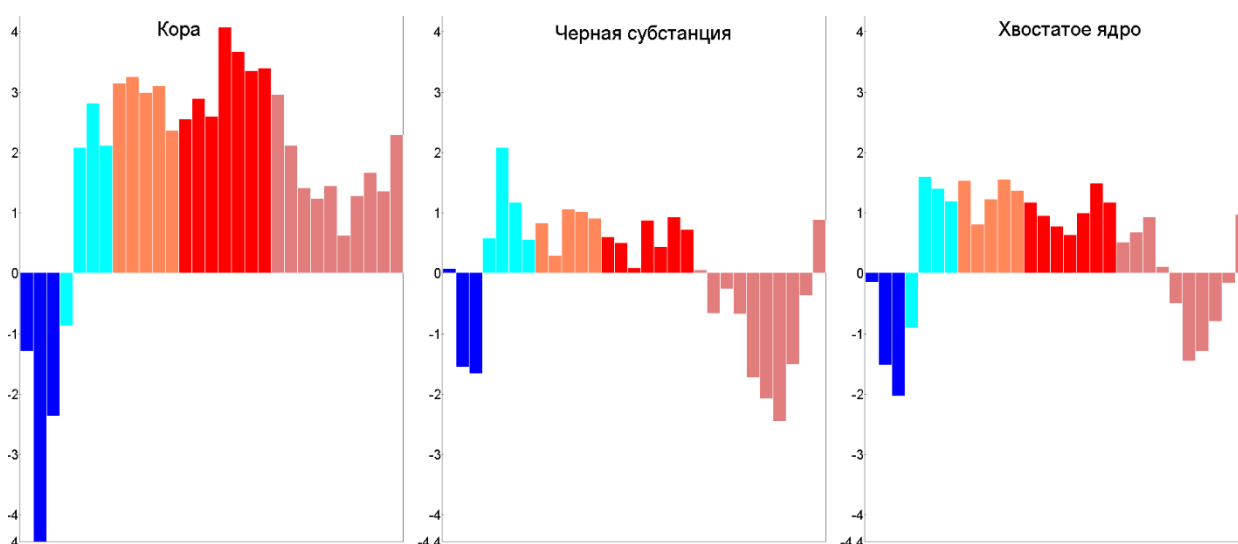


Рисунок 35. Изменение автоспектров процентной мощности одного диапазона частоты в % от всего диапазона (сравнение по критерию Стьюдента двух групп ЭЭГ файлов (N1-N2)).

Достоверность различий при $p < 0,05$ при $t > 1,8$. По оси ординат – величина t Стьюдента со знаком $(N1-N2)$, полученная при сравнение 2-х независимых групп ЭЭГ-файлов мышей C57Bl/6, где $N1$ - выборка ЭЭГ-файлов группы «Гимантан 20х4+МФТП 12х4», а $N2$ – группы «МФТП-12х4»; по оси абсцисс – диапазон волн биоэлектрической активности мозга с шагом 1 Гц: где ■ - дельта, ■ - тета1, ■ - тета2, ■ - бета1 и ■ - бета2.

Гимантан в дозе 20 мг/кг, вводимый за 30 минут до каждой инъекции МФТП в дозе 20 мг/кг х 4, снизил амплитуду дельта-волн во всех структурах, но не оказал влияние на амплитуду волн других диапазонов биоэлектрической активности о сравнению с группой «МФТП 20х4» (Рис. 35, Рис. 37).

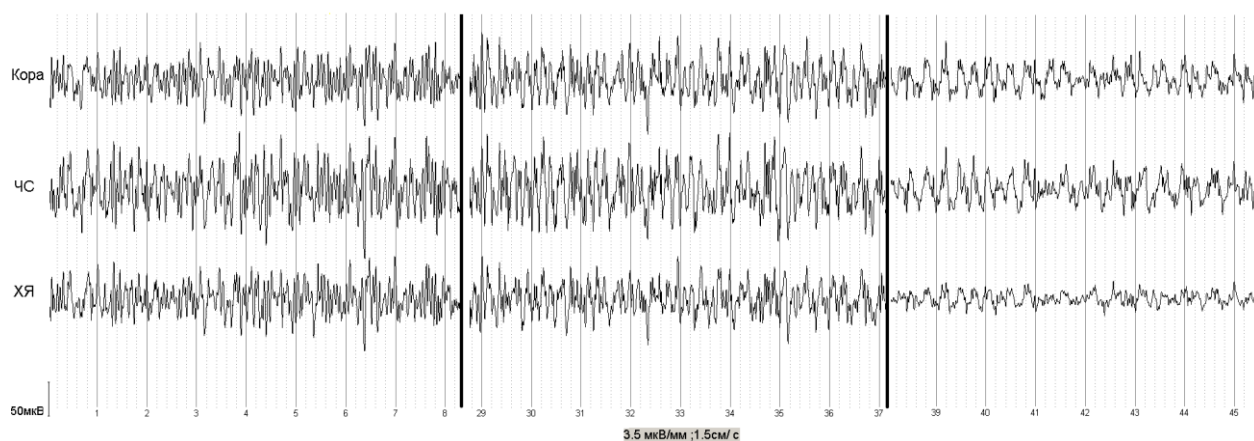


Рисунок 36. Примеры электрограмм мышей C57Bl/6 группы «Гимантан 20х4 + МФТП 20х4».

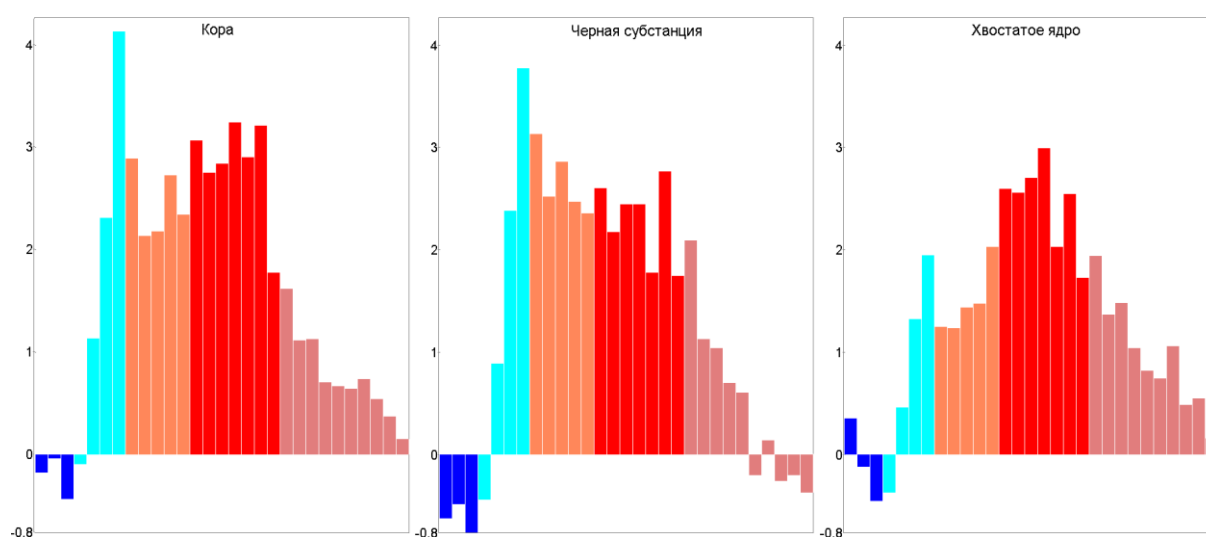


Рисунок 37. Изменение амплитудных автоспектров отдельных волн от всего

диапазона волн (%) в электрограммах мышей (сравнение по критерию Стьюдента двух групп ЭЭГ файлов (N1-N2). Достоверность различий при $p < 0,05$ при $t > 2,0$. По оси ординат – величина t Стьюдента со знаком (N1-N2), где N1 – выборка из ЭЭГ записей группы «Гимантан 20х4 + МФТП 20х4», а N2 – группы «МФТП 20х4», по оси абсцисс - диапазоны волн с шагом 1 Гц: где, ■ - дельта, ■ - тета1, ■ - тета2, ■ - бета1, ■ - бета2

В группе «Гимантан 20х4 + МФТП 20х4» 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 20х4» рис. 39.

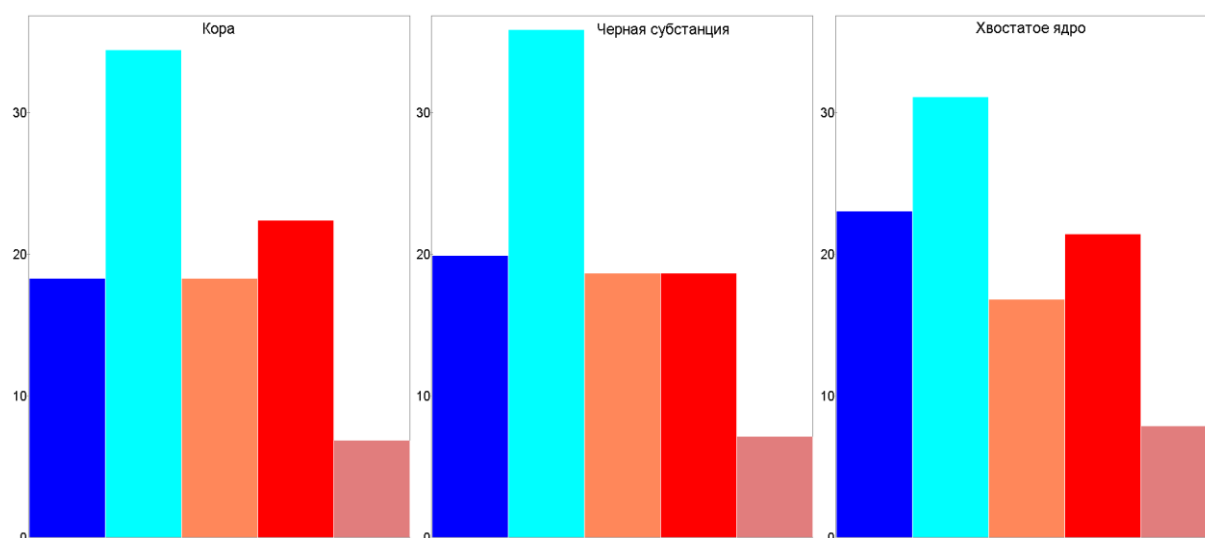


Рисунок 38. Автоспектры процентной мощности диапазон волн от всего диапазона волн (%) в электрограммах мышей группы «Гимантан 20х4 + МФТП 20х4».

По оси ординат – %; по оси абсцисс – диапазон волн биоэлектрической активности мозга мышей: где ■ - (1-3,5 Гц) дельта, ■ - (4-7 Гц) тета1, ■ - (8-12 Гц) тета2, ■ - (13-20 Гц) бета1, ■ - (21-30 Гц) бета2.

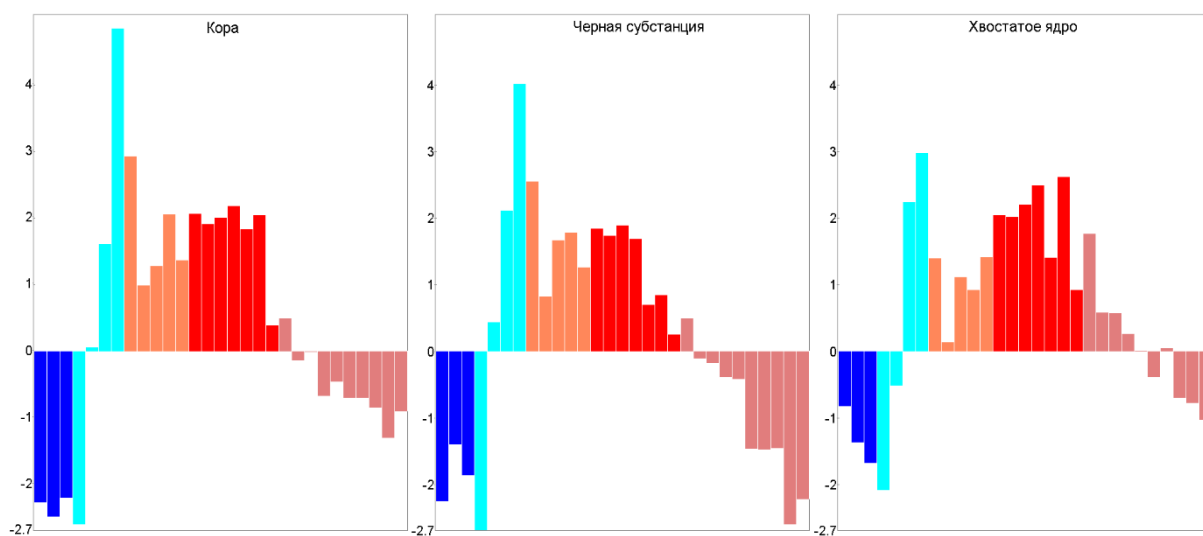


Рисунок 39. Изменение автоспектров процентной мощности одного диапазона частоты в % от всего диапазона (сравнение по критерию Стьюдента двух групп ЭЭГ файлов (N1-N2). Достоверность различий при $p < 0,05$ при $t > 1,8$.

По оси ординат – величина t Стьюдента со знаком (N1-N2), полученная при сравнение 2-х независимых групп ЭЭГ-файлов мышей C57Bl/6, где N1 – выборка ЭЭГ-файлов группы «Гимантан 20x4 + МФТП 20x4», а N2 – группы «МФТП 20x4»; по оси абсцисс – диапазон волн биоэлектрической активности мозга с шагом 1 Гц: где ■ - дельта, ■ - тета1, ■ - тета2, ■ - бета1, ■ - бета2.

Введение нейротоксина МФТП в обеих дозах вызывало усиление десинхронизации ЭЭГ, рост амплитуды волн, усиление спектра мощности в диапазоне дельта-частот при уменьшении биоэлектрической активности остального диапазона волн, особенно диапазона тета1-частот.

Подводя итог, напомним, что допамин является важным нейромедиатором, который поддерживает баланс в базальных ганглиях между прямым путем, который способствует движению, и косвенный путь, который подавляет движение. Дегенерация дофаминергических нейронов в ЧС увеличивает влияние косвенного пути, в результате чего двигательная дисфункция при БП. Прямые и косвенные пути состоят из базальных ганглиев и таламических ядер, которые взаимосвязаны через независимые

параллельные цепи с корковыми областями. Аномальная нейрональная биоэлектрическая активность в этих цепях характеризуется аномальным преувеличением бета-колебания, наблюдаемые после потери дофамина, что может способствовать двигательным симптомам БП. Уменьшение аномальных бета-колебаний проявляется улучшением двигательных функций во время фармакологических процедур, хирургических поражений и электрической стимуляции (Singh A., 2018). Еще одним характерным признаком БП на ЭЭГ является общее замедление ритмов (Soikkeli R., et al., 1991). В целом ряд патологических форм биоэлектрической активности при ПС был описан достаточно давно и касался в основном повышения активности в диапазоне низких частот, нарушения основного ритма - тета-ритма у животных, усиления бета-ритма, появления быстрой активности – до 100 колебаний в 1 с и выше (Жирмунская Е.А., Попелянский Я.Ю. , 1954). Эти данные подтверждаются и при моделировании ПС на мышах с помощью 6-ГОДА, у которых повышенную синхронную колебательную активность в β диапазоне частот и снижение скорости ритма во время движения (Chen H., et al., 2018). Повреждение дофаминергических нейронов среднего мозга 6-ГОДА ассоциируется со значительным увеличением мощности спектра и когерентности в бета-диапазоне биоэлектрической активности фронтальных отделов коры и субталамических ядер мозга крыс по сравнению с контрольными животными. Характер синхронизации между активностью в коре и субталамических ядрах на модели 6-ГОДА – вызванной БП близок к тем, что наблюдается у больных БП. Частота пика когерентной активности в бета-диапазоне увеличивалась во время спонтанных и навязанных движений (Hutchison W.D., et al., 2004).

Ранее было показано, что введение МФТП мышам C57BL/6 вызывает уменьшение тета1-активности и рост бета-активности в диапазоне 15 – 30 Гц, который наблюдается уже через 10 минут после введения нейротоксина и сохраняется на протяжении длительного времени (Капица И.Г. и др., 2013), (Капица И.Г.и др., 2014). Поскольку в нашем исследовании под действием

острого введения гимантана в дозе 20 мг/кг х 4 в течение суток перед каждой инъекцией МФТП в обеих дозах мощность дельта-осцилляций, вызванных введением нейротоксина, уменьшилась, а тета-волн, наоборот, повысилась, действие препарата можно трактовать как нивелирование негативного действия нейротоксина на передачу сигналов и защитный эффект в отношении нейронов ЧС. При введении МФТП в дозе 20 х 4 мг/кг отмечено усиление биоэлектрической активности в диапазоне бета2-волн в основном в ЧС и незначительно в ХЯ. При этом гимантан способствовал снижению активности в бета2-диапазоне, как при его введении с МФТП 12х4, так и с МФТП 20х4 мг/кг, что ведет к возвращению биоэлектрической активности мозга к фоновым значениям.

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

В основу данного исследования легла гипотеза о патогенетической роли эксайтотоксичности глутамата, основного возбуждающего медиатора ЦНС, в развитии нейродегенеративных заболеваний, включая БП (Lau A., 2010). Механизм эксайтотоксичности подразумевает усиление патогенного воздействия глутамата на нейрональную клетку в обогащенной кальцием среде (Choi D.W. et al., 1985). Так же известно, что для процесса нейродегенерации принципиален приток ионов кальция в клетку именно через NMDA-каналы, поскольку в ряде исследований приток кальция через другие каналы сопровождался количественно меньшей гибелью нейронов (Sattler R. et al., 1998). Речь идет именно о глутаматных рецепторах NMDA-типа. Постсинаптический потенциал, вызванный активацией рецептора NMDA имеет более медленное начало и большую продолжительность, чем постсинаптические потенциалы, вызванные активацией других ионотропных рецепторов глутамата. К тому же NMDA-опосредованный постсинаптический

потенциал является зависимым от напряжения. В состоянии потенциала покоя мембраны NMDA рецептор трудно активировать, потому что ионный канал рецептора блокируется нормальными концентрациями внеклеточного магния. Когда мембрана становится деполяризованной, магниевая блокада снимается и рецептор может быть активирован. Ионный канал, связанный с рецептором NMDA, становится проходимым для кальция, натрия и калия. Приток кальция через NMDA-активированный канал и последующее повышение цитозольного кальция считается ключевым шагом в иницировании каскада патофизиологические события, приводящие к смерти нейронов, вызванной эксцитотоксинами (Choi D.W., 1988). Препараты, способные обратимо ингибировать NMDA рецепторы, рассматривают в качестве перспективных фармакологических агентов, предотвращающих гибель нейронов и замедляющих развитие нейродегенерации (Zhang Z. et al., 2019).

Для производных адамантана электрофизиологическими методами ранее изучалась ингибирующая способность в отношении NMDA-каналов (Елшанская М.В. и др., 2001). В предыдущих исследованиях на модели МФТП-паркинсонизма мышей было показано, что производный адамантана гимантан уменьшал выраженность ПС (гипокинезию и мышечную ригидность) (Воронина Н.А. и др., 2019), снижал уровень продуктов перекисного окисления липидов в мозге мышей с МФТП-индуцированным паркинсоническим синдромом (Иванова Е.А. и др., 2013). Перед данным этапом исследования были поставлены задачи по исследованию действия гимантана, МК-801 и Mg^{2+} на изменения концентрации Ca^{2+} ($[Ca^{2+}]_i$), Na^+ ($[Na^+]_i$) внутри клетки и митохондриального потенциала $\Delta\Psi_m$ в ответ на введение агониста в культуру нейронов. В исследованиях Елшанской М.В. от 2001 года выявлена ингибирующая способность высоких концентраций гимантана (Hmn, 100 мкМ) на ионные токи сквозь NMDA-каналы достигающих более 90% в культуре свежеизолированных нейронах гипокампа, и определено внутриканальное расположение гимантана как и Mg^{2+} (Елшанская М.В. и др., 2001). В связи с чем предстояло выяснить окажет ли

гимантан в концентрации 100 мкМ аналогичный блокирующий эффект в отношении роста $[Ca^{2+}]_i$ в первичной культуре нейронов коры головного мозга крысы и сопоставима ли эффективность блокады для гимантана и ионов магния в данных условиях. Приблизительно 75% клеток ответили стремительным подъемом концентрации кальция на введения агониста NMDA (10 μ M, 2 мин) с индивидуальной для каждой клетки амплитудой подъема (регистрации низкоаффинным кальциевым индикатором Fura-FF) (рис. 40а).

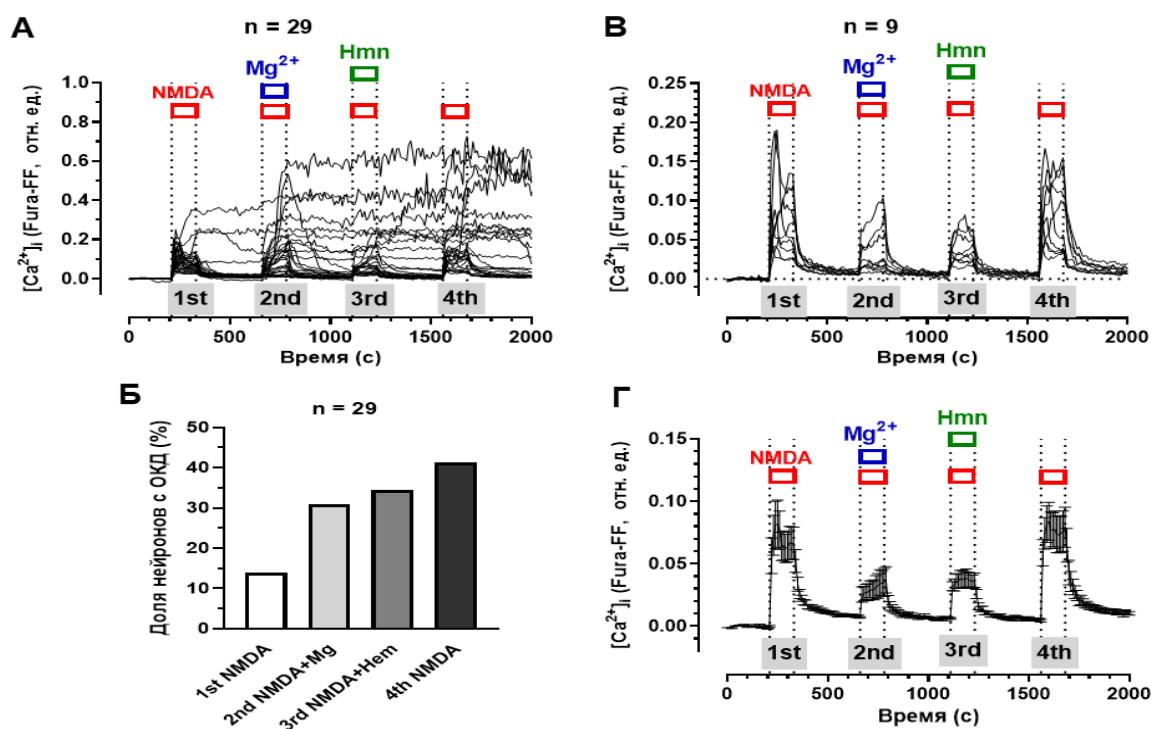


Рис. 40. Динамика внутриклеточной концентрации свободного кальция ($[Ca^{2+}]_i$), вызванные агонистом NMDA отдельно и в комбинации с ингибиторами - Mg^{2+} или гимантаном. А–Г – изменения $[Ca^{2+}]_i$ представлены как отношения сигналов флуоресцентного низкоаффинного Ca^{2+} -индикатора Fura-FF, измеренных при возбуждении на 340 и 380 нм (F340/F380) и регистрации при 525 нм. Графики нормированы по оси ординат для каждого нейрона согласно уравнению: $(R-R_{min})/(R_{max}-R_{min})$, где R – текущее значение F340/F380, R_{min} и R_{max} – соответственно минимальное наблюдаемое в начале эксперимента и максимальное в присутствии Ca^{2+} ионофора иономицина (2 мкМ +5 мМ внеклеточного Ca^{2+}) в конце эксперимента. Концентрации агентов во время первой (1st) и четвертой (4th)

добавок: 10 μM NMDA, 10 μM Gly, 0 Mg^{2+} , 2 mM Ca^{2+} ; во время второй (2nd) и третьей (3rd) добавок концентрации Mg^{2+} и гимантан составляли соответственно 10 и 0.1 mM ; концентрации остальных компонентов сохраняли такими же, как во время первой и четвертой добавок.

(Воронина Н. А. и др. 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.).

Отсутствие реакции на введения агонистов у части клеток можно объяснить их принадлежностью к глии или к нейронам, не содержащим в плазмалемме NMDA - рецепторов. Такие клетки не включались при анализе данных на рис. г. и в. После обработки культуры буферным раствором с целью удаления из среды агониста около 14% клеток не восстановили исходную концентрации внутриклеточного кальция и развили состояние отсроченной кальциевой дизрегуляции (ОКД) (рис. 40 А, Б) (Ходоров Б.И., 2002). Доля клеток с ОКД при последующих добавках не смотря на присутствие гимантана и Mg^{2+} увеличивалась, что можно объяснить несвоевременным восстановлением концентрации натрия внутри клеток и следовательно потенциала мембраны между добавками (Шарипов Р.Р. и др., 2018). Данный накопительный эффект отмечался ранее в других работах при многократных введениях глутамата к культуре нейронов гиппокампа (Vergun O, 1999). Введение в среду большой концентрации Mg^{2+} (до 10 mM) в качестве ингибитора приводило к сглаживанию роста $[\text{Ca}^{2+}]_i$ после повторной добавки NMDA, однако в разной степени в разных клетках (рис. 40 А). Одновременно отмечен рост клеток с ОКД с 14% до 31% (рис. 40 Б), где сохранялась высокая внутриклеточная концентрации кальция во время всего наблюдения. Гимантан вводили одновременно с агонистом, так как по результатам предыдущих исследований гимантан способен входит только в уже открытый канал (Елшанская М.В. и др., 2001). Гимантан продемонстрировал свою способность к ингибированию роста $[\text{Ca}^{2+}]_i$ после введения агониста, однако, как и в случае с Mg^{2+} только в части клеток (рис. 40 А, Б), содержание клеток с высокой

$[Ca^{2+}]_i$ возрасла до 35% и после удаления агониста и гимантана (рис. 40 Б). Доля нейронов, в которых осталась на высоком уровне, несмотря на удаление NMDA и гимантан, увеличилась до ~35%. Для проверки того, что влияние 10 mM Mg^{2+} и 100 мкМ гимантана на изменения $[Ca^{2+}]_i$ связано с их ингибирующим действием, была сделана четвертая добавка NMDA в буфере того же состава, что и первая добавка (рис. 40). Доля нейронов, в которых возникла ОКД, возросла до ~41% (рис. 40 Б). Учитывая сложный характер $[Ca^{2+}]_i$ ответов клеток на действие как одного NMDA, так и в присутствии Mg^{2+} или гимантана, мы рассмотрели динамику ответов на стимулы только в тех нейронах, в которых первая (1st) и последняя (4th) добавки NMDA вызывали примерно одинаковые по амплитуде и полностью обратимые изменения $[Ca^{2+}]_i$ (рис. 40 В, Г). Профиль кривых $[Ca^{2+}]_i$ не был одинаковым во время каждой из четырех добавок даже в тех клетках, в которых были одинаковы амплитуды подъемов $[Ca^{2+}]_i$. Поэтому количественным показателем была выбрана суммарная $[Ca^{2+}]_i$ за время действия соответствующих агентов, т.е. площадь под кривой изменений $[Ca^{2+}]_i$ (area under curve, AUC). График соотношения площади под кривой $[Ca^{2+}]_i$ во время первой (1st) и последней (4th) добавки NMDA был близок к линейной функции с наклоном 1.13 ± 0.17 (Mean $\pm$ SEM, n = 9) (рис. 41 В).

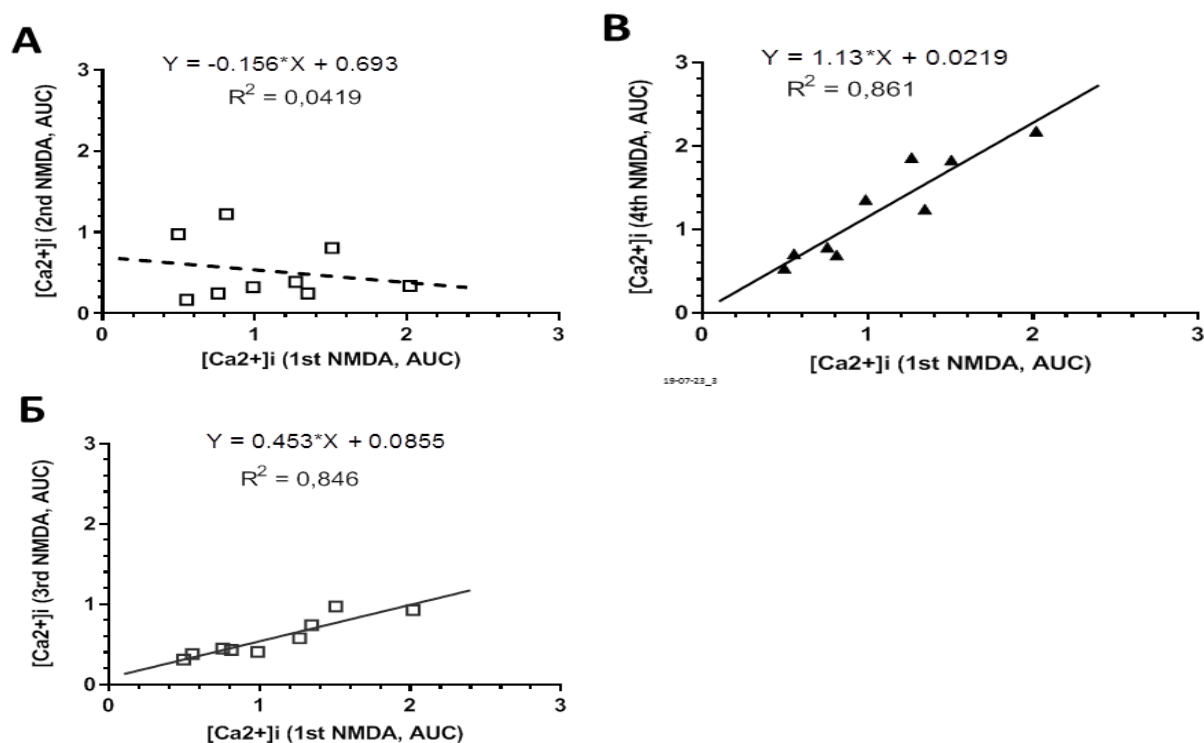


Рис. 41. Соотношение площадей под графиками изменений $[Ca^{2+}]_i$, вызванных одним NMDA и NMDA в присутствии Mg^{2+} или гимантан (см. рис. 40 А, В, Г). Площади под кривыми изменений $[Ca^{2+}]_i$ (AUC, отн. ед.) определяли в течение первых 150 с после добавки агентов. По осям абсцисс представлены значения параметра AUC после самой первой добавки NMDA (соответствует 1st на рис. 40 А, В, Г). По осям ординат представлены значения AUC после добавки NMDA в присутствии 10 mM Mg^{2+} (А) (2nd на рис. 40) и NMDA в присутствии 0.1 mM Hmn (Б) (3rd, на рис. 40). Последняя четвертая добавка NMDA (В) (4th, на рис. 40) сделана для проверки воспроизводимости изменений $[Ca^{2+}]_i$.

(Воронина Н. А. и др. 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.).

Чем больше была амплитуда подъема $[Ca^{2+}]_i$ (и соответственно AUC) во время первой добавки NMDA, тем больше она была и при последнем четвертом воздействии агониста. Такое же соотношение наблюдалось и при действии NMDA в присутствии гимантана, но наклон был в 2.5 раза меньше (0.453 ± 0.073 , $n = 9$), что отражает ингибирующее действие антагониста (рис.

41 Б). Неожиданным оказалось отсутствие корреляции между интегральным ответом $[Ca^{2+}]_i$ на первую добавку NMDA и на вторую при его действии в присутствии 10 mM Mg^{2+} (рис. 41 А). Не выявлено также корреляции между действием NMDA в присутствии 10 mM Mg^{2+} и 100 мкМ гимантана (график не показан). При этом средние амплитуды изменений $[Ca^{2+}]_i$ (рис. 41 Г) и средние величины AUC (рис. 41 А, Б) при действии NMDA в присутствии 10 mM Mg^{2+} и 100 мкМ гимантана практически одинаковые (в диапазоне 0.6–0.7).

Гимантан частично и обратимо ингибирует изменения $[Ca^{2+}]_i$ и $\Delta\Psi_m$, индуцированные высокой концентрацией NMDA. Нейропротекторные свойства ингибиторов глутаматных каналов NMDA-типа особенно важны при высоких, нейротоксических концентрациях глутамата. Поэтому мы сравнили изменения $[Ca^{2+}]_i$ и $\Delta\Psi_m$, применяя высокие концентрации NMDA в присутствии Hmn. Для сравнения был использован аллостерического ингибитор NMDA-рецепторов МК-801, место связывания которого, в отличие от гиманатана, находится вне канала (Елшанская М.В. и др., 2001). Действие 500 мкМ NMDA вызывало быстрый, но относительно небольшой подъем $[Ca^{2+}]_i$, который после короткого лаг-периода переходил во вторую фазу подъема $[Ca^{2+}]_i$, названную ОКД (рис. 42 А) (Ходоров Б.И., 2002). Синхронно с ОКД происходила вторая фаза падения $\Delta\Psi_m$, которая проявлялась в быстром и значительном увеличении флуоресценции Rh123 (рис. 42 Б, см. также рис. 42 Д, Е) (Duchen M.R. et al., 2003).

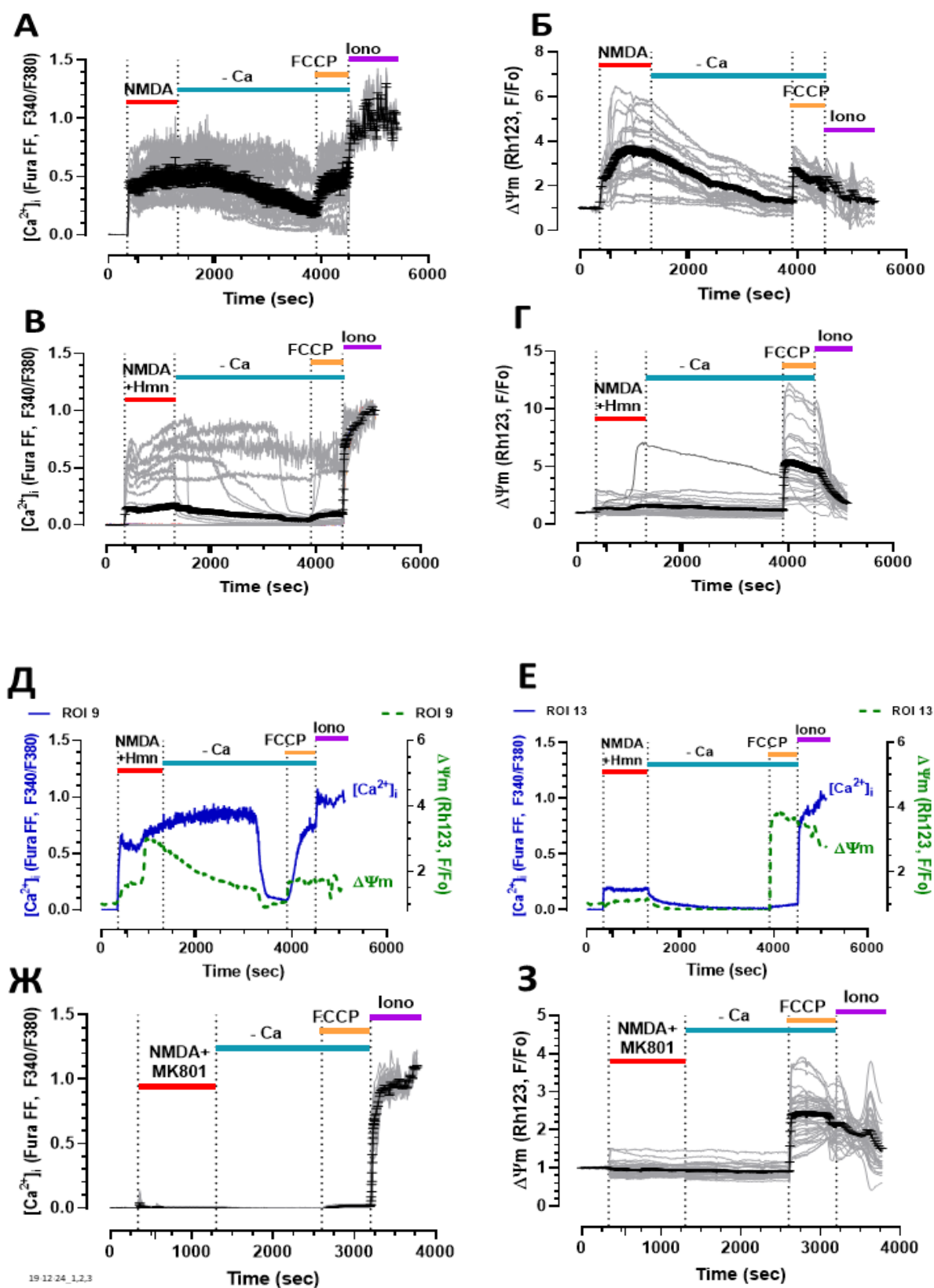


Рис 42. Изменения $[Ca^{2+}]_i$ и митохондриального потенциала ($\Delta\Psi_m$), вызванные добавлением одного NMDA и в присутствии обратимого (гимантана, Hmn) и необратимого (МК-801) ингибиторов NMDA-каналов. Серыми линиями показаны графики $[Ca^{2+}]_i$ и $\Delta\Psi_m$ индивидуальных клеток,

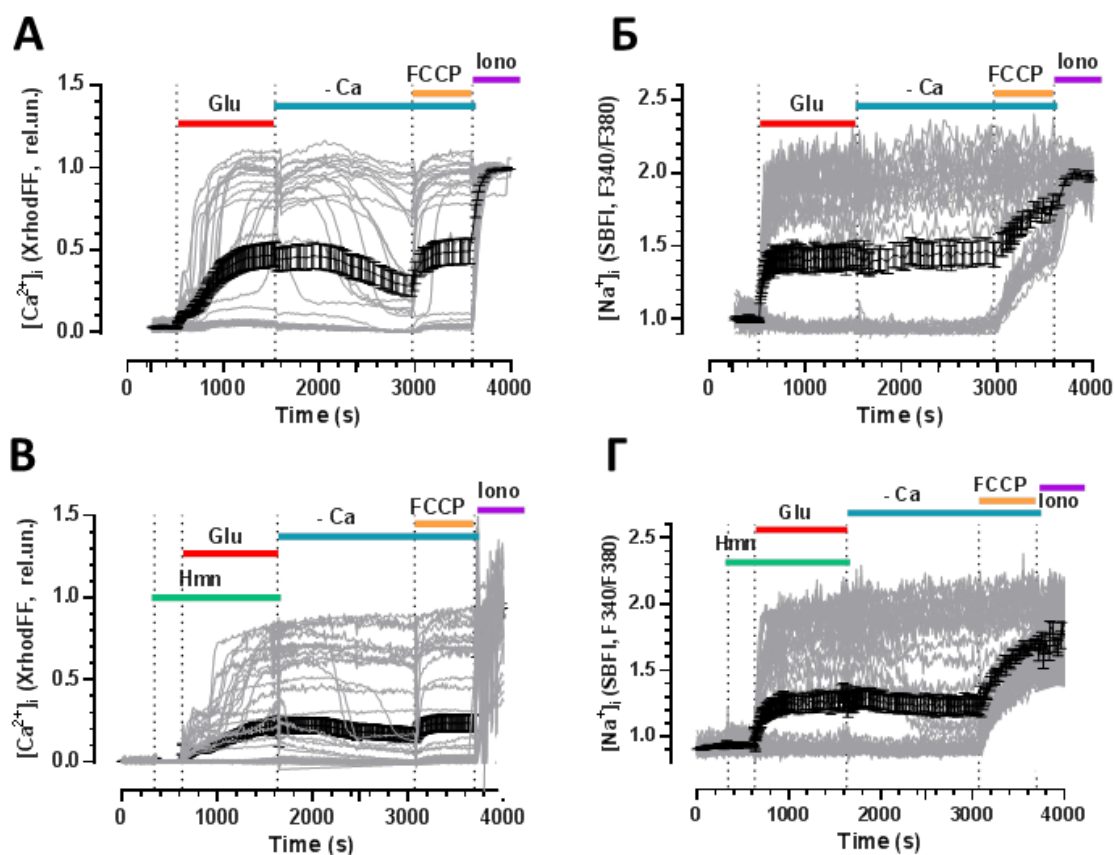
черными линиями – средние значения ($\pm$ ошибка среднего). а – изменения $[Ca^{2+}]_i$ в контрольном эксперименте при действии одного NMDA (500 мкМ), в – в присутствии Hmн (100 мкМ) и ж – в присутствии МК-801 (10 мкМ). Изменения $[Ca^{2+}]_i$ измерены, как сказано в подписи к рис. 41. Б, Г, З – изменения величины митохондриального потенциала $\Delta\Psi_m$ выполнены с помощью потенциал-чувствительного флуоресцентного зонда родамина-123 (Rh123). Сигналы Rh123 (F) нормированы относительно исходной величины в поющих нейронах (Fo). д, е – изменения $[Ca^{2+}]_i$ и $\Delta\Psi_m$ совмещены для двух представительных нейронов, один из которых имел ОКД (д), а другой устоял против развития ОКД (е). Клеточная культура кортикальных нейронов в возрасте 14 дней. Концентрации (мкМ): NMDA – 500, Gly – 10, Гимантан – 100, МК-801 – 10. NMDA добавляли в безмагниеовом буфере.

(Воронина Н. А. и д.р. 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.).

Отмывание NMDA приводило к медленному снижению $[Ca^{2+}]_i$, начало которого, как и наступление ОКД, было индивидуальным в каждой клетке. Снижение сигнала потенциал-чувствительного митохондриального зонда Rh123 в период отмывания NMDA (рис. 42 Б) обусловлено частично восстановлением потенциала (ростом $\Delta\Psi_m$), а частично вытеканием зонда из клеток сквозь деполяризованную плазматическую мембрану (Duchen M.R. et al., 2003). Для оценки количества Ca^{2+} , которое митохондрии накопили во время действия NMDA и смогли удержать после отмывания агониста бескальциевым буфером, в конце эксперимента добавляли протонофор FCCP (1 мкМ). Протонофор вызывал полную деполяризацию митохондрий, ликвидируя электрофоретическую силу, удерживавшую Ca^{2+} в матриксе митохондрий. Видно, что те клетки, которые в присутствии гимантана имели небольшой подъем $[Ca^{2+}]_i$, смогли накопить и удержать относительно небольшое количество Ca^{2+} по сравнению с теми нейронами, в которых, несмотря на присутствие ингибитора, развилась ОКД (рис. 42 А, В). Две

представительные клетки, в одной из которых произошла ОКД с последующим восстановлением низкой $[Ca^{2+}]_i$ после отмывания NMDA, а во второй ОКД не успела возникнуть за время действия агониста, показаны, соответственно на рис. 42 Д, Е. Нейрон, в котором развилась ОКД, смог удержать небольшое количество Rh123 в митохондриях (рис. 43 Д), тогда как нейрон, не имевший ОКД (рис. 4е), высвободил небольшое количество Ca^{2+} из митохондрий, но зато относительно много Rh123, поскольку митохондрии сохранили высокий $\Delta\Psi_m$ во время действия NMDA.

Гимантан частично ингибирует изменения $[Ca^{2+}]_i$ 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. 43 А, В, Ж).



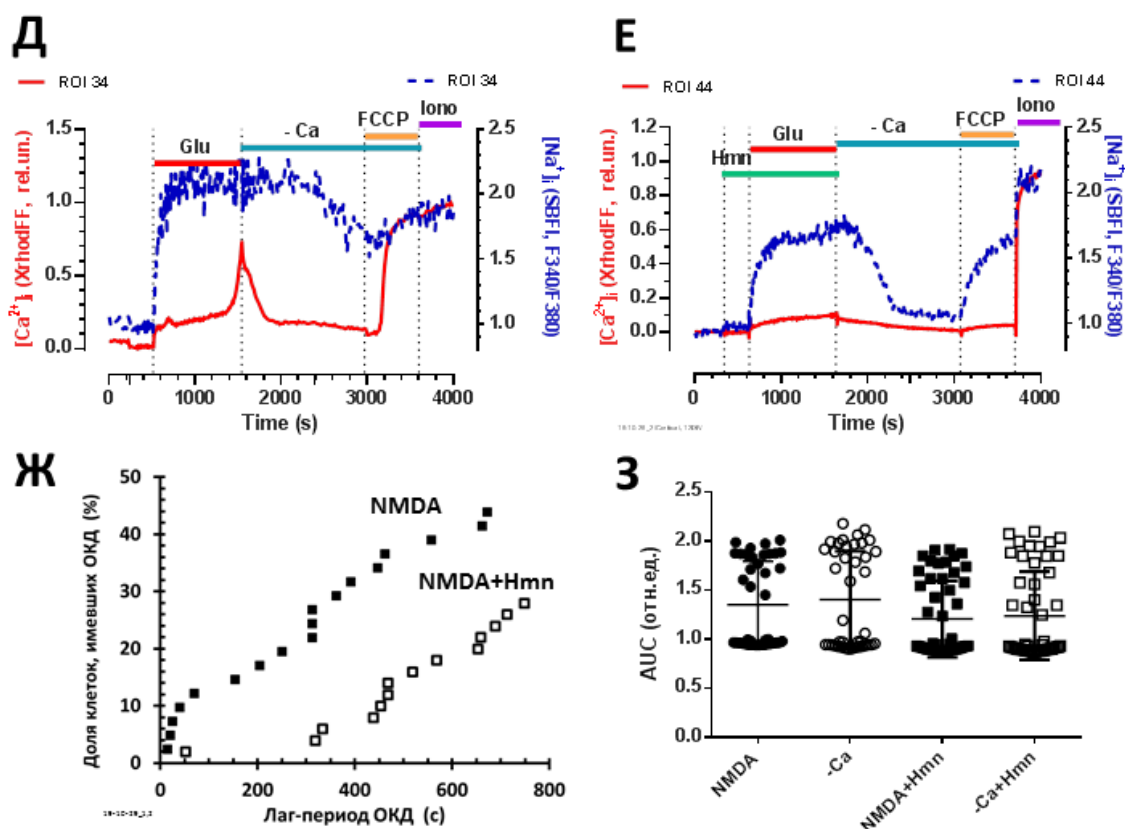


Рис. 43. Изменения внутриклеточной концентрации $[Ca^{2+}]_i$ и $[Na^+]_i$, вызванные добавлением NMDA и гимантана Hmn. Серыми линиями показаны графики $[Ca^{2+}]_i$ и $[Na^+]_i$ индивидуальных клеток, черными линиями – средние значения ($\pm$ ошибка среднего). а, в – измерения $[Ca^{2+}]_i$ выполнены 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. Ж – зависимость доли клеток, имевших ОКД от лагпериода ОКД (определение лаг-периода см. раздел “Материалы и методы”). Д, Е – изменения $[Ca^{2+}]_i$ и $[Na^+]_i$ совмещены для двух представительных нейронов, не имевшего ОКД. З – площади под графиками изменения $[Na^+]_i$ во время действия одного NMDA или NMDA + Hmn, а также в период после удаления NMDA (-Ca) или удаления (-Ca + Hmn). Клетки нагружали Ca^{2+} и Na^+ индикаторами как описано в разделе “Материалы и

методы”. Клеточная культура кортикальных нейронов в возрасте 12 дней. Концентрации добавляемых агентов как на рис. 43.

(Воронина Н. А. и др. 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.).

Этот феномен проявился также в увеличении лаг-периода ОКД в присутствии гимантана (рис. 43 ж). Увеличение $[\text{Na}^{+}]_i$ в ответ на NMDA происходило без лаг-периода и $[\text{Na}^{+}]_i$ оставалась на уровне высокого плато до конца действия агониста. Отмывание NMDA не привело к снижению $[\text{Na}^{+}]_i$ даже в тех нейронах, в которых снизилась $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (рис. 43 Б). Похожее соотношение изменений $[\text{Ca}^{2+}]_i$ и $[\text{Na}^{+}]_i$ соответствует описанному ранее для культуры гиппокампальных (Brittain M.K. et al., 2012) и кортикальных нейронов (Шарипов Р.Р. и др., 2018). Присутствие гимантана увеличило долю нейронов, в которых не произошло роста $[\text{Na}^{+}]_i$ (рис. 43 Г). Более того, появились нейроны, в которых удаление NMDA вызывало снижение $[\text{Na}^{+}]_i$ с уровня высокого плато до почти базального. Однако эти отличия имели характер тенденции и достоверно не отличались (рис. 43 З).

Способность гимантана обратимо ингибировать NMDA-рецепторы была исследована ранее на свежеизолированных нейронах гиппокампа крысы методами электрофизиологии (Елшанская М.В. и др., 2001). Авторы обнаружили, что степень блокады увеличивалась с повышением концентрации гимантан, тогда как деблокирование не зависело от концентрации и усиливалось при гиперполяризации клеточной мембраны. Примечательно, что гимантан оставался “запертым” внутри канала “активационными воротами” и деблокирование канала происходило лишь при новом воздействии агониста на клетку и открывании “ворот”. Данные, полученные нами с помощью кальциевого имиджинга индивидуальных нейронов, не во всем согласуются с результатами электрофизиологических экспериментов. Во-первых, гимантан в концентрации 100 мкМ, при которой на 90% ингибировал ионные токи через канал, блокировал индуцированный

NMDA рост $[Ca^{2+}]_i$ не во всех нейронах, а только в тех, в которых перед повторным добавлением NMDA $[Ca^{2+}]_i$ смогла вернуться к базальному уровню (рис. 40 в). В тех нейронах, в которых $[Ca^{2+}]_i$ не вернулась к уровню в покое нейронах перед повторной стимуляцией NMDA-рецепторов, гимантан не влиял на $[Ca^{2+}]_i$ (третья добавка NMDA+Hmn на рис. 40 а). Неспособность ингибиторов снижать $[Ca^{2+}]_i$ в нейронах, если в них уже возникла ОКД, наблюдали ранее на культурах гиппокампа крысы (Vergun O. et al., 1999) и гранулярных нейронов мозжечка (Ходоров Б.И. и др., 2001). Объясняли этот феномен тем, что во время высокого $[Ca^{2+}]_i$ плато, которое наступает после завершения развития ОКД, скорости поступления Ca^{2+} в цитоплазму и удаления из нее становятся очень низкими и поэтому никакие ингибиторы NMDA-каналов не способны оказать заметного эффекта на уровень $[Ca^{2+}]_i$ (Khodorov B.I., 2004).

Второе отличие данных кальциевого имиджинга от электрофизиологических измерений состоит в том, что гимантан (100 мкМ) ингибировал рост $[Ca^{2+}]_i$ на ~50% в тех клетках (~30% от общего числа $n = 29$), в которых индуцированный NMDA рост был обратим (рис. 2 В). Ни в одном нейроне не отмечалось 90% ингибирования. Возможно, это отличие связано с типом клеток. В настоящей работе это нейроны из коры головного мозга 1-дневных крыс после 12 дней содержания в культуре, тогда как в работах (Елшанская М.В. и др., 2001) использовали механически диссоциированные нейроны из свежесеченного среза мозга крысы 2–3 месячного возраста. Эти различия могли проявиться в отличиях в субъединичном составе NMDA-рецепторов, других компонентов клетки, оказывающих влияние на функционирование рецепторов. Аффинность гимантана к NMDA рецепторам в полученных нами культурах могла быть заметно ниже, чем в остро изолированных нейронах из среза мозга и, соответственно, ингибирование менее эффективным. Другими словами, в части нейронов гимантан не входил в канал NMDA рецептора либо перекрывал его не полностью и поэтому в этих

нейронах сохранялся, хоть и пониженный, транспорт Ca^{2+} и $[\text{Ca}^{2+}]_i$ не опускалась на 90% относительно амплитудной величины.

Поскольку гимантан подобно Mg^{2+} ингибирует ионный канал NMDA-рецептора потенциал-зависимым образом, мы ожидали подобия в изменениях $[\text{Ca}^{2+}]_i$ при действии NMDA в присутствии ингибирующих концентраций гимантана и Mg^{2+} . Оказалось, что Mg^{2+} (10 мМ) снижал площадь под кривой вызванных NMDA изменений $[\text{Ca}^{2+}]_i$ тем сильнее, чем больше входило Ca^{2+} в этот нейрон при действии одного NMDA (рис. 42 а). Поэтому индуцированный NMDA подъем $[\text{Ca}^{2+}]_i$ в присутствии высокой концентрации Mg^{2+} в буфере (10 мМ) был примерно одинаковым для клеток, имевших 3-кратное различие в соотношении скоростей поступления Ca^{2+} в цитоплазму и удалении из нее (3-кратное различие площадей под кривыми изменений $[\text{Ca}^{2+}]_i$). В то же время, гимантан (100 мкМ) в одинаковой степени снижал рост $[\text{Ca}^{2+}]_i$ в клетках с высоким и с низким подъемом $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Поэтому динамическое равновесие между поступлением Ca^{2+} в цитоплазму и его удалением из нее имело характер прямой пропорциональной зависимости (рис. 42 Б). Это наблюдение свидетельствует о том, что, несмотря на расположение внутри канала, Mg^{2+} и гимантан по-разному ограничивают поток Ca^{2+} через NMDA-канал, что согласуется с моделью, предложенной в работе (Елшанская М.В. и др., 2001) о том, что Mg^{2+} и гимантан располагаются на разной “глубине” внутри канала (на разном расстоянии от внутренней поверхности плазматической мембраны).

Высокие концентрации глутамата вызывают кальциевую дисрегуляцию (ОКД), которая происходит синхронно с сильной митохондриальной деполяризацией (Khodorov B.I., 2004).. На рис. 42 Д и 42 Е совмещены для наглядности изменения $[\text{Ca}^{2+}]_i$ и $\Delta\Psi_m$ двух нейронов, в одном из которых (рис. 42 д) за время действия NMDA развилась ОКД и сильное падение $\Delta\Psi_m$ (рост флуоресценции Rh123 во время вторичного подъема $[\text{Ca}^{2+}]_i$). Гимантан не нарушил синхронность развития ОКД и падение $\Delta\Psi_m$, снижая долю нейронов, в которых развилась ОКД, и, соответственно, долю нейронов, в которых

происходила сильная митохондриальная деполяризация (рис. 42 А - Г). Неконкурентный ингибитор NMDA-рецепторов МК-801 (10 мкМ) вызывал практически полное блокирование индуцированных NMDA изменений $[Ca^{2+}]_i$ и $\Delta\Psi_m$, причем во всех нейронах (рис. 42 Ж, З). Менее сильное ингибирование гимантаном роста $[Ca^{2+}]_i$ и падения $\Delta\Psi_m$, связано, по-видимому, с тем, что МК-801 ингибирует NMDA-рецепторы не зависимо от величины потенциала плазмалеммы, тогда как действие гимантана зависит от этого потенциала (Елшанская М.В. и др., 2001).

В зрелых нейрональных культурах часто наблюдается спонтанная активность, проявляющаяся в снижении потенциала плазматической мембраны и входе Ca^{2+} по потенциал- и лиганд-зависимым каналам (Зинченко В.П. и др., 2016; Aqrawe Z. et al., 2020). Возможно, эта спонтанная активность является одной из причин гетерогенности $[Ca^{2+}]_i$ ответов нейронов на блокирующее действие гимантана.

Известно, что ионные каналы NMDA-рецепторов хорошо проницаемы не только для Ca^{2+} , но также для Na^+ и K^+ . В культуре кортикальных нейронов гимантан (100 мкМ) вызывал лишь частичное ингибирование роста $[Ca^{2+}]_i$, удлиняя лаг-период развития ОКД (рис. 43 Ж). Гимантан не оказывал заметного влияния на изменения $[Na^+]_i$ при совместном добавлении с NMDA по сравнению с действием одного этого агониста, хотя прослеживалась тенденция к снижению общего количества Na^+ прошедшего сквозь цитозоль (рис. 43 З). Причиной неодинакового ингибирования изменений $[Ca^{2+}]_i$ и $[Na^+]_i$, неконкурентными ингибиторами NMDA-каналов, включая гимантан, может быть, помимо отмеченной выше спонтанной электрической активности нейрональной культуры, то, что активация NMDA-рецепторов вызывает реверсию Na^+ / Ca^{2+} - обмена (Brittain M.K. et al., 2012). Основные результаты раздела опубликованы (Воронина Н.А. и др., 2021).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Экспериментальное моделирование ранней и поздней стадии ПС с помощью многократного введения нейротоксина МФТП в разных дозах по протоколу, разработанному в исследованиях Хаиндрава В.Г. и соавторов (Хаиндрава В.Г. и др., 2010), позволило выявить различия в степени выраженности гибели TN^+ -нейронов ЧС между ранней и поздней стадией, наибольшую выраженность моторных нарушений у мышей на поздней стадии ПС, как и повышение провоспалительных цитокинов более значительное на поздней, чем на ранней стадии. Результаты работы демонстрируют влияние производных адамантана (гимантана) на основные звенья патогенеза БП (окислительный стресс, нейровоспаление, эксайтотоксичность глутамата) на начальной и поздней стадии ПС, что позволяет оценить нейропротекторные свойства, направленные на замедление нейродегенерации в ЧС.

Мировой опыт поиска оптимальных нейропротекторных средств при БП демонстрирует противоречивые результаты между экспериментальными данными и клиническими исследованиями. Однако для блокаторов NMDA-рецепторов такое противоречие было в некоторой степени преодолено (Salamon A. et al., 2020). Так, в ранних исследованиях производных адамантана препарат Мидантан оказывал умеренное замедляющее действие на прогрессирование заболевания на модели МФТП. При клиническом применении мидантан оказывает хорошее клиническое воздействие на двигательные осложнения, а ретроспективный анализ пациентов, получавших мидантан, показал улучшение выживаемости (Uitti R.J. et al., 1996). По результатам данной работы гимантан превосходил мидантан в устранении двигательных нарушений более выражено на ранней стадии у мышей с ПС, вызванным МФТП, в виду чего дальнейшее исследования нейропротекторных свойств в отношении основных звеньев патогенеза БП (окислительный стресс, эксайтотоксичность глутамата, гибель ДА-нейронов в ЧС, нейровоспаление) было проведено с препаратом гимантаном.

По данным ВЭЖХ применение гимантана на ранней стадии оказывает положительное влияние на компенсаторные механизмы, задействованные при ПС, а именно предотвращает падение уровня ДА и его метаболитов ДОФУК и ГВК стриатуме.

Морфологическая оценка нейрональной плотности в зоне ЧС на фоне МФТП-индуцированного ПС показало выраженную нейродегенерацию ТН-положительных нейронов и защитный потенциал гимантана при его применении на модели ранней стадии ПС. Так, гимантан был способен сохранить необходимый для нормальной функции ЧС нейрональный пул (до 77% от контроля) в сравнении с группой контроля и группой МФТП без введения препарата, что непосредственно демонстрирует его нейропротективные свойства. Однако значимой разницы в степени нейродегенерации при применении гимантана на поздней стадии ПС не было выявлено.

Уровни провоспалительных цитокинов, измеренных у мышей с ПС в нигрокаудатном комплексе, в ответ на введение гимантана также претерпели измерения в сравнении с группой мышей, которым не вводили препарат. Так, отмечено достоверное уменьшение уровня IL-1 β , интерферон- γ , ФНО- α на ранней стадии ПС, и снижения 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 ИЛ-1 β , интерферон- γ , ФНО- α , ИЛ-6 (Perry V.H., Holmes C., 2014), а уменьшение количества указанных цитокинов сопряжено с уменьшением нейродегенерации в зоне ЧС (McCoу M.K. et al., 2008), данный эффект гимантана следует трактовать как противовоспалительный и направленный на нейропротекцию ДА-ергических нейронов в ЧС.

Исследование окислительного статуса и эффективности антиоксидантных систем в нигрокаудатном комплексе продемонстрировали способность гимантана на ранней стадии увеличивать мощность антиоксидантной системы и снижать пагубное воздействие АФК на

дофаминергические нейроны в nigrostriatalной системе, нормализовать уровень продуктов ПОЛ и защитить клетки от окислительного стресса. Данные эффекты не отмечались на поздней стадии ПС, уровень ООС возрастал в 7,9 раз по отношению к контролю.

Анализ биоэлектрической активности мозга в ответ на введение гимантана мышам с ПС показал его эффективность в снижении амплитуды всех групп волн во всех отведениях, снижение мощности бета- и дельта осцилляций и увеличение активности в диапазоне тета-волн, возвращение мощности ритмов к фоновым показателям контроля, обращения вспять общего замедления ЭЭГ-картины и снижение бета2-активности в зоне ЧС как на ранней, так и на поздней стадии ПС. Нивелирование гимантаном указанных изменений ЭЭГ-картины в ответ на введение нейротоксина, можно считать защитным эффектом препарата, поскольку общее замедление ритмов, повышение амплитуды во всех отведениях, снижение мощности всех диапазонов и особенно тета-волн в СК и ЧС, нарастание активности бета – и дельта-волн является характерными признаками изменений при БП (Капица И.Г. и др., 2014).. Данный эффект гимантана более выражен на начальной стадии ПС, чем на развернутой стадии

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 гимантан от неконкурентных ингибиторов (т.к. МК-801) и должно избавить от выраженных побочных эффектов применения препарата, связанных с блокадой NMDA-рецепторов (сонливость, галлюцинации и даже кома) (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.

Таким образом, нами в ходе исследований с применением различных методик показан положительный эффект гимантана, проявляющийся во влиянии на важные принципиальные звенья патогенеза ПС, такие как нейродегенерация, окислительный стресс, нейровоспаление, эксайтотоксичность глутамата и перегрузка клеток Ca^{2+} , зафиксировано улучшение локомоторной активности в поведенческих тестах, на основании чего можно сделать вывод о наличии выраженных нейропротективных свойств производного адамантана – гимантана, и о механизмах лежащих в основе данного эффекта. Полученные результаты, выявившие у гимантана нейропротективное действие и антипаркинсонический эффект на ранней клинической фазе развития экспериментального паркинсонизма могут служить основанием для рекомендации дальнейших преклинических исследований и проведения клинических испытаний с целью использования этого нового препарата в медицинской практике для включения его в комплексную патогенетическую терапию болезни Паркинсона на начальной 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 фазе ПС (МФТП 4х20 мг/кг) по сравнению с ранней фазой (МФТП 4х12 мг/кг). 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 фазе развития МФТП-индуцированного ПС. На ранней клинической фазе гимантан предупреждает резкое снижение уровня дофамина, ДОФУК, ГВК, норадреналина и повышение интенсивности метаболизма дофамина (ДОФУК/ДА), а на поздней фазе ПС снижает в стриатуме мышей только уровень ДОФУК.

3. Морфологические исследования показали, что число ДА тирозин-позитивных нейронов (ТН⁺) в черной субстанции (ЧС) мозга мышей на ранней фазе ПС, вызванного МФТП, достоверно снижается. Гимантан оказывает нейропротективное действие, предупреждая снижение числа ТН⁺ нейронов в ЧС (сохранность 77%) на ранней клинической фазе ПС

4. Показано, что как на ранней, так и на поздней фазах развития ПС в nigrocaudate complex мозга мышей возрастает уровень цитокинов ИЛ-1 β , ИЛ-6, Ин- γ и ФНО- α . Гимантан на ранней фазе развития ПС снижает содержание цитокинов ИЛ-1 β , Ин- γ и ФНО- α , а на поздней фазе ПС уменьшает содержание только ИЛ-6

5. Выявлено повышение уровня общего окислительного статуса (ООС) и индекса окислительного стресса (ИОС) и снижение уровня общего антиоксидантного статуса (ОАС) в нигрокаудатном комплексе 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 дезрегуляционная активность, изменение спектров мощности ЭЭГ, повышение амплитуд волн. Гимантан устраняет чрезмерный рост амплитуд всех групп волн, нормализует тета-активность, увеличивает мощность ритмов, снижает патологическое замедление и дезрегуляционную активность в диапазонах бета- и дельта волн 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 ЛИТЕРАТУРЫ

1. Аракелян Р.К., Неробкова Л.Н., Катунина Е.А., Вальдман Е.А., Капица И.Г., Воронина Т.А., Авакян Г.Н. Особенности функциональной активности головного мозга у больных болезнью Паркинсона на фоне лечения амантадин-сульфатом // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. 2005, - № 4. - С. 17-21.
2. Арцимович Н.Г., Фадеева Т.А., Шалыминова Ю.А., Климова Н.В. 1-Ацетоксиадамantan-4-он, проявляющий иммуностимулирующую активность // Авторское свидетельство СССР №583607, 1977 г.
3. Вальдман Е. А. Воронина, Т. А., Аксенова, Л. Н., Бунеева, О. А., Медведев, А. Е.. Влияние нового противопаркинсонического препарата гимантана на активность моноаминоксидаз //Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2003. – Т. 66, №. 5. – С. 3-5.
4. Вальдман Е. А., Воронина Т. А., Неробкова Л. Н. Противопаркинсоническая активность нового производного адамантана //Экспериментальная и клиническая фармакология. – 1999. – Т. 4. – С. 3-7.
5. Вальдман Е. А., Неробкова Л. Н., Воронина Т. А. Оценка защитного эффекта нового потенциального противопаркинсонического средства гимантана от нейротоксического действия МФТП //Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2004. – Т. 67, №. 1. – С. 7-10.
6. Вальдман Е.А. Разработка фармакологического средства патогенетической терапии паркинсонизма на основе анализа механизмов действия производных аминоксиданта //Автореф. дисс. докт. мед. наук.. - 2001. - 44 стр.
7. 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.
8. 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.
9. Воронина Н.А., Кучеряну В.Г., Ветрилэ Л.А., Голоборщев В.В, Капица И.Г., Воронина Т.А., Морозов С.Г. Изучение влияния гимантана на уровень провоспалительных цитокинов в нигрокаудатном комплексе мозга мышей при экспериментальном паркинсонизме // Патогенез. - 2021 — Т. 19, № 1. - С. 45-49.
10. Воронина Т.А. Раевский К.С., Кудрин В.С., Вальдман Е.А., Андрияшанова Э.А. Влияние нового потенциального противопаркинсонического средства гимантана на содержание моноаминов и их метаболитов в стриатуме крыс // Экспериментальная и клиническая фармакология.- 2001 г. - № 6.- С. 13-16.
11. Ганьшина Т. С., Курза, Е. В., Масленников, Д. В., Курдюмов, И. Н., Гнездилова, А. В., Мирзоян, Р. С. Анализ механизма цереброваскулярного эффекта

- гимантана // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2015. – Т. 78, №. 10. – С. 3-6.
12. Елшанская М.В., Соболевский А.И., Вальдман Е.А., Ходоров Б.И. Взаимодействие потенциального противопаркинсонического средства производного адамантана с ионными каналами глутаматных рецепторов NMDA подтип // Экспериментальная и клиническая фармакология. - 2001. - Т. 64, № 1 - С. 18-21.
 13. Жирмунская Е.А., Попелянский Я.Ю. Электрическая активность мозга при различных формах паркинсонизма // Ж. невр. и псих. - 1954 г. - Т. 54, № 3. - С. 254-259.
 14. Зинченко В. П., Туровская, М. В., Теплов, И. Ю., Бережнов, А. В., Туровский, Е. А. Роль парвальбумин-содержащих интернейронов в регуляции спонтанной синхронной активности нейронов мозга в культуре // Биофизика. – 2016. – Т. 61, №. 1. – С. 102-111.
 15. Иванова Е.А. Капица И.Г., Вальдман Е.А., Воронина Т.А. Противопаркинсоническая активность гимантана на модели гемипаркинсонического синдрома у крыс // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. - 2015 г. - № 3.- С. 362-365.
 16. Иванова Е.А. Капица И.Г., Непоклонов А.В., Кокшенев И.И., Вальдман Е.А., Воронина Т.А. Противовоспалительная активность гимантана на моделях периферического воспаления и нейровоспаления, индуцированного липополисахаридом // Химико-фармацевт. журн. - 2013 г. - Т. 47, № 10 — С. 12-15.
 17. Капица И. Г., Неробкова Л. Н., Воронина Т. А. ЭЭГ корреляты ранней стадии Болезни Паркинсона в эксперименте на мышах линии C57bl/6 // Биомедицина. - 2014 г. - № 1. - С. 54-60.
 18. Капица И.Г. Кокшенев И.И., Неробкова Л.Н, Вальдман Е.А., Воронина Т.А. Влияние гимантана на биоэлектрическую активность мозга мышей с мфтп — вызванным паркинсоническим синдромом // Экспериментальная и клиническая фармакология. - 2013 г. - № 4. - С.3-6.
 19. Карабань И.Н. Применение амантадина при болезни Паркинсона, паркинсонизме и осложнениях терапии леводопой// Международный неврологический журнал. - 2018 г. - С. 56-61.
 20. Козина Е.А., Хаиндрава В.Г., Кудрин В.С., Кучеряну В.Г., Клодт П.Д., Бочаров Е.В., Раевский К.С., Крыжановский Г.Н., Угрюмов М.В. Экспериментальное моделирование функциональной недостаточности nigrostriatalной дофаминергической системы у мышей// Росс Физиол Ж Им И.М. Сеченова. - 2010 г. - Т. 96, № 3 - С. 270-82.
 21. Козина Е.А., Хаиндрава В.Г., Кудрин В.С., Кучеряну В.Г., Клодт П.Д., Бочаров Е.В., Раевский К.С., Крыжановский Г.Н., Угрюмов М.В. Экспериментальное моделирование преclinical стадии болезни Паркинсона// Рос. Физиол. журн. - 2010 г.
 22. Колачева А. А., Козина, Е. А., Волина, Е. В., Угрюмов, М. В. Дегенерация nigrostriatalных дофаминергических нейронов на экспериментальной модели

- ранней клинической стадии болезни Паркинсона// Нейрохимия. - 2014 г. - Т. 31, № 3 — С. 225-225.
23. Котельникова С.О. Непоклонов А.В., Кокшенев И.И., Иванова Е.А., Крайнева В.А., Вальдман Е.А., Гарибова Т.Л., Воронина Т.А. Сравнительное исследование эффектов гимантана и амантадина на экспериментальной модели интрацеребральной посттравматической гематомы// Журнал неврологии и психиатрии им.С.С.Корсакова. - 2012 г. - № 9. - С.63-66.
24. Крыжановский Г. Н. Атаджанов, М. А., Воронина, Т. А., Неробкова, Л. Н., Загоревский, В. А., Шаркова Л. М. Клинико-энцефалографические показатели паркинсонического синдрома, вызванного МФП+ у крыс// Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. - 1989 г. - №. 2. - С. 147-150.
25. Крыжановский Г.Н. Общая патофизиология нервной системы: Руководство // М.: «Медицина». -1997. – 351 С.
26. Крыжановский Г.Н. Свободнорадикальное окисление // Дизрегуляторная патология. Руководство для врачей и биологов / ред. Крыжановского Г.Н. – М.: Медицина. - 2002. – С.29-30.
27. Кучеряну В. Г., Бочаров Е. В., Крыжановский Г. Н., Бочарова О. А., Полещук В.В. Механизмы нейродегенерации при болезни Паркинсона. Активация микроглии // Патогенез. - 2012 г. - Т. 10, № 3 — С. 30-34.
28. Кучеряну В.Г. М.А. Атаджанов, Е.В. Никушкин, В.А. Загоревский, Л.М. Шаркова Перекисное окисление липидов в хвостатых ядрах при экспериментальном паркинсоническом синдроме // Бюл. exper. биол. и мед. - 1989 г. - Т. 107, №. 1. - С. 39-41.
29. Кучеряну В.Г. Паркинсонизм: патогенетические механизмы и принципы терапии // Автореф. диссерт. на соискание ученой степени доктора медицинских наук Москва, 2000. – 48 с.
30. Кучеряну В.Г., Крыжановский Г.Н. Влияние глутамата и антагонистов N-метил-D-аспартат (NMDA)-рецепторов на экспериментальный паркинсонический синдром у крыс // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. - 2000 г. - Т. 130, № 7. — С. 20-23.
31. Литвин Е. А. Бастрыгин, Д. В., Колыванов, Г. Б., Алексеев, К. В., Жердев, В. П. Фармакокинетика гимантана у крыс // Экспериментальная и клиническая фармакология. - 2011 г. - Т. 74, № 11. — С. 24-8.
32. Логвинов И.О. Антипова Т.А., Непоклонов А.В., Вальдман Е.А. Сравнение защитного эффекта гимантана и амантадина при действии нейротоксина 6-гидроксидофамина в культуре клеток нейробластомы человека // Экспериментальная и клиническая фармакология. - 2016 г. - Т. 79, №. 1. - С. 12-14.
33. Меньщикова Е.Б. Ланкин В.З., Зенков Н.К., Бондарь И.А., Круговых Н. Ф., Труфакин В.А. Окислительный стресс. Прооксиданты и антиоксиданты //М.: Фирма «Слово» - 2006. - 556 с.
34. Нежинская, Г. И., Вальдман, Е. А., Назаров, П. Г., Сапронов, Н. С. Оценка пролонгированного иммуностропного эффекта гимантана — потенциального

- противопаркинсонического средства// Экспериментальная и клиническая фармакология. - 2003 г. - Т.66, № 3. - С.44-46.
- 35.Непоклонов А.В. Капица И.Г., Иванова Е.А., Воронина Т.А., Вальдман Е.А. Изучение эффектов гимантана на модели ранней ("домоторной") стадии болезни паркинсона у крыс // Экспериментальная и клиническая фармакология. - 2012 г. - Т. 75, № 11. - С.3-6.
- 36.Неробкова Л. Н., Вальдман, Е. А., Воронина, Т. А., Маркина, Н. В., Шаркова, Л. М. Влияние нового производного аминоксадамонтана А 7 на проявления паркинсонического синдрома, вызванного системным введением нейротоксина МФТП // Экспериментальная и клиническая фармакология. - 2000 г. -№ 3. - стр. 3.
- 37.Неробкова Л.Н., Воронина ТА, Катунина Е.А., Аракелян Р.К., Вальдман Е.А., Авакян Г.Н. Особенности эффектов амантадина на пространственную организацию биопотенциалов мозга больных паркинсонизмом // Психофармакология и биологическая наркология. - 2002 г. - Т.2, №3. — 4 - С.429.
- 38.Сурков С. А., Мингазов, Э. Р., Стурова, А. И., Блохин, В. Е., Угрюмов, М. В. Клеточная нейротоксическая модель болезни Паркинсона—динамика дегенерации дофаминергических нейронов под влиянием токсина МФП+// Цитология. - 2019 г. - Т. 61, № 12. — С. 978-986.
- 39.Таллерова А. В., Иванова, Е. А., Капица, И. Г., Коваленко, Л. П., Вальдман, Е. А., Воронина Т. А. Влияние противопаркинсонического препарата гимантан на уровень цитокинов в эксперименте// Иммунология. - 2013 г. - Т. 34, № 5. — С. 254-257.
- 40.Угрюмов М. В. Нейродегенеративные заболевания: от генома до целостного организма / Под. редакцией Угрюмова М.В. – М.: Научный мир, 2014. – 848 с.
- 41.Угрюмов М.В. Разработка доклинической диагностики и превентивного лечения нейродегенеративных заболеваний// Журнал неврологии и психиатрии им. СС Корсакова. - 2015 г. - №. 11. - С. 4-14.
- 42.Хаиндрава В. Г., Ершов, П. В., Анциперов, В. Е., Обухов, Ю. В., Нанаев, А. К., Угрюмов, М. В. Оптимизация количественного анализа дофаминергических нейронов в черной субстанции у мышей при моделировании болезни Паркинсона // Цитология. - 2010 г. - Т. 52, № 6. - С. 423.
- 43.Хаиндрава В. Г., Козина, Е. А., Кудрин, В. С., Кучеряну, В. Г., Клодт, П. Д., Наркевич, В. Б., Угрюмов, М. В. Экспериментальное моделирование клинической и преклинической стадий болезни Паркинсона // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. - 2010 г. - Т. 150, № 11. - С. 495-498.
- 44.Хаиндрава В.Г. Козина Е.А., Кучеряну В.Г., Крыжановский Г.Н., Кудрин В.С., Клодт П.Д., Бочаров Е.В., Раевский К.С., Угрюмов М.В. Моделирование преклинической и ранней клинической стадий болезни Паркинсона // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. - 2010 г. - Т. 110, №7. — С.41-47.
- 45.Ходоров, Б. И., Сторожевых, Т. П., Сурин, А. М., Сорокина, Е. Г., Юравичус, А. И., Бородин, А. В., Пинелис, В. Г. Митохондриальная деполяризация играет доминирующую роль в механизме нарушения нейронального кальциевого

- гомеостаза, вызванного глутаматом // Биол. мембраны. - 2001 г. - Т. 18, № 6. — С. 421-432.
46. Ходоров Б.И. Механизмы дизрегуляции кальциевого гомеостаза нейронов головного мозга при гиперстимуляции глутаматных рецепторов. // Дизрегуляторная патология / Под. ред. Крыжановского Г.Н. - Москва : Медицина — 2002 г.
 47. Частухин, Д. С., Бородин, А. В., Ходоров, Б. И. Математическое моделирование отсроченной кальциевой дерегуляции в нейронах головного мозга при гиперстимуляции глутаматных рецепторов // Биофизика. - 2013 г. - Т. 59, № 2. — С. 290-303.
 48. Шарипов Р. Р., Красильникова, И. А., Пинелис, В. Г., Горбачева, Л. Р., Сурин, А. М. Исследование механизма сенситизации нейронов к повторному действию глутамата // Биологические мембраны. - 2018 г. - Т 35, № 5. - С. 384-397.
 49. Aarsland D., Ballard C., Walker Z., Bostrom F., Alves G., Kossakowski K., Leroi I., Pozo-Rodriguez F., Minthon L., Londos E. Memantine in patients with Parkinson's disease dementia or dementia with Lewy bodies: a double-blind, placebo-controlled, multicentre trial // *Lancet Neurol.* - 2009. - Vol. 8, N.7. - P. 613-618.
 50. Abramov A.Y., Duchen M.R. Mechanisms underlying the loss of mitochondrial membrane potential in glutamate excitotoxicity // *Biochim Biophys Acta.* - 2008. - Vol. 1777, N.7-8. - P. 953-964.
 51. Adell A. Brain NMDA Receptors in Schizophrenia and Depression // *Biomolecules.* - 2020. - Vol. 10, N.6. - P. 947.
 52. Aguirre J., Rodríguez R., Hansberg W. Oxidation of *Neurospora crassa* NADP-specific glutamate dehydrogenase by activated oxygen species // *J Bacteriol.* - 1989. - Vol. 171, N.11. - P. 6243-6250.
 53. Ahmed I., Bose S.K., Pavese N., Ramlackhansingh A., Turkheimer F., Hotton G., Hammers A., Brooks D.J. Glutamate NMDA receptor dysregulation in Parkinson's disease with dyskinesias // *Brain.* - 2011. - Vol. 134, N.4. - P. 979-986.
 54. Alam Z.I., Jenner A., Daniel S.E., Lees A.J., Cairns N., Marsden C.D., Jenner P., Halliwell B. Oxidative DNA damage in the parkinsonian brain: an apparent selective increase in 8-hydroxyguanine levels in substantia nigra // *J Neurochem.* - 1997. - Vol. 69, N.3. - P. 1196-1203.
 55. Albin R.L., Greenamyre J.T. Alternative excitotoxic hypotheses // *Neurology.* - 1992. - Vol. 42, N.4. - P. 733-738.
 56. Angelova P.R., Ludtmann M.H., Horrocks M.H., Negoda A., Cremades N., Klennerman D., Dobson C.M., Wood N.W., Pavlov E.V., Gandhi S., Abramov A.Y. Ca²⁺ is a key factor in α -synuclein-induced neurotoxicity // *J Cell Sci.* - 2016. - Vol. 129, N.9. - P. 1792-1801.
 57. Aqrawe Z., Patel N., Vyas Y., Bansal M., Montgomery J., Travas-Sejdic J., Svirskis D. A simultaneous optical and electrical in-vitro neuronal recording system to evaluate microelectrode performance // *PLoS One.* - 2020. - Vol. 15, N.8. - P. e0237709. .

58. Armstrong, M. J., Okun M. S. Diagnosis and Treatment of Parkinson Disease: A Review // JAMA. - 2020. - Vol. 323, N.6. - P. 548-560.
59. Aumann T., Horne M. Activity-dependent regulation of the dopamine phenotype in substantia nigra neurons // J Neurochem. - 2012. - Vol. 121, N 4. - P. 497-515.
60. Ayton S., George J.L., Adlard P.A., Bush A.I., Cherny R.A., Finkelstein D.I. The effect of dopamine on MPTP-induced rotarod disability// Neurosci Lett. - 2013. - Vol. 543 — P.105-109.
61. Baekelandt V, Lobbestael E, Xicoy H, Martens GJM. Editorial: The Role of Lipids in the Pathogenesis of Parkinson's Disease // Front Neurosci.. - 2020. - Vol.14. - P.250.
62. Bajpai A., Verma A. K., Srivastava M., Srivastava R. Oxidative stress and major depression // Journal of clinical and diagnostic research: JCDR. - 2014. - Vol. 8, N.12. - P.CC04–CC07.
63. Balestrino R., Schapira A.H.V. Parkinson disease // Eur J Neurol. - 2020. - Vol. 27, N. 1. - P. 27-42.
64. Ballard P.A., Tetrad J.W., Langston J.W. Permanent human parkinsonism due to 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP): seven cases // Neurology. - 1985. - Vol. 35, N.7. - P. 949-956.
65. Banati RB Gehrman J, Schubert P, Kreutzberg GW. Cytotoxicity of microglia // Glia. - 1993. - Vol.7, N.1. - P. 111-118.
66. Barcia C., Sánchez Bahillo A., Fernández-Villalba E., Bautista V., Poza Y., Poza M., Fernández-Barreiro A., Hirsch E.C., Herrero M.T. Evidence of active microglia in substantia nigra pars compacta of parkinsonian monkeys 1 year after MPTP exposure// Glia. - 2004. - Vol. 46, N.4. - P. 402-409.
67. Bean BP. The action potential in mammalian central neurons // Nat Rev Neurosci. - 2007. - Vol.8, N.6. - P. 451-465.
68. Bellucci A., Zaltieri M., Navarria L., Grigoletto J., Missale C., Spano P. From α -synuclein to synaptic dysfunctions: new insights into the pathophysiology of Parkinson's disease // Brain Res. - 2012. - Vol.1476. - P.183–202.
69. Benazzouz A., Breit S., Koudsie A., Pollak P., Krack P., Benabid A.L. Intraoperative microrecordings of the subthalamic nucleus in Parkinson's disease // Mov Disord. - 2002. - Vol.17, N.3. - P. S145-149.
70. Bergman H., Wichmann T., Karmon B., DeLong M.R. The primate subthalamic nucleus. II. Neuronal activity in the MPTP model of parkinsonism // J Neurophysiol. - 1994. - Vol.72, N.2. - P.507-520.
71. Bernheimer H., Birkmayer W., Hornykiewicz O., Jellinger K., Seitelberger F. Brain dopamine and the syndromes of Parkinson and Huntington. Clinical, morphological and neurochemical correlations // J Neurol Sci. - 1973. - Vol. 20, N.4. - P.415-455.
72. Bezard E., Dovero S., Bioulac B., Gross C.E. Kinetics of nigral degeneration in a chronic model of MPTP-treated mice // Neurosci Lett. - 1997. - Vol. 234. N. 1. - P. 47-50.
73. Bezard E., Gross C.E., Fournier M.C., Dovero S., Bloch B., Jaber M. Absence of MPTP-induced neuronal death in mice lacking the dopamine transporter // Exp Neurol. - 1999. - Vol. 155, N.2. - P.268-273.

74. Bezdard E., Gross C.E. Compensatory mechanisms in experimental and human parkinsonism: towards a dynamic approach // *Prog Neurobiol.* - 1998. - Vol. 55, N. 2. - P.93-116.
75. Bhurtel S., Katila N., Srivastav S., Neupane S., Choi D.Y. Mechanistic comparison between MPTP and rotenone neurotoxicity in mice // *Neurotoxicology.* - 2019. - Vol.71. - P.113-121.
76. Blanchard V., Raisman-Vozari R., Vyas S., Michel P.P., Javoy-Agid F., Uhl G., Agid Y. Differential expression of tyrosine hydroxylase and membrane dopamine transporter genes in subpopulations of dopaminergic neurons of the rat mesencephalon // *Brain Res Mol Brain Res.* - 1994. - Vol. 22, N.1-4. - P.29-38.
77. Blanchet P.J., Konitsiotis S., Chase T.N. Amantadine reduces levodopa-induced dyskinesias in parkinsonian monkeys // *Mov Disord.* - 1998. - Vol. 13, N.5. - P.798-802.
78. Blandini F., Armentero M.T. Animal models of Parkinson's disease // *FEBS J.* - 2012. - Vol. 279, N.7. - P.1156-1166.
79. Blaylock R.L. Parkinson's disease: Microglial/macrophage-induced immunoexcitotoxicity as a central mechanism of neurodegeneration // *Surg Neurol Int.* - 2017. - Vol.8. - P.65.
80. Blesa J., Phani S., Jackson-Lewis V., Przedborski S. Classic and new animal models of Parkinson's disease // *J Biomed Biotechnol.* - 2012. - Vol. 2012. - P. 845618.
81. Blum-Degen D., Müller T., Kuhn W., Gerlach M., Przuntek H., Riederer P. Interleukin-1 beta and interleukin-6 are elevated in the cerebrospinal fluid of Alzheimer's and de novo Parkinson's disease patients // *Neurosci Lett.* - 1995. - Vol. 202, N.1-2. - P.17-20.
82. Bolam J.P., Pissadaki E.K. Living on the edge with too many mouths to feed: why dopamine neurons die // *Mov Disord.* - 2012. - Vol. 27, N.12. - P.1478-1483.
83. Bonci A., Grillner P., Mercuri N.B., Bernardi G. L-Type calcium channels mediate a slow excitatory synaptic transmission in rat midbrain dopaminergic neurons // *J Neurosci.* - 1998. - Vol. 18, N.17. - P. 6693-6703.
84. Bonfoco E., Krainc D., Ankarcrona M., Nicotera P., Lipton S.A. Apoptosis and necrosis: two distinct events induced, respectively, by mild and intense insults with N-methyl-D-aspartate or nitric oxide/superoxide in cortical cell cultures // *Proc Natl Acad Sci U S A.* - 1995. - Vol. 92, N.16. - P.7162-7166.
85. Bouvier M., Szatkowski M., Amato A., Attwell D. The glial cell glutamate uptake carrier countertransports pH-changing anions // *Nature.* - 1992. - Vol. 360, N.6403. - P.471-474.
86. Braak H., Ghebremedhin E., Rüb U., Bratzke H., Del Tredici K.. Stages in the development of Parkinson's disease-related pathology // *Cell Tissue Res.* - 2004. - Vol. 318, N.1. - P.121-134.
87. Braak H., de Vos R.A., Bohl J., Del Tredici K. Gastric alpha-synuclein immunoreactive inclusions in Meissner's and Aurbach's plexuses in cases staged for Parkinson's disease-related brain pathology // *Neurosci. Lett.* - 2006. - Vol. 396. - P.67-72.

- 88.Brand M.D., Affourtit C., Esteves T.C., Green K., Lambert A.J., Miwa S., Pakay J.L., Parker N. Mitochondrial superoxide: production, biological effects, and activation of uncoupling proteins // *Free Radic Biol Med.* - 2004. - Vol. 37, N.6. - P.755-767.
- 89.Brenner S.R. The potential of memantine and related adamantanes such as amantadine, to reduce the neurotoxic effects of COVID-19, including ARDS and to reduce viral replication through lysosomal effects // *J Med Virol.* - 2020. - Vol. 92. N.11. - P.2341-2342.
- 90.Bresgen N., Eckl P.M. Oxidative stress and the homeodynamics of iron metabolism // *Biomolecules.* - 2015. - Vol. 5, N.2. - P. 808-847.
- 91.Brittain M.K., Brustovetsky T., Sheets P.L., Brittain J.M., Khanna R., Cummins T.R., Brustovetsky N. Delayed calcium dysregulation in neurons requires both the NMDA receptor and the reverse Na⁺/Ca²⁺ exchanger // *Neurobiol Dis.* - 2012. - Vol. 46, N.1. - P.109-117.
- 92.Brochard V., Combadière B., Prigent A., Laouar Y., Perrin A., Beray-Berthet V., Bonduelle O., Alvarez-Fischer D., Callebert J., Launay J.M., Duyckaerts C., Flavell R.A., Hirsch E.C., Hunot S. Infiltration of CD4⁺ lymphocytes into the brain contributes to neurodegeneration in a mouse model of Parkinson disease // *J Clin Invest.* - 2009. - Vol. 119, N.1. - P.182-192.
- 93.Brodacki B., Staszewski J., Toczyłowska B., Kozłowska E., Drela N., Chalimoniuk M., Stepień A. Serum interleukin (IL-2, IL-10, IL-6, IL-4), TNF α , and INF γ concentrations are elevated in patients with atypical and idiopathic parkinsonism // *Neurosci Lett.* - 2008. - Vol. 441, N.2. - P.158-162.
- 94.Brown G.C., Vilalta A. How microglia kill neurons // *Brain Res.* - 2015. - Vol. 1628. - P.288-297.
- 95.Bullock R. Efficacy and safety of memantine in moderate-to-severe Alzheimer disease: the evidence to date // *Alzheimer Dis Assoc Disord.* - 2006. - Vol. 20, N.1. - P. 23-29.
- 96.Buzsáki G., Buhl D.L., Harris K.D., Csicsvari J., Czéh B., Morozov A. Hippocampal network patterns of activity in the mouse // *Neuroscience.* - 2003. - Vol. 116, N.1. - P.201-211.
- 97.Cadet J.L., Brannock C. Free radicals and the pathobiology of brain dopamine systems // *Neurochem. Int.* - 1998. - Vol. 32, N 2. - P.117-131.
- 98.Cali T., Ottolini D., Negro A., Brini M. α -Synuclein controls mitochondrial calcium homeostasis by enhancing endoplasmic reticulum-mitochondria interactions // *J Biol Chem.* - 2012. - Vol. 287, N.22. - P.17914-17929.
- 99.Cannon J.R., Greenamyre J.T. The role of environmental exposures in neurodegeneration and neurodegenerative diseases// *Toxicol Sci.* - 2011. - Vol. 124, N.2. - P. 225-250.
100. Carta A.R., Carboni E., Spiga S. The MPTP/probenecid model of progressive Parkinson's disease // *Methods Mol Biol.* - 2013. - Vol. 964. - P.295-308.
101. Cassarino D.S., Parks J.K., Parker W.D. Jr., Bennett J.P. Jr. The parkinsonian neurotoxin MPP⁺ opens the mitochondrial permeability transition pore and releases

- cytochrome c in isolated mitochondria via an oxidative mechanism // *Biochim Biophys Acta*. - 1999. - Vol.1453, N.1. - P.49-62.
102. Caumont A.S., Octave J.N., Hermans E. Amantadine and memantine induce the expression of the glial cell line-derived neurotrophic factor in C6 glioma cells // *Neurosci Lett*. - 2006. - Vol. 394, N.3. - P.196-201.
 103. Chai J., Wu Q., Shiozaki E., Srinivasula S.M., Alnemri E.S., Shi Y. Crystal structure of a procaspase-7 zymogen: mechanisms of activation and substrate binding // *Cell*. - 2001. - Vol.107, N.3. – P.399-407.
 104. Chan C.S., Guzman J.N., Ilijic E., Mercer J.N., Rick C., Tkatch T., Meredith G.E., Surmeier D.J. 'Rejuvenation' protects neurons in mouse models of Parkinson's disease // *Nature*. - 2007. - Vol. 447, N.7148. - P.1081-1086.
 105. Chan P., DeLanney L.E., Irwin I., Langston J.W., Di Monte D. Rapid ATP loss caused by 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine in mouse brain // *J Neurochem*. - 1991. - Vol. 57, N.1. - P.348-351.
 106. Chan P., Langston J.W., Irwin I., DeLanney L.E., Di Monte D.A. 2-deoxyglucose enhances 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced ATP loss in the mouse brain // *J Neurochem*. - 1993. - Vol. 61, N.2. - P.610-616.
 107. Chan P.H., Fishman R.A. Brain edema: induction in cortical slices by polyunsaturated fatty acids // *Science*. - 1978. - Vol. 201, N.4353. - P.358-360.
 108. Chang K.H., Chen C.M. The Role of Oxidative Stress in Parkinson's Disease // *Antioxidants (Basel)*. - 2020. - Vol. 9, N.7. - P.597.
 109. Chen H., Lei H., Xu Q. Neuronal activity pattern defects in the striatum in awake mouse model of Parkinson's disease // *Behav Brain Res*. - 2018. - Vol.341. - P.135-145.
 110. Chen H.S., Lipton S.A. The chemical biology of clinically tolerated NMDA receptor antagonists // *J Neurochem*. - 2006. - Vol.97, N.6. - P.1611-1626.
 111. Chen L., Mo M., Li G., Cen L., Wei L., Xiao Y., Chen X., Li S., Yang X., Qu S., Xu P. The biomarkers of immune dysregulation and inflammation response in Parkinson disease // *Transl Neurodegener*. - 2016. - Vol.5, N.1. - P.16.
 112. Chen M.K., Kuwabara H., Zhou Y., Adams R.J., Brasić J.R., McGlothan J.L., Verina T., Burton N.C., Alexander M., Kumar A., Wong D.F., Guilarte T.R. VMAT2 and dopamine neuron loss in a primate model of Parkinson's disease // *J Neurochem*. - 2008. - Vol.105, N.1. - P.78-90.
 113. Chia S.J., Tan E.K., Chao Y.X. Historical Perspective: Models of Parkinson's Disease // *Int J Mol Sci*. - 2020. - Vol.21, N.7. - P.2464.
 114. Chiurchi V., Orlicchio A., Maccarrone M. Is Modulation of Oxidative Stress an Answer? The State of the Art of Redox Therapeutic Actions in Neurodegenerative Diseases // *Oxid. Med. Cell. Longev*. - 2016. - Vol. 2016. - P.1–11.
 115. Choi D.W. Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system // *Neuron*. - 1988. - Vol.1, N.8. - P.623-634.
 116. Choi D.W. Cerebral hypoxia: some new approaches and unanswered questions // *J Neurosci*. - 1990. - Vol.10, N.8. - P.2493-2501.
 117. Choi D.W. Excitotoxic cell death // *J Neurobiol*. - 1992. - Vol.23, N.9. - P.1261-1276.

118. Choi D.W. Glutamate neurotoxicity in cortical cell culture is calcium dependent // *Neurosci Lett.* - 1985. - Vol.58. - P.293–297.
119. Choi D.W. Ionic dependence of glutamate neurotoxicity // *J Neurosci.* - 1987. - Vol.7, N.2. - P.369-379.
120. Choi S.J., Panhelainen A., Schmitz Y., Larsen K.E., Kanter E., Wu M., Sulzer D., Mosharov E.V. Changes in neuronal dopamine homeostasis following 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP+) exposure // *J Biol Chem.* - 2015. - Vol.290, N.11. - P.6799-6809.
121. Chung S. Y., Kishinevsky S., Mazzulli J.R., Graziotto J., Mrejeru A., Mosharov E.V., Puspita L., Valiulahi P., Sulzer D., Milner T.A., Taldone T., Krainc D., Studer L., Shim J.W. Parkin and PINK1 patient iPSC-derived midbrain dopamine neurons exhibit mitochondrial dysfunction and alpha-Synuclein accumulation // *Stem Cell. Reports.* - 2016. - Vol.7, N.4. - P.664–677.
122. Chung E.K., Chen L.W., Chan Y.S., Yung K.K. Downregulation of glial glutamate transporters after dopamine denervation in the striatum of 6-hydroxydopamine-lesioned rats // *J Comp Neurol.* - 2008. - Vol.511, N.4. - P.421-437.
123. Cieri D., Brini M., Calì T. Emerging (and converging) pathways in Parkinson's disease: keeping mitochondrial wellness // *Biochem Biophys Res Commun.* - 2017. - Vol.483, N.4. - P.1020-1030.
124. Clements J.D., Lester R.A., Tong G., Jahr C.E., Westbrook G.L. The time course of glutamate in the synaptic cleft // *Science.* - 1992. - Vol.258, N.5087. - P.1498-1501.
125. Cohen R.A., Fisher M. Amantadine treatment of fatigue associated with multiple sclerosis // *Arch Neurol.* - 1989. - Vol.46, N.6. - P.676-680.
126. Colotla V.A., Flores E., Ocos A., Meneses A., Tapia R. Effects of MPTP on locomotor activity in mice // *Neurotoxicol Teratol.* - 1990. - Vol.12, N.4. - P.405-407.
127. Conn P. J., Pin J. P. Pharmacology and functions of metabotropic glutamate receptors // *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* - 1997. - Vol.37. - P. 205–237.
128. Costa V.V., Del Sarto J.L., Rocha R.F., Silva F.R., Doria J.G., Olmo I.G., Marques R.E., Queiroz-Junior C.M., Foureaux G., Araújo J.M.S., Cramer A., Real A.L.C.V., Ribeiro L.S., Sardi S.I., Ferreira A.J., Machado F.S., de Oliveira A.C., Teixeira A.L., Nakaya H.I., Souza D.G., Ribeiro F.M., Teixeira M.M. N-Methyl-d-Aspartate (NMDA) Receptor Blockade Prevents Neuronal Death Induced by Zika Virus Infection // *mBio.* - 2017. - Vol.8, N.2. - P.e00350-17.
129. Curtis D. R., Watkins J. C. The excitation and depression of spinal neurones by structurally related amino acids // *J. Neurochem.* - 1960. - Vol. 6. - P.117–141.
130. Danbolt N.C. Glutamate uptake // *Prog Neurobiol.* - 2001. - Vol.65, N.1. - P.1-105.
131. Danysz W., Parsons C.G., Kornhuber J., Schmidt W.J., Quack G. Amino adamantanes as NMDA receptor antagonists and antiparkinsonian agents--preclinical studies // *Neurosci Biobehav Rev.* - 1997. - Vol.21, N.4. - P.455-468.

132. Date I., Felten S.Y., Felten D.L. The nigrostriatal dopaminergic system in MPTP-treated mice shows more prominent recovery by syngeneic adrenal medullary graft than by allogeneic or xenogeneic graft // *Brain Res.* - 1991. - Vol. 545, N.1-2. - P.191-198.
133. Davey G.P., Peuchen S., Clark J.B. Energy thresholds in brain mitochondria. Potential involvement in neurodegeneration // *J Biol Chem.* - 1998. - Vol.273, N.21. - P.12753-12757.
134. Davis G.C., Williams A.C., Markey S.P., Ebert M.H., Caine E.D., Reichert C.M., Kopin I.J. Chronic Parkinsonism secondary to intravenous injection of meperidine analogues // *Psychiatry Res.* - 1979. - Vol.1, N.3. - P.249-254.
135. Decressac M., Volakakis N., Björklund A., Perlmann T. NURR1 in Parkinson disease--from pathogenesis to therapeutic potential // *Nat Rev Neurol.* - 2013. - Vol.9, N.11. - P.629-636.
136. Deffains M., Canron M., Teil M., Li Q., Dehay B., Bezard E., Fernagut P. L-DOPA regulates α -synuclein accumulation in experimental parkinsonism // *Neuropathology and Applied Neurobiology.* - 2021. - Vol.47, N.4. - P.532-543.
137. Devergnas A., Pittard D., Bliwise D., Wichmann T. Relationship between oscillatory activity in the cortico-basal ganglia network and parkinsonism in MPTP-treated monkeys // *Neurobiol Dis.* - 2014. - Vol.68. - P.156-166.
138. Dexter D.T., Carter C.J., Wells F.R., Javoy-Agid F., Agid Y., Lees A., Jenner P., Marsden C.D. Basal Lipid Peroxidation in Substantia Nigra Is Increased in Parkinson's Disease // *J Neurochem.* - 1989. - Vol.52, N.2. - P.381-389.
139. Doble A. The role of excitotoxicity in neurodegenerative disease: implications for therapy // *Pharmacol Ther.* - 1999. - Vol. 81, N.3. - P.163-221.
140. Dorsey E.R., Bloem B.R. The Parkinson Pandemic-A Call to Action // *JAMA Neurol.* - 2018. - Vol.75, N.1. - P.9-10.
141. Dovero S., Gross C., Bezard E. Unexpected toxicity of very low dose MPTP in mice: A clue to the etiology of Parkinson's disease? // *Synapse.* - 2016. - Vol.70, N.2. - P.49-51.
142. Dragicevic E., Schiemann J., Liss B. Dopamine midbrain neurons in health and Parkinson's disease: emerging roles of voltage-gated calcium channels and ATP-sensitive potassium channels // *Neuroscience.* - 2015. - Vol.284. - P.798-814.
143. Drake M.E., Jr. Pakalnis A., Denio L.S., Phillips B. Amantadine hydrochloride for refractory generalized epilepsy in adults // *Acta Neurol Belg.* - 1991. - Vol.91, N.3. - P.159-164.
144. Drose S., Brandt U. The mechanism of mitochondrial superoxide production by the cytochrome bc1 complex // *J. Biol. Chem.* - 2008. - Vol.283, N.31. - P.21649-21654.
145. Dubinsky J.M. Intracellular calcium levels during the period of delayed excitotoxicity // *J Neurosci.* - 1993. - Vol.13, N.2. - P.623-631.
146. Duchen M. R., Surin A., Jacobson J. Imaging mitochondrial function in intact cells // *In Methods in enzymology.* Academic Press. - 2003. - Vol.361. - P.353-389.

147. Dunah A.W., Standaert D.G. Dopamine D1 receptor-dependent trafficking of striatal NMDA glutamate receptors to the postsynaptic membrane // *J Neurosci.* - 2001. - Vol.21, N.15. - P.5546-5558.
148. Emborg M.E. Evaluation of animal models of Parkinson's disease for neuroprotective strategies // *J Neurosci Methods.* - 2004. - Vol.139, N.2. - P.121-143.
149. Engen K., Agartz I.. Anti-NMDA-reseptorencefalitt [Anti-NMDA-receptor encephalitis] // *Tidsskr Nor Laegeforen.* - 2016. - Vol.136, N.11. – P.1006-1009.
150. Erel O. A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status // *Clin Biochem.* - 2005. - Vol.38, N.12. - P.1103-1111.
151. Erel O. A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation // *Clin Biochem.* - 2004. - Vol.37, N.4. - P.277-285.
152. Erkulwater S., Pillai R. Amantadine and the end-stage dementia of Alzheimer's type // *South Med J.* - 1989. - Vol.82, N.5. - P.550-554.
153. Feitosa C.M., da Silva Oliveira G.L., do Nascimento Cavalcante A., Morais Chaves S.K., Rai M. Determination of Parameters of Oxidative Stress in vitro Models of Neurodegenerative Diseases-A Review // *Curr. Clin. Pharmacol.* - 2018. - Vol.13, N.2. - P.10.
154. Floor E., Wetzel M.G. Increased protein oxidation in human substantia nigra pars compacta in comparison with basal ganglia and prefrontal cortex measured with an improved dinitrophenylhydrazine assay // *J. Neurochem.* - 1998. - Vol.70, N.1. - P.268–275.
155. Flores A.J., Bartlett M.J., Root B.K., Parent K.L., Heien M.L., Porreca F., Polt R., Sherman S.J., Falk T. The combination of the opioid glycopeptide MMP-2200 and a NMDA receptor antagonist reduced l-DOPA-induced dyskinesia and MMP-2200 by itself reduced dopamine receptor 2-like agonist-induced dyskinesia // *Neuropharmacology.* - 2018. - Vol.141. - P.260-271.
156. Forno L.S., Langston J.W., Rebert C.S., Irwin I. Selective nigral toxicity after systemic administration of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) in the squirrel monkey // *Brain Res.* - 1984. - Vol.292, N.2. - P.390–394.
157. Franklin. K.B.J., Paxinos G. The mouse brain in stereotaxic coordinates. - 2nd edition // *Academic press.* - 2001. - 350 p.
158. Gandhi S., Wood-Kaczmar A., Yao Z., Plun-Favreau H., Deas E., Klupsch K., Downward J., Latchman D.S., Tabrizi S.J., Wood Nw., Duchen M.R., Abramov A.Y. PINK1-associated Parkinson's disease is caused by neuronal vulnerability to calcium-induced cell death // *Mol Cell.* - 2009. - Vol.33, N.5. - P.627-638.
159. Gandhi S., Vaarmann A., Yao Z., Duchen M. R., Wood N. W., Abramov A. Y. Dopamine induced neurodegeneration in a PINK1 model of Parkinson's disease // *PloS one.* - 2012. – Vol.7, N.5. - P.e37564.
160. Gao H.M., Zhang F., Zhou H., Kam W., Wilson B., Hong J.S. Neuroinflammation and α -synuclein dysfunction potentiate each other, driving chronic progression of neurodegeneration in a mouse model of Parkinson's disease // *Environ Health Perspect.* - 2011. - Vol.119, N.6. - P.807-814.

161. Gardoni F., Boraso M., Zianni E., Corsini E., Galli C.L., Cattabeni F., Marinovich M., Di Luca M., Viviani B. Distribution of interleukin-1 receptor complex at the synaptic membrane driven by interleukin-1 β and NMDA stimulation // *J Neuroinflammation*. - 2011. - Vol.8, N.1. - P.14.
162. Gardoni F., Caputi A., Cimino M., Pastorino L., Cattabeni F., Di Luca M. Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II is associated with NR2A/B subunits of NMDA receptor in postsynaptic densities // *J Neurochem*. - 1998. - Vol. 71, N.4. - P.1733-1741.
163. Garretti F., Agalliu D., Lindestam Arlehamn C.S., Sette A., Sulzer D. Autoimmunity in Parkinson's Disease: The Role of α -Synuclein-Specific T Cells // *Front Immunol*. - 2019. - Vol.10. - P.303.
164. GBD 2015 Neurological Disorders Collaborator Group Global, regional, and national burden of neurological disorders during 1990-2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015 // *Lancet Neurol*. - 2017. - Vol.16, N.11. - P.877-897.
165. Gerhard A., Pavese N., Hotton G., Turkheimer F., Es M., Hammers A., Eggert K., Oertel W., Banati R.B., Brooks D.J. In vivo imaging of microglial activation with [11C](R)-PK11195 PET in idiopathic Parkinson's disease // *Neurobiol Dis*. - 2006. - Vol.21, N.2. - P.404-412.
166. German D.C., Manaye K.F., Sonsalla P.K., Brooks B.A. Midbrain dopaminergic cell loss in Parkinson's disease and MPTP-induced parkinsonism: sparing of calbindin-D28k-containing cells // *Ann N Y Acad Sci*. - 1992. - Vol.648. - P.42-62.
167. Ghatak S., Trudler D., Dolatabadi N., Ambasudhan R. Parkinson's disease: what the model systems have taught us so far // *J Genet*. - 2018. - Vol.97, N.3. - P.729-751.
168. Gibrat C., Saint-Pierre M., Bousquet M., Lévesque D., Rouillard C., Cicchetti F. Differences between subacute and chronic MPTP mice models: investigation of dopaminergic neuronal degeneration and alpha-synuclein inclusions // *J Neurochem*. - 2009. - Vol.109, N.5. - P.1469-1482.
169. Gillardon F., Schmid R., Draheim H. Parkinson's disease-linked leucine-rich repeat kinase 2(R1441G) mutation increases proinflammatory cytokine release from activated primary microglial cells and resultant neurotoxicity // *Neuroscience*. - 2012. - Vol.208. - P.41-48.
170. Goldberg M.P., Weiss J.H., Pham P.C., Choi D.W. N-methyl-D-aspartate receptors mediate hypoxic neuronal injury in cortical culture // *J Pharmacol Exp Ther*. - 1987. - Vol.243, N.2. - P.784-791.
171. Goldman S.M., Marek K., Ottman R., Meng C., Comyns K., Chan P., Ma J., Marras C., Langston J.W., Ross G.W., Tanner C.M. Concordance for Parkinson's disease in twins: A 20-year update // *Ann Neurol*. - 2019. - Vol.85, N.4. - P.600-605.
172. Goldstein D.S., Sullivan P., Holmes C., Miller G.W., Alter S., Strong R., Mash D.C., Kopin I.J., Sharabi Y. Determinants of buildup of the toxic dopamine metabolite DOPAL in Parkinson's disease // *Journal of neurochemistry*. - 2013. - Vol.126, N.5. - P.591-603.

173. Goswami P., Joshi N., Singh S. Neurodegenerative signaling factors and mechanisms in Parkinson's pathology // *Toxicol In Vitro*. - 2017. - Vol.43. - P.104-112.
174. Grace A.A., Bunney B.S. Intracellular and extracellular electrophysiology of nigral dopaminergic neurons--2. Action potential generating mechanisms and morphological correlates // *Neuroscience*. - 1983. - Vol.10, N.2. - P.317-331.
175. Grandi L.C., Di Giovanni G., Galati S. Animal models of early-stage Parkinson's disease and acute dopamine deficiency to study compensatory neurodegenerative mechanisms // *J Neurosci Methods*. - 2018. - Vol.308. - P.205-218.
176. Graves S.M., Xie Z., Stout K.A., Zampese E., Burbulla L.F., Shih J.C., Kondapalli J., Patriarchi T., Tian L., Brichta L., Greengard P., Krainc D., Schumacker P.T., Surmeier D.J. Dopamine metabolism by a monoamine oxidase mitochondrial shuttle activates the electron transport chain // *Nat Neurosci*. - 2020. - Vol.23, N.1. - P.15-20.
177. Greenamyre J.T., Eller R.V., Zhang Z., Ovadia A., Kurlan R., Gash D.M. Antiparkinsonian effects of remacemide hydrochloride, a glutamate antagonist, in rodent and primate models of Parkinson's disease // *Ann Neurol*. - 1994. - Vol.35, N.6. - P.655-661.
178. Grieb P., Świątkiewicz M., Prus K., Rejdak K. Amantadine for COVID-19 // *J Clin Pharmacol*. - 2021. - Vol.61, N.3. - P.412-413.
179. Grimsrud P.A., Xie, H., Griffin, T.J., Bernlohr, D.A Oxidative stress and covalent modification of protein with bioactive aldehydes // *J Biol Chem*. - 2008. - Vol.283, N.32. - P.21837-21841.
180. Gu X.L., Long C.X., Sun L., Xie C., Lin X., Cai H. Astrocytic expression of Parkinson's disease-related A53T alpha-synuclein causes neurodegeneration in mice // *Mol Brain*. - 2010. - Vol.3. - P.12.
181. Guido K., John C.R. Mitochondrial control of cell death // *Nat. Med*. - 2000. - Vol.6. - P.513–519.
182. Guo X., Han C., Ma K., Xia Y., Wan F., Yin S., Kou L., Sun Y., Wu J., Hu J., Huang J., Xiong N., Wang T. Hydralazine Protects Nigrostriatal Dopaminergic Neurons From MPP+ and MPTP Induced Neurotoxicity: Roles of Nrf2-ARE Signaling Pathway // *Front Neurol*. - 2019. - Vol.10. - P.271.
183. Gupta R.C., Kadel W.L. Methyl parathion acute toxicity: prophylaxis and therapy with memantine and atropine // *Arch Int Pharmacodyn Ther*. - 1990. - Vol.305. - P.208-221.
184. Halliday G.M., Blumbergs P.C., Cotton R.G., Blessing W.W., Geffen L.B. Loss of brain stem serotonin- and substance P-containing neurons in Parkinson's disease // *Brain Res.* - 1990. - Vol.510. - P.104-107.
185. Hardingham G.E., Bading H. Synaptic versus extrasynaptic NMDA receptor signalling: implications for neurodegenerative disorders // *Nat Rev Neurosci*. - 2010. - Vol.11, N.10. - P.682-696.

186. Hashimoto M., Hsu L.J., Xia Y., Takeda A., Sisk A., Sundsmo M., Masliah E. Oxidative stress induces amyloid-like aggregate formation of NACP/ α -synuclein in vitro // *Neuroreport*. - 1999. - Vol.10. - P.717-721.
187. Hassani O. K., Mouroux M., Féger J. Increased subthalamic neuronal activity after nigral dopaminergic lesion independent of disinhibition via the globus pallidus // *Neuroscience*. - 1996. - Vol.72. - P.105–115.
188. Hayashi T. A physiological study of epileptic seizures following cortical stimulation in animals and its application to human clinics // *The Japanese journal of physiology*. - 1952. - Vol.3. - P. 46-64.
189. He Y., Appel S., Le W. Minocycline inhibits microglial activation and protects nigral cells after 6-hydroxydopamine injection into mouse striatum // *Brain Res*. - 2001. - Vol.909, N.1-2. - P.187-193.
190. Henneberry R.C., Novelli A., Cox J.A., Lysko P.G. Neurotoxicity at the N-methyl-D-aspartate receptor in energy-compromised neurons. An hypothesis for cell death in aging and disease // *Ann N Y Acad Sci*. - 1989. - Vol.568. - P.225-233.
191. Hickenbottom S.L., Grotta J. Neuroprotective therapy // *Semin Neurol*. - 1998. - Vol.18, N.4. - P.485-492.
192. Higley M.J., Sabatini B.L. Competitive regulation of synaptic Ca^{2+} influx by D2 dopamine and A2A adenosine receptors // *Nat Neurosci*. - 2010. - Vol.13, N.8. - P.958-966.
193. Hirsch E. C., Standaert D.G. Ten Unsolved Questions About Neuroinflammation in Parkinson's Disease // *Mov Disord*. - 2021. - Vol.36, N.1. - P.16-24.
194. Hoeijmakers L., Heinen Y., van Dam A.M., Lucassen P.J., Korosi A. Microglial Priming and Alzheimer's Disease: A Possible Role for (Early) Immune Challenges and Epigenetics? // *Front Hum Neurosci*. - 2016. - Vol.10. - P.398.
195. Hollmann M., Hartley M., Heinemann S. Ca^{2+} permeability of KA-AMPA-gated glutamate receptor channels depends on subunit composition // *Science*. - 1991. - Vol.252, N.5007. - P.851-853.
196. Hollmann M., O'Shea-Greenfield A., Rogers S. W., Heinemann S. Cloning by functional expression of a member of the glutamate receptorfamily // *Nature (Lond.)*. - 1989. - Vol.342. - P.643–648.
197. Holmer H.K., Keyghobadi M., Moore C., Meshul C.K. 1-dopa-induced reversal in striatal glutamate following partial depletion of nigrostriatal dopamine with 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine // *Neuroscience*. - 2005. - Vol.136, N.1. - P.333-341.
198. Homayoun H., Stefani M.R., Adams B.W., Tamagan G.D., Moghaddam B. Functional Interaction Between NMDA and mGlu5 Receptors: Effects on Working Memory, Instrumental Learning, Motor Behaviors, and Dopamine Release // *Neuropsychopharmacology*. - 2004. - Vol.29, N.7. - P.1259-1269.
199. Homayoun H., Moghaddam B. NMDA receptor hypofunction produces opposite effects on prefrontal cortex interneurons and pyramidal neurons // *J Neurosci*. - 2007. - Vol.27, N.43. - P.11496-11500.

200. Honegger U.E., Quack G., Wiesmann U.N. Evidence for lysosomotropism of memantine in cultured human cells: cellular kinetics and effects of memantine on phospholipid content and composition, membrane fluidity and beta-adrenergic transmission // *Pharmacol Toxicol.* - 1993. - Vol.73, N.4. - P.202-208.
201. Hsu L.J., Sagara Y., Arroyo A., Rockenstein E., Sisk A., Mallory M., Wong J., Takenouchi T., Hashimoto M., Masliah E. Alpha-synuclein promotes mitochondrial deficit and oxidative stress // *Am J Pathol.* - 2000. - Vol.157, N.2. - P.401-410.
202. Hüls S., Högen T., Vassallo N., Danzer K.M., Hengerer B., Giese A., Herms J. AMPA-receptor-mediated excitatory synaptic transmission is enhanced by iron-induced α -synuclein oligomers // *J Neurochem.* - 2011. - Vol.117, N.5. – P.868-878.
203. Hutchison W.D., Dostrovsky J.O., Walters J.R., Courtemanche R., Boraud T., Goldberg J., Brown P. Neuronal oscillations in the basal ganglia and movement disorders: evidence from whole animal and human recordings // *Journal of Neuroscienc.* - 2004. - Vol. 24, N.42. - P.9240-9243.
204. Hutchison W.D., Allan R.J., Opitz H., Levy R., Dostrovsky J.O., Lang A.E., Lozano A.M. Neurophysiological identification of the subthalamic nucleus in surgery for Parkinson's disease // *Ann Neurol.* - 1998. - Vol.44, N.4. - P.622-628.
205. Ilijic E., Guzman J.N., Surmeier D.J. The L-type channel antagonist isradipine is neuroprotective in a mouse model of Parkinson's disease // *Neurobiol Dis.* - 2011. - Vol.43, N.2. - P.364-371.
206. Ivanova E. A., Kapitsa I. G., Nepoklonov A. V., Kokshenev I. I., Val'dman E. A., Voronina T. A. Anti-inflammatory activity of hemantane on peripheral inflammation and lipopolysaccharideinduced neuro-inflammation models // *Pharmaceutical Chemistry Journal.* - 2014. - Vol. 47, N.10. - P.517-520.
207. Jackson-Lewis V., Jakowec M., Burke R.E., Przedborski S. Time course and morphology of dopaminergic neuronal death caused by the neurotoxin 1-methyl-4-phenyl-1, 2,3,6-tetrahydropyridine // *Neurodegeneration.* - 1995. - Vol.4, N.3. - P.0–269.
208. Javitch J.A., D'Amato R.J., Strittmatter S.M., Snyder S.H. Parkinsonism-inducing neurotoxin, N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6 -tetrahydropyridine: uptake of the metabolite N-methyl-4-phenylpyridine by dopamine neurons explains selective toxicity // *Proc Natl Acad Sci U S A.* - 1985. - Vol.82, N.7. - P.2173-2177.
209. Jiang P.E., Lang Q.H., Yu Q.Y., Tang X.Y., Liu Q.Q., Li X.Y., Feng X.Z. Behavioral Assessments of Spontaneous Locomotion in a Murine MPTP-induced Parkinson's Disease Model // *J Vis Exp.* - 2019. - P.143.
210. Johnson J., Jr Pajarillo E., Karki P., Kim J., Son D.S., Aschner M., Lee E. Valproic acid attenuates manganese-induced reduction in expression of GLT-1 and GLAST with concomitant changes in murine dopaminergic neurotoxicity // *Neurotoxicology.* - 2018. - Vol.67. - P.112-120.
211. Johnson K.A., Conn P.J., Niswender C.M. Glutamate receptors as therapeutic targets for Parkinson's disease // *CNS Neurol Disord Drug Targets.* - 2009. - Vol.8, N.6. - P.475-491.
212. Kalia L.V., Kalia S. K., Salter M. W. NMDA receptors in clinical neurology: excitatory times ahead // *Lancet Neurology.* - 2008. - Vol.7, N.8. - P.742–755.

213. Kennedy M.B. Signal-processing machines at the postsynaptic density // *Science*. - 2000. - Vol.290, N.5492. - P.750-754.
214. Khodorov B.I. Glutamate-induced deregulation of calcium homeostasis and mitochondrial dysfunction in mammalian central neurones // *Prog Biophys Mol Biol*. - 2004. - Vol.86, N.2. - P.279-351.
215. Kim A., Nigmatullina R., Zalyalova Z., Soshnikova N., Krasnov A., Vorobyeva N., Georgieva S., Kudrin V., Narkevich V., Ugrumov M. Upgraded Methodology for the Development of Early Diagnosis of Parkinson's Disease Based on Searching Blood Markers in Patients and Experimental Models // *Mol Neurobiol*. - 2019. - Vol.56, N.5. - P.3437-3450.
216. Kishioka A., Fukushima F., Ito T., Kataoka H., Mori H., Ikeda T., Itohara S., Sakimura K., Mishina M. A novel form of memory for auditory fear conditioning at a low-intensity unconditioned stimulus // *PLoS One*. - 2009. - Vol.4, N.1. - P.e4157.
217. Kissinger P.T., Bruntlett C.S., Shoup R.E. Neurochemical applications of liquid chromatography with electrochemical detection // *Life Sci*. - 1981. - Vol.28, N.5. - P.455-465.
218. Kohutnicka M., Lewandowska E., Kurkowska-Jastrzebska I., Członkowski A., Członkowska A. Microglial and astrocytic involvement in a murine model of Parkinson's disease induced by 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) // *Immunopharmacology*. - 1998. - Vol.39, N.3. - P.167-180.
219. Kornhuber J., Weller M., Schoppmeyer K., Riederer P. Amantadine and memantine are NMDA receptor antagonists with neuroprotective properties // *J Neural Transm Suppl*. - 1994. - Vol.43. - P.91-104.
220. Koroshetz W.J., Moskowitz M.A. Emerging treatments for stroke in humans // *Trends Pharmacol Sci*. - 1996. - Vol.17, N.6. - P.227-233.
221. Kreutzwiser D., Tawfic Q. A. Expanding Role of NMDA Receptor Antagonists in the Management of Pain // *CNS Drugs*. - 2019. - Vol.33, N.4. - P.347-374.
222. Krols M., van Isterdael G., Asselbergh B., Kremer A., Lippens S., Timmerman V., Janssens S. Mitochondria-associated membranes as hubs for neurodegeneration // *Acta Neuropathol*. - 2016. - Vol.131, N.4. - P.505-523.
223. Kumar M.J., Andersen J.K. Perspectives on MAO-B in aging and neurological disease: where do we go from here? // *Mol Neurobiol*. - 2004. - Vol.30, N.1. - P.77-89.
224. Kurkowska-Jastrzebska I., Bałkowiec-Iskra E., Ciesielska A., Joniec I., Cudna A., Zaremba M.M., Członkowski A., Członkowska A. Decreased inflammation and augmented expression of trophic factors correlate with MOG-induced neuroprotection of the injured nigrostriatal system in the murine MPTP model of Parkinson's disease // *Int Immunopharmacol*. - 2009. - Vol.9, N.6. - P.781-791.
225. Kussmaul L., Hirst J. The mechanism of superoxide production by NADH: ubiquinone oxidoreductase (complex I) from bovine heart mitochondria // *Proc Natl Acad Sci U S A*. - 2006. - Vol.103, N.20. - P.7607-7612.
226. Laloux C., Derambure P., Kreisler A., Houdayer E., Bruezière S., Bordet R., Destée A., Monaca C. MPTP-treated mice: long-lasting loss of nigral TH-ir neurons

- but not paradoxical sleep alterations // *Exp Brain Res.* - 2008. - Vol.186, N.4. - P.635-642.
227. Lam A.K., Galione A. The endoplasmic reticulum and junctional membrane communication during calcium signaling // *Biochim Biophys Acta.* - 2013. - Vol.1833, N.11. - P.2542-2559.
 228. Lam H.-M., Chiu J., Hsieh M.-H., Meisel L., Oliveira I.C., Shin M., Coruzzi G. Glutamate-receptor genes in plants // *Nature (Lond.).* - 1998. - Vol.396, N.6707. - P.125–126.
 229. Lan J., Jiang D.H. Desferrioxamine and vitamin E protect against iron and MPTP-induced neurodegeneration in mice // *J Neural Transm (Vienna).* - 1997. - Vol.104, N.4-5. - P.469-481.
 230. Langston J.W., Forno L.S., Rebert C.S., Irwin I. Selective nigral toxicity after systemic administration of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) in the squirrel monkey // *Brain Res.* - 1984. - Vol.292, N.2. - P.390–394.
 231. Lavoie B., Parent A. Dopaminergic neurons expressing calbindin in normal and parkinsonian monkeys // *Neuroreport.* - 1991. - Vol.2, N.10. - P.601-604.
 232. Lazarewicz J.W., Wroblewski J.T., Costa E. N-methyl-D-aspartate-sensitive glutamate receptors induce calcium-mediated arachidonic acid release in primary cultures of cerebellar granule cells // *J Neurochem.* - 1990. - Vol.55, N.6. - P.1875-1881.
 233. Lecker S.H., Goldberg A.L., Mitch W.E. Protein degradation by the ubiquitin-proteasome pathway in normal and disease states // *Journal of the American Society of Nephrology: JASN.* - 2006. - Vol.17, N.7. - P.1807–1819.
 234. Lee V.M., Balin B.J., Otvos L. Jr., Trojanowski J.Q. A68: a major subunit of paired helical filaments and derivatized forms of normal Tau // *Science.* - 1991. - Vol. 251, N.4994. - P.675-678.
 235. Lewerenz J., Maher P. Chronic glutamate toxicity in neurodegenerative diseases—what is the evidence? // *Frontiers in neuroscience.* - 2015. - Vol.9. - P.469.
 236. Liberatore G.T., Jackson-Lewis V., Vukosavic S., Mandir A.S., Vila M., McAuliffe W.G., Dawson V.L., Dawson T.M., Przedborski S. Inducible nitric oxide synthase stimulates dopaminergic neurodegeneration in the MPTP model of Parkinson disease // *Nat Med.* - 1999. - Vol.5, N.12. - P.1403-1409.
 237. Linder J.C., Klemfuss H., Groves P.M. Acute ultrastructural and behavioral effects of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) in mice // *Neurosci Lett.* - 1987. - Vol.82, N.2. - P.221–226.
 238. Lipscombe D., Helton T.D., Xu W. L-type calcium channels: the low down // *J Neurophysiol.* - 2004. - Vol. 92, N.5. - P.2633-2641.
 239. Lipton S.A., Rosenberg P.A. Excitatory amino acids as a final common pathway for neurologic disorders // *N Engl J Med.* - 1994. - Vol.330, N.9. - P.613-622.
 240. Lipton S.A. Paradigm shift in neuroprotection by NMDA receptor blockade: memantine and beyond // *Nat Rev Drug Discov.* - 2006. - Vol.5, N.2. - P.160-170.

241. Lipton S.A. Pathologically-activated therapeutics for neuroprotection: mechanism of NMDA receptor block by memantine and S-nitrosylation // *Curr Drug Targets*. - 2007. - Vol.8, N.5. - P.621-632.
242. Liu J., Huang D., Xu J., Tong J., Wang Z., Huang L., Yang Y., Bai X., Wang P., Suo H., Ma Y., Yu M., Fei J., Huang F. Tiagabine Protects Dopaminergic Neurons against Neurotoxins by Inhibiting Microglial Activation // *Sci Rep*. - 2015. - Vol.5. - P.15720.
243. Lotharius J., Brundin P. Pathogenesis of Parkinson's disease: dopamine, vesicles and alpha-synuclein // *Nat Rev Neurosci*. - 2002. - Vol.3, N.12. - P.932-942.
244. Lucas D.R., Newhouse J.P. The toxic effect of sodium L-glutamate on the inner layers of the retina // *Arch Ophthalmol*. - 1957. - Vol.58, N.2. - P.193-201.
245. Ludtmann M.H.R., Abramov A.Y. Mitochondrial calcium imbalance in Parkinson's disease // *Neurosci Lett*. - 2018. - Vol.663. - P.86-90.
246. Lustig H.S., Ahern K.V., Greenberg D.A. Antiparkinsonian drugs and in vitro excitotoxicity // *Brain Res*. - 1992. - Vol.597, N.1. - P.148-150.
247. Lutsep H.L., Clark W.M. Neuroprotection in acute ischaemic stroke. Current status and future potential // *Drugs R D*. - 1999. - Vol.1, N.1. - P.3-8.
248. Maeng S., Zarate C.A.Jr., Du J., Schloesser R.J., McCammon J., Chen G., Manji H.K. Cellular mechanisms underlying the antidepressant effects of ketamine: role of alpha-amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic acid receptors // *Biol Psychiatry*. - 2008. - Vol.63, N.4. - P.349-352.
249. Majláth Z., Vécsei L. NMDA antagonists as Parkinson's disease therapy: disseminating the evidence // *Neurodegener Dis Manag*. - 2014. - Vol.4, N.1. - P.23-30.
250. Mallajosyula J.K., Kaur D., Chinta S.J., Rajagopalan S., Rane A., Nicholls D.G., Di Monte D.A., Macarthur H., Andersen J.K. MAO-B elevation in mouse brain astrocytes results in Parkinson's pathology // *PLoS One*. - 2008. - Vol.3, N.2. - P.e1616.
251. Martí Y., Matthaeus F., Lau T., Schloss P. Methyl-4-phenylpyridinium (MPP+) differentially affects monoamine release and re-uptake in murine embryonic stem cell-derived dopaminergic and serotonergic neurons // *Mol Cell Neurosci*. - 2017. - Vol.83. - P.37-45.
252. Martin L.J., Pan Y., Price A.C., Sterling W., Copeland N.G., Jenkins N.A., Price D.L., Lee M.K. Parkinson's disease alpha-synuclein transgenic mice develop neuronal mitochondrial degeneration and cell death // *J Neurosci*. - 2006. - Vol.26, N.1. - P.41-50.
253. Matteo D.V., Benigno A., Pierucci M., Giuliano D.A., Crescimanno G., Esposito E., Di Giovanni G. 7-nitroindazole protects striatal dopaminergic neurons against MPP+-induced degeneration: an in vivo microdialysis study // *Ann N Y Acad Sci*. - 2006. - Vol.1089. - P.462-471.
254. McCoy M.K., Ruhn K.A., Martinez T.N., McAlpine F.E., Blesch A., Tansey M.G. Intranigral lentiviral delivery of dominant-negative TNF attenuates neurodegeneration and behavioral deficits in hemiparkinsonian rats // *Mol Ther*. - 2008. - Vol.16, N.9. - P.1572-1579.

255. McGeer P.L., Itagaki S., Boyes B.E., McGeer E.G. Reactive microglia are positive for HLA-DR in the substantia nigra of Parkinson's and Alzheimer's disease brains // *Neurology*. - 1988. - Vol.38, N.8. - P.1285-1291.
256. Meiser J., Weindl D., Hiller K. Complexity of dopamine metabolism // *Cell Commun Signal*. - 2013. - Vol.11, N.1. - P.34.
257. Meldrum B.S. The glutamate synapse as a therapeutical target: perspectives for the future // *Prog Brain Res*. - 1998. - Vol.116. - P.441-458.
258. Melki R. Role of Different Alpha-Synuclein Strains in Synucleinopathies, Similarities with other Neurodegenerative Diseases // *J Parkinsons Dis*. - 2015. - Vol.5, N.2. - P.217-227.
259. Melo-Thomas L., Gil-Martínez A.L., Cuenca L., Estrada C., Gonzalez-Cuello A., Schwarting R.K., Herrero M.T. Electrical stimulation or MK-801 in the inferior colliculus improve motor deficits in MPTP-treated mice // *Neurotoxicology*. - 2018. - Vol.65. - P.38-43.
260. Meredith G.E., Totterdell S., Beales M., Meshul C.K. Impaired glutamate homeostasis and programmed cell death in a chronic MPTP mouse model of Parkinson's disease // *Exp Neurol*. - 2009. - Vol.219, N.1. - P.334-340.
261. Mitsumoto Y., Watanabe A., Mori A., Koga N. Spontaneous regeneration of nigrostriatal dopaminergic neurons in MPTP-treated C57BL/6 mice // *Biochemchem Biophys Res Commun*. - 1998. - Vol.248. - P.660—663.
262. Mochizuki H., Choong C.J., Baba K. Parkinson's disease and iron // *J Neural Transm (Vienna)*. - 2020. - Vol.27, N.2. - P.181-187.
263. Monzani E., Nicolis S., Dell'Acqua S., Capucciati A., Bacchella C., Zucca F.A., Mosharov E.V., Sulzer D., Zecca L., Casella L. Dopamine, Oxidative Stress and Protein-Quinone Modifications in Parkinson's and Other Neurodegenerative Diseases // *Angew Chem Int Ed Engl*. - 2019. - Vol.58, N.20. - P.6512-6527.
264. Morales I., Rodriguez M. Self-induced accumulation of glutamate in striatal astrocytes and basal ganglia excitotoxicity // *Glia*. - 2012. - Vol.60, N.10. - P.1481-1494.
265. Moser A., Scholz J., Nobbe F., Vieregge P., Böhme V., Bamberg H.. Presence of N-methyl-norsalsolinol in the CSF: correlations with dopamine metabolites of patients with Parkinson's disease // *J Neurol Sci*. - 1995. - Vol.131, N.2. - P.183-189.
266. Nagatsu T., Mogi M., Ichinose H., Togari A. Changes in cytokines and neurotrophins in Parkinson's disease // *J Neural Transm Suppl*. - 2000. - Vol.60. - P.277-290.
267. Nagatsu T., Sawada M. Molecular mechanism of the relation of monoamine oxidase B and its inhibitors to Parkinson's disease: possible implications of glial cells // *J Neural Transm Suppl*. - 2006. - Vol.71. - P.53-65.
268. Nakabeppu Y., Tsuchimoto D., Yamaguchi H., Sakumi K. Oxidative damage in nucleic acids and Parkinson's disease // *J Neurosci Res*. - 2007. - Vol.85, N.5. - P.919-934.
269. Nakazawa K., Sapkota K. The origin of NMDA receptor hypofunction in schizophrenia // *Pharmacol Ther*. - 2020. - Vol.205. - P.107426.

270. Nash J.E., Fox S.H., Henry B., Hill M.P., Peggs D., McGuire S., Maneuf Y., Hille C., Brotchie J.M., Crossman A.R. Antiparkinsonian actions of ifenprodil in the MPTP-lesioned marmoset model of Parkinson's disease // *Exp Neurol.* - 2000. - Vol.165, N.1. - P.136-142.
271. Neufeld M.Y., Inzelberg R., Korczyn A.D. EEG in demented and non-demented parkinsonian patients // *Acta Neurol Scand.* - 1988. - Vol. 78, N.1. - P.1-5.
272. Nicholls D.G., Budd S.L. Mitochondria and neuronal survival // *Physiol Rev.* - 2000. - Vol.80, N.1. - P.315-360.
273. Nicoletti A., Fagone P., Donzuso G., Mangano K., Dibilio V., Caponnetto S., Bendtzen K., Zappia M., Nicoletti F. Parkinson's disease is associated with increased serum levels of macrophage migration inhibitory factor // *Cytokine.* - 2011. - Vol.55, N.2. - P.165-167.
274. Nirenberg M.J., Vaughan R.A., Uhl G.R., Kuhar M.J., Pickel V.M. The dopamine transporter is localized to dendritic and axonal plasma membranes of nigrostriatal dopaminergic neurons // *J Neurosci.* - 1996. - Vol.16, N.2. - P. 436-447.
275. Nourooz-Zadeh J., Liu E.H., Yhlen B., Anggård E.E., Halliwell B. F4-isoprostanes as specific marker of docosahexaenoic acid peroxidation in Alzheimer's disease // *J Neurochem.* - 1999. - Vol.72, N.2. - P.734-740.
276. Oh J.D., Vaughan C.L., Chase T.N. Effect of dopamine denervation and dopamine agonist administration on serine phosphorylation of striatal NMDA receptor subunits // *Brain Res.* - 1999. - Vol.821, N.2. - P.433-442.
277. Olivares D., Deshpande V.K., Shi Y., Lahiri D.K., Greig N.H., Rogers J.T., Huang X. N-methyl D-aspartate (NMDA) receptor antagonists and memantine treatment for Alzheimer's disease, vascular dementia and Parkinson's disease // *Curr Alzheimer Res.* - 2012. - Vol.9, N.6. - P.746-758.
278. Olney J.W. Brain lesions, obesity, and other disturbances in mice treated with monosodium glutamate // *Science.* - 1969. - Vol.164, N.3880. - P.719-721.
279. Olson P.A., Tkatch T., Hernandez-Lopez S., Ulrich S., Ilijic E., Mugnaini E., Zhang H., Bezprozvanny I., Surmeier D.J. G-protein-coupled receptor modulation of striatal CaV1.3 L-type Ca²⁺ channels is dependent on a Shank-binding domain // *J Neurosci.* - 2005. - Vol.25, N.5. - P.1050-1062
280. Ossola B., Schendzielorz N., Chen S.H., Bird G.S., Tuominen R.K., Männistö P.T., Hong J.S. Amantadine protects dopamine neurons by a dual action: reducing activation of microglia and inducing expression of GDNF in astroglia [corrected] // *Neuropharmacology.* - 2011. - Vol.61, N.4. - P.574-582.
281. Otton H.J., Lawson McLean A., Pannozzo M.A., Davies C.H., Wyllie D.J. Quantification of the Mg²⁺-induced potency shift of amantadine and memantine voltage-dependent block in human recombinant GluN1/GluN2A NMDARs // *Neuropharmacology.* - 2011. - Vol.60, N.2-3. - P.388-396.
282. Pacelli C., Giguère N., Bourque M.J., Lévesque M., Slack R.S., Trudeau L.É. Elevated Mitochondrial Bioenergetics and Axonal Arborization Size Are Key Contributors to the Vulnerability of Dopamine Neurons // *Curr Biol.* - 2015. - Vol.25, N.18. - P.2349-2360.

283. Paillusson S., Gomez-Suaga P., Stoica R., Little D., Gissen P., Devine M. J., Miller C. C. J. α -Synuclein binds to the ER-mitochondria tethering protein VAPB to disrupt Ca^{2+} homeostasis and mitochondrial ATP production // *Acta Neuropathologic.* - 2017. - Vol.134, N.1. - P.129-149.
284. Pajares M., I Rojo A., Manda G., Boscá L., Cuadrado A. Inflammation in Parkinson's Disease: Mechanisms and Therapeutic Implications. [Журнал] // *Cells.* - 2020. - Vol.9, N.7. - P.1687.
285. Paquet M., Tremblay M., Soghomonian J.J., Smith Y. AMPA and NMDA glutamate receptor subunits in midbrain dopaminergic neurons in the squirrel monkey: an immunohistochemical and in situ hybridization study // *J Neurosci.* - 1997. - Vol.17, N.4. - P.1377-1396.
286. Parsons C.G., Gilling K. Memantine as an example of a fast, voltage-dependent, open channel N-methyl-D-aspartate receptor blocker // *Methods Mol Biol.* - 2007. - Vol.403. - P.15-36.
287. Pereira J.R., Santos L.V.D., Santos R.M.S., Campos A.L.F., Pimenta A.L., de Oliveira M.S., Bacheti G.G., Rocha N.P., Teixeira A.L., Christo P.P., Scalzo P.L. IL-6 serum levels are elevated in Parkinson's disease patients with fatigue compared to patients without fatigue // *J Neurol Sci.* - 2016. - Vol.370. - P.153-156.
288. Perier C., Vila M. Mitochondrial biology and Parkinson's disease // *Cold Spring Harb Perspect Med.* - 2012. - Vol.2, N.2. - P.a009332.
289. Perry V.H., Holmes C. Microglial priming in neurodegenerative disease // *Nat Rev Neurol.* - 2014. - Vol.10, N.4. - P.217-224.
290. Petroske E., Meredith G.E., Callen S., Totterdell S., Lau Y.S. Mouse model of Parkinsonism: a comparison between subacute MPTP and chronic MPTP/probenecid treatment // *Neuroscience.* - 2001. - Vol.106, N.3. - P.589-601.
291. Phani S., Loike J. D., Przedborski S. Neurodegeneration and inflammation in Parkinson's disease // *Parkinsonism Relat Disord.* - 2012. - Vol.1. - P.S207-209.
292. Picconi B., Piccoli G., Calabresi P. Synaptic dysfunction in Parkinson's disease // *Adv Exp Med Biol.* - 2012. - Vol.970. - P.553-572.
293. Pissadaki E.K., Bolam J.P. The energy cost of action potential propagation in dopamine neurons: clues to susceptibility in Parkinson's disease // *Front Comput Neurosci.* - 2013. - Vol.7. - P.13.
294. Pochwat B., Nowak G., Szewczyk B. An update on NMDA antagonists in depression. // *Expert Rev Neurother.* - 2019. - Vol.19, N.11. - P.1055-1067.
295. Princiotta M.F., Finzi D., Qian S.B., Gibbs J., Schuchmann S., Buttgeriet F., Bennink J.R., Yewdell J.W. Quantitating protein synthesis, degradation, and endogenous antigen processing // *Immunity.* - 2003. - Vol.18, N.3. - P.343-354.
296. Przedborski S., Levivier M. Nouvelles approches thérapeutiques dans la maladie de Parkinson [Current therapeutic approach in Parkinson disease] // *Rev Med Brux.* - 1992. - Vol.13, N.10. - P.360-366.
297. Puopolo M., Raviola E., Bean B.P. Roles of subthreshold calcium current and sodium current in spontaneous firing of mouse midbrain dopamine neurons // *J Neurosci.* - 2007. - Vol. 27, N.3. - P. 645-656.

298. Puspita L., Chung S.Y., Shim J.W. Oxidative stress and cellular pathologies in Parkinson's disease // *Mol Brain*. - 2017. - Vol.10, N.1. - P.53.
299. Putzier I., Kullmann P.H., Horn J.P., Levitan E.S. Cav1.3 channel voltage dependence, not Ca²⁺ selectivity, drives pacemaker activity and amplifies bursts in nigral dopamine neurons // *J Neurosci*. - 2009. - Vol.29, N.49. - P.15414-15419.
300. Qin X.Y., Zhang S.P., Cao C., Loh Y.P., Cheng Y. Aberrations in Peripheral Inflammatory Cytokine Levels in Parkinson Disease: A Systematic Review and Meta-analysis // *JAMA Neurol*. - 2016. - Vol.73, N.11. - P.1316-1324.
301. Rabey J.M., Nissipeanu P., Korczyn A.D. Efficacy of memantine, an NMDA receptor antagonist, in the treatment of Parkinson's disease // *J Neural Transm Park Dis Dement Sect*. - 1992. - Vol.4. - P.277-282.
302. Ramlackhansingh A.F., Brooks D.J., Greenwood R.J., Bose S.K., Turkheimer F.E., Kinnunen K.M., Gentleman S., Heckemann R.A., Gunanayagam K., Gelosa G., Sharp D.J. Inflammation after trauma: microglial activation and traumatic brain injury // *Ann Neurol*. - 2011. - Vol.70, N.3. - P.374-383.
303. Ramsay R.R., Dadgar J., Trevor A., Singer T.P. Energy-driven uptake of N-methyl-4-phenylpyridine by brain mitochondria mediates the neurotoxicity of MPTP // *Life Sci*. - 1986. - Vol.39, N.7. - P.581-588.
304. Ramsay R.R., Krueger M.J., Youngster S.K., Gluck M.R., Casida J.E., Singer T.P. Interaction of 1-methyl-4-phenylpyridinium ion (MPP⁺) and its analogs with the rotenone/piericidin binding site of NADH dehydrogenase // *J Neurochem*. - 1991. - Vol.56, N.4. - P.1184-1190.
305. Ramsay R.R., Salach J.I., Singer T.P. Uptake of the neurotoxin 1-methyl-4-phenylpyridine (MPP⁺) by mitochondria and its relation to the inhibition of the mitochondrial oxidation of NAD⁺-linked substrates by MPP⁺ // *Biochem Biophys Res Commun*. - 1986. - Vol.134, N.2. - P.743-788.
306. Reeve A., Simcox E., Turnbull D. Ageing and Parkinson's disease: why is advancing age the biggest risk factor? // *Ageing Res Rev*. - 2014 г. - Vol.14, N.100. - P.19-30.
307. Rego A.C., Oliveira C.R. Mitochondrial dysfunction and reactive oxygen species in excitotoxicity and apoptosis: implications for the pathogenesis of neurodegenerative diseases // *Neurochem Res*. - 2003. - Vol.8, N.10. - P.1563-1574.
308. Rejdak K., Grieb P. Adamantanes might be protective from COVID-19 in patients with neurological diseases: multiple sclerosis, parkinsonism and cognitive impairment // *Mult Scler Relat Disord*. - 2020. - Vol.42. - P.102163.
309. Reyes S., Fu Y., Double K., Thompson L., Kirik D., Paxinos G., Halliday G.M. GIRK2 expression in dopamine neurons of the substantia nigra and ventral tegmental area // *J Comp Neurol*. - 2012. - Vol.520, N.12. - P.2591-2607.
310. Richardson J.R., Quan Y., Sherer T.B., Greenamyre J.T., Miller G.W. Paraquat neurotoxicity is distinct from that of MPTP and rotenone // *Toxicol Sci*. - 2005. - Vol.88, N.1. - P.193-201.
311. Roberts P. J., Davies S. W. Excitatory receptors and their role in excitotoxicity // *Biochemical Society Transactions*. - 1987. - Vol.15, N.2. - P.218–219.

312. Robinson D.M., Keating G.M. Memantine: a review of its use in Alzheimer's disease // *Drugs*. - 2006. - Vol.66, N.11. - P.1515-1534.
313. Rodrigues R.W., Gomide V.C., Chadi G. Astroglial and microglial reaction after a partial nigrostriatal degeneration induced by the striatal injection of different doses of 6-hydroxydopamine // *Int J Neurosci*. - 2001. - Vol.109, N.1-2. - P.91-126.
314. Rodríguez-Cruz A., Romo-Mancillas A., Mendiola-Precoma J., Escobar-Cabrera J.E., García-Alcocer G., Berumen L.C. Effect of valerenic acid on neuroinflammation in a MPTP-induced mouse model of Parkinson's disease // *IBRO Rep*. - 2019. - Vol.8. - P.28-35.
315. Romo R., Schultz W. Dopamine neurons of the monkey midbrain: contingencies of responses to active touch during self-initiated arm movements // *J Neurophysiol*. - 1990. - Vol. 63, N.3. - P.592-606.
316. Rosales M.G., Flores G., Hernández S., Martínez-Fong D., Aceves J. Activation of subthalamic neurons produces NMDA receptor-mediated dendritic dopamine release in substantia nigra pars reticulata: a microdialysis study in the rat // *Brain Res*. - 1994. - Vol.645, N.1-2. - P.335-337.
317. Rothstein J.D., Dykes-Hoberg M., Pardo C.A., Bristol L.A., Jin L., Kuncl R.W., Kanai Y., Hediger M.A., Wang Y., Schielke J.P., Welty D.F. Knockout of glutamate transporters reveals a major role for astroglial transport in excitotoxicity and clearance of glutamate // *Neuron*. - 1996. - Vol.16. - P.675-686.
318. Rubio-Osornio M., Orozco-Ibarra M., Díaz-Ruiz A., Brambila E., Boll M.C., Monroy-Noyola A., Guevara J., Montes S., Ríos C. Copper sulfate pretreatment prevents mitochondrial electron transport chain damage and apoptosis against MPP⁺-induced neurotoxicity. *Chem Bio // Chem Biol Interact*. - 2017. - Vol. 271. - P.1-8.
319. Ruszkiewicz J., Albrecht J. Changes in the mitochondrial antioxidant systems in neurodegenerative diseases and acute brain disorders // *Neurochem Int*. - 2015. - Vol. 88. - P.66-72.
320. Rytik P.G., Eremin V.F., Kvacheva Z.B., Poleschuk N.N., Popov S.A., Schröder H.C., Bachmann M., Weiler B.E., Müller W.E. Susceptibility of primary human glial fibrillary acidic protein-positive brain cells to human immunodeficiency virus infection in vitro: anti-HIV activity of memantine // *AIDS Res Hum Retroviruses*. - 1991. - Vol.7, N.1. - P.89-95.
321. Salamon A., Zádori D., Szpisjak L., Klivényi P., Vécsei L. Neuroprotection in Parkinson's disease: facts and hopes // *J Neural Transm (Vienna)*. - 2020. - Vol.127, N.5. - P.821-829.
322. Sanders L.H., McCoy J., Hu X., Mastroberardino P.G., Dickinson B.C., Chang C.J., Chu C.T., Van Houten B., Greenamyre J.T. Mitochondrial DNA damage: molecular marker of vulnerable nigral neurons in Parkinson's disease // *Neurobiol Dis*. - 2014. - Vol.70. - P.214-223.
323. Sarafian T.A., Littlejohn K., Yuan S., Fernandez C., Cilluffo M., Koo B.K., Whitelegge J.P., Watson J.B. Stimulation of synaptoneurosome glutamate release by monomeric and fibrillated α -synuclein // *J Neurosci Res*. - 2017. - Vol.95, N.9. - P.1871-1887.

324. Sattler R., Charlton M.P., Hafner M., Tymianski M. Distinct influx pathways, not calcium load, determine neuronal vulnerability to calcium neurotoxicity // *J Neurochem.* - 1998. – Vol.71, N.6. – P.2349-2364.
325. Sayre L.M., Wang F., Hoppel C.L. Tetraphenylborate potentiates the respiratory inhibition by the dopaminergic neurotoxin MPP⁺ in both electron transport particles and intact mitochondria // *Biochem Biophys Res Commun.* - 1989. - Vol.161, N.2. – P.809-818.
326. Schapira A.H., Cooper J.M., Dexter D., Clark J.B., Jenner P., Marsden C.D. Mitochondrial complex I deficiency in Parkinson's disease // *J Neurochem.* - 1990. - Vol.54, N.3. – P.823-827.
327. Schapira A.H., Mann V.M., Cooper J.M., Dexter D., Daniel S.E., Jenner P., Clark J.B., Marsden C.D. Anatomic and disease specificity of NADH CoQ1 reductase (complex I) deficiency in Parkinson's disease // *J Neurochem.* - 1990. - Vol.55, N.6. – P.2142-2145.
328. Scheibye-Knudsen M., Fang E.F., Croteau D.L., Wilson D.M. 3rd, Bohr V.A. Protecting the mitochondrial powerhouse // *Trends Cell Biol.* - 2015. - Vol.25, N.3. – P.158-170.
329. Schieber M., Chandel N.S. ROS function in redox signaling and oxidative stress // *Curr Biol.* - 2014. - Vol.24, N.10. – P.453-462.
330. Schmidt H. Three functional facets of calbindin D-28k // *Front Mol Neurosci.* - 2012. - Vol.5. – P.25.
331. Schwab A.D., Thurston M.J., Machhi J., Olson K.E., Namminga K.L., Gendelman H.E., Mosley R.L. Immunotherapy for Parkinson's disease // *Neurobiol Dis.* - 2020. - Vol.137. – P.104760.
332. Segura-Aguilar J., Paris I. Mechanisms of dopamine oxidation and Parkinson's disease // *Handbook of Neurotoxicity.* - 2014. – P.865–883.
333. Seo J. H., Ahn Y., Lee S.R., Yeo C.Y., Hur K.C. The major target of the endogenously generated reactive oxygen species in response to insulin stimulation is phosphatase and tensin homolog and not phosphoinositide-3 kinase (PI-3 kinase) in the PI-3 kinase/Akt pathway // *Molecular biology of the cell.* - 2005 г. - Vol.16, N.1. – P.348-357.
334. Shen R.S., Abell C.W., Gessner W., Brossi A. Serotonergic conversion of MPTP and dopaminergic accumulation of MPP⁺ // *FEBS Lett.* - 1985. - Vol.189, N.2. – P.225-230.
335. Sherer T.B., Betarbet R., Stout A.K., Lund S., Baptista M., Panov A.V., Cookson M.R., Greenamyre J.T. An in vitro model of Parkinson's disease: linking mitochondrial impairment to altered alpha-synuclein metabolism and oxidative damage // *J Neurosci.* - 2002. - Vol.22, N.16. – P.7006-7015.
336. Shindo Y., Yamanaka R., Suzuki K., Hotta K., Oka K. Intracellular magnesium level determines cell viability in the MPP⁺ model of Parkinson's disease // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA).* - 2015. - Vol.1853, N.12. – P.3182–3191.
337. Shiotsuki H., Yoshimi K., Shimo Y., Funayama M., Takamatsu Y., Ikeda K., Takahashi R., Kitazawa S., Hattori N. A rotarod test for evaluation of motor skill learning // *J Neurosci Methods.* - 2010. - Vol.189, N.2. – P.180-185.

338. Sies H., Berndt C., Jones D.P. Oxidative Stress // *Annu Rev Biochem.* - 2017. - Vol.86. – P.715-748.
339. Silverstein F.S., Chen R., Johnston M.V. The glutamate analogue quisqualic acid is neurotoxic in striatum and hippocampus of immature rat brain // *Neurosci Lett.* - 1986. - Vol.71, N.1. – P.13-18.
340. Siman R., Noszek J.C. Excitatory amino acids activate calpain I and induce structural protein breakdown in vivo // *Neuron.* - 1988. - Vol.1, N.4. – P.279-287.
341. Simon D.K., Tanner C.M., Brundin P. Parkinson Disease Epidemiology, Pathology, Genetics, and Pathophysiology // *Clin Geriatr Med.* - 2020. - Vol.36, N.1. – P.1-12.
342. Singh A., Kukreti R., Saso L., Kukreti S. Oxidative Stress: A Key Modulator in Neurodegenerative Diseases // *Molecules.* - 2019. - Vol.24, N.8. – P.1583.
343. Singh A. Oscillatory activity in the cortico-basal ganglia-thalamic neural circuits in Parkinson's disease // *Eur J Neurosci.* - 2018. - Vol.48, N.8. – P.2869-2878.
344. Sohmiya M., Tanaka M., Tak N.W., Yanagisawa M., Tanino Y., Suzuki Y., Okamoto K., Yamamoto Y. Redox status of plasma coenzyme Q10 indicates elevated systemic oxidative stress in Parkinson's disease // *J Neurol Sci.* - 2004. - Vol.223, N.2. – P.161-166.
345. Soikkeli R., Partanen J., Soininen H., Pääkkönen A., Riekkinen P. Slowing of EEG in Parkinson's disease // *Electroencephalogr Clin Neurophysiol.* - 1991. - Vol.79, N.3. – P.159-165.
346. Soman S.K., Bazała M., Keatinge M., Bandmann O., Kuznicki J. Restriction of mitochondrial calcium overload by MCU inactivation renders a neuroprotective effect in zebrafish models of Parkinson's disease // *Biol Open.* - 2019. - Vol.8, N.10. – P.bio044347.
347. Song M.K., Lee J.H., Kim J., Kim J.H., Hwang S., Kim Y.-S., Kim Y.-J. Neuroprotective effect of NXP031 in the MPTP-induced Parkinson's disease model // *Neuroscience Letters.* – 2020. – Vol.740. – P.135425.
348. Sonsalla P.K., Albers D.S., Zeevalk G.D. Role of glutamate in neurodegeneration of dopamine neurons in several animal models of parkinsonism // *Amino Acids.* - 1998. - Vol.14, N.1-3. – P.69-74.
349. Sonsalla P.K., Heikkila R.E. The influence of dose and dosing interval on MPTP-induced dopaminergic neurotoxicity in mice // *Eur J Pharmacol.* - 1986. - Vol.129. – P.339–345.
350. Stoof J.C., Booij J., Drukarch B. Amantadine as N-methyl-D-aspartic acid receptor antagonist: new possibilities for therapeutic applications? // *Clin Neurol Neurosurg.* - 1992. - Vol.94 – P.4-6.
351. Subramaniam S.R., Vergnes L., Franich N.R., Reue K., Chesselet M.F. Region specific mitochondrial impairment in mice with widespread overexpression of alpha-synuclein // *Neurobiol Dis.* - 2014. - Vol.70. – P.204-213.
352. Sulzer D., Alcalay R.N., Garretti F., Cote L., Kanter E., Agin-Liebes J., Liong C., McMurtrey C., Hildebrand W.H., Mao X., Dawson V.L., Dawson T.M., Oseroff C., Pham J., Sidney J., Dillon M.B., Carpenter C., Weiskopf D., Phillips E., Mallal

- S., Peters B., Frazier A. Lindestam Arle T cells from patients with Parkinson's disease recognize α -synuclein peptides // *Nature*. - 2017. - Vol.546, N.7660. – P.656-661.
353. Sun Y., Zhang H., Selvaraj S., Sukumaran P., Lei S., Birnbaumer L., Singh B.B. Inhibition of L-Type Ca^{2+} Channels by TRPC1-STIM1 Complex Is Essential for the Protection of Dopaminergic Neurons // *J Neurosci*. - 2017. - Vol.37, N.12. – P.3364-3377.
 354. Sundström E., Samuelsson E.B. Comparison of key steps in 1-methyl-4-phenyl - 1,2,3,6 - tetrahydropyridine (MPTP) neurotoxicity in rodents // *Pharmacol Toxicol*. - 1997. - Vol.81, N.5. – P.226-231.
 355. Surmeier D.J., Schumacker P.T., Guzman J.D., Ilijic E., Yang B., Zampese E. Calcium and Parkinson's disease // *Biochem Biophys Res Commun*. - 2017. - Vol.483, N.4. – P.1013-1019.
 356. Surmeier D.J., Schumacker P.T. Calcium, bioenergetics, and neuronal vulnerability in Parkinson's disease // *J Biol Chem*. - 2013. - Vol.288, N.15. – P.10736-10741.
 357. Sziráki I., Mohanakumar K.P., Rauhala P., Kim H.G., Yeh K.J., Chiueh C.C. Manganese: a transition metal protects nigrostriatal neurons from oxidative stress in the iron-induced animal model of parkinsonism // *Neuroscience*. - 1998. - Vol.85, N.4. – P.1101-1111.
 358. Tan B.Z., Jiang F., Tan M.Y., Yu D., Huang H., Shen Y., Soong T.W. Functional characterization of alternative splicing in the C terminus of L-type $\text{CaV}1.3$ channels // *J Biol Chem*. - 2011. – Vol.286, N.49. – P.42725-42735.
 359. Tollefson G.D. Short-term effects of the calcium channel blocker nimodipine (Bay-e-9736) in the management of primary degenerative dementia // *Biol Psychiatry*. - 1990. - Vol.27, N.10. – P.1133-1142.
 360. Trist B.G., Hare D.J., Double K.L. Oxidative stress in the aging substantia nigra and the etiology of Parkinson's disease // *Aging Cell*. - 2019. - Vol.18, N.6. – P.e13031.
 361. Tysnes O.B., Storstein A. Epidemiology of Parkinson's disease // *J Neural Transm (Vienna)*. - 2017. - Vol.124, N.8. – P.901-905.
 362. Ugrumov M.V., Khaindrava V.G., Kozina E.A., Kucheryanu V.G., Bocharov E.V., Kryzhanovsky G.N., Kudrin V.S., Narkevich V.B., Klodt P.M., Rayevsky K.S., Pronina T.S. Modeling of presymptomatic and symptomatic stages of parkinsonism in mice // *Neuroscience*. - 2011. - Vol.181. – P.175-88.
 363. Uhl G.R., Li S., Takahashi N., Itokawa K., Lin Z., Hazama M., Sora I. The VMAT2 gene in mice and humans: amphetamine responses, locomotion, cardiac arrhythmias, aging, and vulnerability to dopaminergic toxins // *FASEB J*. - 2000. - Vol.14, N.15. – P.2459-2465.
 364. Uitti R.J., Rajput A.H., Ahlskog J.E., Offord K.P., Schroeder D.R., Ho M.M., Prasad M., Rajput A., Basran P. Amantadine treatment is an independent predictor of improved survival in Parkinson's disease // *Neurology*. - 1996. - Vol.46, N.6. – P.1551-1556.

365. Ułaz J., Cotman C.W. Dopaminergic denervation of striatum results in elevated expression of NR2A subunit // *Neuroreport*. - 1996. - Vol.7, N.11. – P.1789-1793.
366. Ulusoy A., Decressac M., Kirik D., Björklund A. Viral vector-mediated overexpression of α -synuclein as a progressive model of Parkinson's disease // *Prog Brain Res*. - 2010. - Vol.184. – P.89-111.
367. Vaarmann A., Gandhi S., Gourine A.V., Abramov A.Y. Novel pathway for an old neurotransmitter: dopamine-induced neuronal calcium signalling via receptor-independent mechanisms // *Cell Calcium*. - 2010. - Vol.48, N.2-3. – P.176-182.
368. Vaarmann A., Kovac S., Holmström K.M., Gandhi S., Abramov A.Y. Dopamine protects neurons against glutamate-induced excitotoxicity // *Cell Death Dis*. - 2013. - Vol.4, N.1. – P.e455.
369. Valavanidis A., Vlachogianni T., Fiotakis C. 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG): A critical biomarker of oxidative stress and carcinogenesis // *J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev*. - 2009. – Vol.27, N.2. – P.120-139.
370. van Dyck C.H., Seibyl J.P., Malison R.T. Age related decline in dopamine transporters: Analysis of striatal subregions, nonlinear effects, and hemispheric asymmetries // *Am. J. Geriatr. Psychiatry*. - 2002. – Vol.10. – P.36–43.
371. Vanle B., Olcott W., Jimenez J., Bashmi L., Danovitch I., IsHak W.W. NMDA antagonists for treating the non-motor symptoms in Parkinson's disease // *Transl Psychiatry*. - 2018. - Vol.8, N.1. – P.117.
372. Venda L.L., Cragg S.J., Buchman V.L., Wade-Martins R. α -Synuclein and dopamine at the crossroads of Parkinson's disease // *Trends Neurosci*. - 2010. - Vol.33, N.12. – P.559-568.
373. Venkateshappa C., Harish G., Mythri R.B., Mahadevan A., Bharath M.M., Shankar S.K. Increased oxidative damage and decreased antioxidant function in aging human substantia nigra compared to striatum: implications for Parkinson's disease // *Neurochem Res*. - 2012. - Vol.37, N.2. – P.358-369.
374. Vergun O., Keelan J., Khodorov B.I., Duchon M.R. Glutamate-induced mitochondrial depolarisation and perturbation of calcium homeostasis in cultured rat hippocampal neurons // *J Physiol*. - 1999. - Vol.519, N.2. – P.451-466.
375. Verma A.K., Raj J., Sharma V., Singh T.B., Srivastava S., Srivastava R. Plasma Prolidase Activity and Oxidative Stress in Patients with Parkinson's Disease // *Parkinsons Dis*. - 2015. - Vol.2015. – P.598028.
376. Volles M.J., Lansbury P.T.Jr. Zeroing in on the pathogenic form of alpha-synuclein and its mechanism of neurotoxicity in Parkinson's disease // *Biochemistry*. - 2003. - Vol.42, N.26. – P.7871-7878.
377. Wang J., Wang F., Mai D., Qu S. Molecular Mechanisms of Glutamate Toxicity in Parkinson's Disease // *Front Neurosci*. - 2020. - Vol.14. – P.585584.
378. Wang Q.M., Xu Y.Y., Liu S., Ma Z.G. Isradipine attenuates MPTP-induced dopamine neuron degeneration by inhibiting up-regulation of L-type calcium channels and iron accumulation in the substantia nigra of mice // *Oncotarget*. - 2017. - Vol.8, N.29. – P.47284-47295.

379. Weidinger A., Kozlov A.V. Biological Activities of Reactive Oxygen and Nitrogen Species: Oxidative Stress versus Signal Transduction // *Biomolecules*. - 2015. - Vol.5, N.2. – P.472-484.
380. Weinberger M., Mahant N., Hutchison W.D., Lozano A.M., Moro E., Hodaie M., Lang A.E., Dostrovsky J.O. Beta oscillatory activity in the subthalamic nucleus and its relation to dopaminergic response in Parkinson's disease // *J Neurophysiol*. - 2006. - Vol.96, N.6. – P.3248-3245.
381. Whetsell W.O. Jr., Shapira N.A. Neuroexcitation, excitotoxicity and human neurological disease // *Lab Invest*. - 1993. – Vol.68, N.4. – P.372-387.
382. Williams-Gray C.H., Wijeyekoon R., Yarnall A.J., Lawson R.A., Breen D.P., Evans J.R., Cummins G.A., Duncan G.W., Khoo T.K., Burn D.J., Barker R.A., ICICLE-PD study group. Serum immune markers and disease progression in an incident Parkinson's disease cohort (ICICLE-PD) // *Mov Disord*. - 2016. - Vol.31, N.7. – P.995-1003.
383. Witzig V.S., Komnig D., Falkenburger B.H. Changes in Striatal Medium Spiny Neuron Morphology Resulting from Dopamine Depletion Are Reversible // *Cells*. - 2020. - Vol.9, N.11. – P.2441.
384. Wu D.M., Wang S., Wen X., Han X.R., Wang Y.J., Shen M., Fan S.H., Zhuang J., Zhang Z.F., Shan Q., Li M.Q., Hu B., Sun C.H., Lu J., Chen G.Q., Zheng Y.L. Suppression of microRNA-342-3p increases glutamate transporters and prevents dopaminergic neuron loss through activating the Wnt signaling pathway via p21-activated kinase 1 in mice with Parkinson's disease // *J Cell Physiol*. - 2019. - Vol.234, N.6. – P.9033-9044.
385. Wu H.M., Tzeng N.S., Qian L., Wei S.J., Hu X., Chen S.H., Rawls S.M., Flood P., Hong J.S., Lu R.B. Novel neuroprotective mechanisms of memantine: increase in neurotrophic factor release from astroglia and anti-inflammation by preventing microglial activation // *Neuropsychopharmacology*. - 2009. - Vol.34, N.10. – P.2344-2357.
386. Xu S.F., Zhang Y.H., Wang S., Pang Z.Q., Fan Y.G., Li J.Y., Wang Z.Y., Guo C. Lactoferrin ameliorates dopaminergic neurodegeneration and motor deficits in MPTP-treated mice // *Redox Biol*. - 2019. - Vol.21. – P.101090.
387. Yang J., Hertz E., Zhang X., Leinartaitė L., Lundius E.G., Li J., Svenningsson P. Overexpression of α -synuclein simultaneously increases glutamate NMDA receptor phosphorylation and reduces glucocerebrosidase activity // *Neurosci Lett*. - 2016. - Vol.611. – P.51-58.
388. Yoritaka A., Hattori N., Uchida K., Tanaka M., Stadtman E.R., Mizuno Y. Immunohistochemical detection of 4-hydroxynonenal protein adducts in Parkinson disease // *Proc Natl Acad Sci U S A*. - 1996. - Vol.93, N.7. – P.2696-2701.
389. Yun-Zhong F., Sheng Y., Guoyao W. Free radicals, antioxidants, and nutrition // *Nutrition*. – 2002. - Vol.18. – P.872–879.
390. Zhang Q.S., Heng Y., Mou Z., Huang J.Y., Yuan Y.H., Chen N.H. Reassessment of subacute MPTP-treated mice as animal model of Parkinson's disease // *Acta Pharmacol Sin*. - 2017. - Vol.38, N.10. – P.1317-1328.

391. Zhang S., Wang R., Wang G. Impact of Dopamine Oxidation on Dopaminergic Neurodegeneration // ACS Chem Neurosci. - 2019. - Vol.10, N.2. – P.945-953.
392. Zhang W., Wang T., Pei Z., Miller D.S., Wu X., Block M.L., Wilson B., Zhang W., Zhou Y., Hong J.S., Zhang J. Aggregated alpha-synuclein activates microglia: a process leading to disease progression in Parkinson's disease // FASEB J. - 2005. - Vol.19, N.6. – P.533-542.
393. Zhang Z., Zhang S., Fu P., Zhang Z., Lin K., Ko J.K., Yung K.K. Roles of Glutamate Receptors in Parkinson's Disease // Int J Mol Sci. - 2019. - Vol.20, N.18. – P.4391.
394. Zhou F.M., Wilson C.J., Dani J.A. Cholinergic interneuron characteristics and nicotinic properties in the striatum // J Neurobiol. - 2002. - Vol.53, N.4. – P.590-605.
395. Zhou Y., Danbolt N.C. Glutamate as a neurotransmitter in the healthy brain // Journal of Neural Transmission. - 2014. – Vol.8, N.121. – P.799-817.
396. Zou J.Y., Crews F.T. TNF alpha potentiates glutamate neurotoxicity by inhibiting glutamate uptake in organotypic brain slice cultures: neuroprotection by NF kappa B inhibition // Brain Res. - 2005. - Vol.1034, N.1-2. – P.11-24.