

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»
(ФГБНУ «НИИОПП»)

На правах рукописи

Голоборщева Валерия Владимировна

**ОСОБЕННОСТИ МФТП-ИНДУЦИРОВАННОГО ПАРКИНСОНИЗМА НА
МЫШАХ С ГЕНЕТИЧЕСКИМ НОКАУТОМ АЛЬФА-СИНУКЛЕИНА**

3.3.3 – Патологическая физиология

Диссертация на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Научные руководители:

КУЧЕРЯНУ ВАЛЕРИЯН

ГРИГОРЬЕВИЧ

доктор медицинских наук

ОВЧИННИКОВ РУСЛАН

КОНСТАНТИНОВИЧ

кандидат медицинских наук

Москва – 2021

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	6
ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ.....	7
Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	15
1.1 Паркинсонический синдром как нозологическая группа нейродегенеративных расстройств, общие сведения	15
1.1.1 История изучения паркинсонизма	16
1.1.2 Особенности классификации паркинсонизма.....	19
1.1.3 Патофизиологические признаки болезни Паркинсона	22
1.2 Альфа-синуклеин – биомаркер болезни Паркинсона.....	27
1.2.1 Исследование роли альфа-синуклеина в процессах нейродегенерации.....	28
1.2.2 Патогенез альфа-синуклеинопатии при БП	31
1.3 МФТП-индуцированный паркинсонизм.....	34
1.3.1 Открытие нейротоксических свойств 1-метил-4-фенил-1,2,3,6- тетрагидропиридина (МФТП).....	35
1.3.2 Предполагаемый механизм патологического действия МФТП.....	36
1.4 Моделирование МФТП-индуцированного паркинсонического синдрома на генетически модифицированных мышах и животных с неизменённым (интактным) геномом.....	41
1.4.1 Использование животных с немодифицированным геномом	42
1.4.2 Использование генетически модифицированных мышей	44
1.5 Достоинства и недостатки нейротоксической модели на мышах.....	49

Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	53
2.1 Работа с лабораторными животными	53
2.1.1 Линии экспериментальных мышей	53
2.1.2 Протокол введения МФТП.....	54
2.1.3 Инструментальные методы оценки локомоторной функции животных.....	54
2.1.4 Диссекция структур головного мозга мышей	57
2.2 Молекулярно-биологические методы.....	58
2.2.1 Выделение нуклеиновых кислот из образцов тканей	58
2.2.2 Конвенционная полимеразная цепная реакция.....	58
2.2.3 Оценка уровней экспрессии мРНК методом количественной ОТ-ПЦР.....	60
2.3 Биохимические методы.....	61
2.3.1 Электрофорез ДНК-фрагментов в агарозном геле	61
2.3.2 Анализ нейрохимических веществ полосатого тела методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ)	61
2.4 Гистологическое исследование	62
2.4.1 Фиксация тканей мозга взрослых мышей	62
2.4.2 Приготовление гистологических препаратов	63
2.4.3 Иммуногистохимическое окрашивание срезов среднего мозга.....	65
2.4.4 Морфометрический анализ дофаминергических нейронов ЧС и ВОП среднего мозга	66
2.5 Статистическая обработка данных	68

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	69
3.1 Морфометрический анализ дофаминергических нейронов в компактной части чёрной субстанции у мышей с генетическим нокаутом альфа-синуклеина	73
3.2 Анализ уровней мРНК гена мультимерина 1 (Mmrn-1), картированного в непосредственной близости с альфа-синуклеином.....	75
3.3 Формирование репрезентативных синхронизированных когорт альфа-синуклеин дефицитных животных для моделирования МФТП-токсического паркинсонизма	81
3.3.1 Разведение альфа-синуклеин нокаутных колоний	81
3.3.2 Генотипирование животных с последующим формированием экспериментальных и контрольных групп	83
3.4 Характеристика паркинсонического синдрома у мышей с селективной инактивацией гена альфа-синуклеина после введения нейротоксина МФТП по субхроническому протоколу	85
3.4.1 Инструментальный анализ двигательных нарушений	87
3.4.1.1 <i>Результаты поведенческого тестирования «перевернутая сетка».....</i>	<i>87</i>
3.4.1.2 <i>Результаты поведенческого тестирования «вертикальный шест».....</i>	<i>88</i>
3.4.1.3 <i>Результаты анализа походки в высокотехнологичной установке CatWalk XT (“Noldus”).....</i>	<i>89</i>
3.4.2 Биохимическое исследование дофамина и его метаболитов в стриатуме.	92
3.4.3 Морфометрический анализ дофаминергических нейронов чёрной субстанции (ЧС) и вентральной области покрышки (ВОП).....	95

3.5 Моделирование токсического паркинсонического синдрома на линии бессинуклеиновых мышей (abg-KO)	101
3.5.1 Отсутствие выраженных расстройств локомоторной функции у животных линии abg-KO	103
3.5.2 Исследование нейрохимического дофаминового статуса в стриатуме у мышей, моделирующих дисфункцию всех трёх членов семейства синуклеинов.....	105
3.5.3 Сравнительный морфометрический анализ дофаминергических нейронов чёрной субстанции и вентральной области покрышки у бессинуклеиновых мышей и животных с немодифицированным геномом.....	107
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	112
ВЫВОДЫ.....	117
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	119

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

БП – болезнь Паркинсона

ДА – дофамин

НДЗ – нейродегенеративные заболевания

ЧС – черная субстанция

ВОП – вентральная область покрышки

п. н. – пары нуклеотидов

АГ – агарозный гель

ПЦР – полимеразная цепная реакция

SDS (англ. sodium dodecyl sulfate) – додецил сульфат натрия

GAPDH (англ. glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase) –
глицеральдегидфосфатдегидрогеназа

МФТП – 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридин

и/п – интраперитонеально

ТГ (TH) – тирозингидроксилаза

КО (англ. knock out) – нокаут

ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография

ДОФУК – диоксифенилуксусная кислота

ГВК – гомованилиновая кислота

Snca – ген, кодирующий альфа-синуклеин

Mmrn1 – ген, кодирующий мультимерин

ДТ/WT (англ. wild type) – дикий тип, мыши линии C57Bl/6J

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования

Избирательное поражение дофаминергических нейронов nigrostriатной системы является одним из основных компонентов патогенеза болезни Паркинсона (БП). Установлено, что альфа-синуклеин, локализованный преимущественно в пресинаптических окончаниях, вовлечен в регуляцию оборота дофамина (ДА) в синапсах и принимает непосредственное участие в оптимизации процессов нейротрансмиссии в ДА-ергических нейронах. Нарушения его структуры, экспрессии и внутринейронной локализации приводят к патогенной агрегации и формированию характерных патогистологических включений – телец Леви [Иллариошкин С.Н. & Ахмадуллина Д.Р., 2020; Воронков Д.Н. и др., 2018]. Более того, получены многочисленные экспериментальные доказательства того, что нейротоксин - 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридин (МФТП), специфически поражающий nigrostriатные ДА-ергические нейроны, вызывает повышение экспрессии и посттрансляционные модификации эндогенного альфа-синуклеина, а в некоторых случаях, ведет к его агрегации в цитоплазме нейронов с образованием патогистологических включений [Fornai et al., 2005]. Остается не до конца выясненным, вовлечён ли эндогенный альфа-синуклеин в механизмы токсического действия МФТП на ДА-ергические нейроны чёрной субстанции (ЧС) головного мозга. В ряде исследований, проведенных на линиях нокаутных по гену альфа-синуклеина мышей, было показано, что их ДА-нейроны ЧС более устойчивы к нейротоксическому эффекту МФТП [Dauer et al., 2002; Drolet et al., 2004; Fornai et al., 2005; Klivenyi et al., 2006; Robertson et al., 2004]. С другой стороны, у линии мышей с большой спонтанной делецией части хромосомы (размер делеции - 2 сМ), захватывающей и локус Snca, эти нейроны оказались столь же чувствительными к МФТП, как и нейроны мышей дикого типа [Fornai et

al., 2005]. Кроме того, было продемонстрировано, что в устойчивой к МФТП линии животных с инактивированным альфа-синуклеином [Robertson et al., 2004] одновременная делеция генов, кодирующих и другие члены семейства синуклеинов, восстанавливает чувствительность дофаминергических нейронов ЧС к этому токсину. Таким образом, роль альфа-синуклеина в механизме токсического действия МФТП остается окончательно не установленной.

Несоответствия, наблюдаемые в разных линиях мышей с инактивированным геном альфа-синуклеина, могут быть объяснены природой внесенных генетических модификаций. Известные и изученные линии содержат дополнительные генетические элементы, оставшиеся в модифицированном локусе гена альфа-синуклеина. Особое внимание заслуживают промоторные элементы генов, используемых для отбора клонов эмбриональных стволовых клеток на ранних этапах конструирования нокаутных животных. Эти «следовые» элементы могут влиять на экспрессию соседних или относительно отдаленных генов с часто непредсказуемым воздействием на физиологию нейронов в целом и их чувствительность к МФТП в частности.

Поскольку использование генетически модифицированных животных для исследования роли нарушения функции альфа-синуклеина в патологии nigrostriatной системы остается наиболее продуктивным методологическим подходом, были созданы новые линии с регулируемым и конвенционным нокаутом гена альфа-синуклеина [Ninkina et al., 2015]. Использование в диссертационном исследовании новой нокаутной линии, в которой конститутивная инактивация гена альфа-синуклеина достигнута минимальными модификациями локуса с удалением всех посторонних последовательностей, используемых на промежуточных этапах создания нокаута, позволит исследовать непосредственно нарушения функции альфа-синуклеина в центральной нервной системе. Выявление механизмов

селективного повреждения определенных групп ДА-ергических нейронов является важной фундаментальной задачей в изучении патогенеза БП, а недавние исследования убедительно показали, что альфа-синуклеин вовлечен в эти механизмы [Tarasova et al., 2018], поскольку участвует в регуляции формирования популяций ДА-нейронов, имеющих различную чувствительность к нейротоксину МФТП и дифференциально поражаемых у больных с БП.

Целью данной работы было изучение патогенетических механизмов МФТП-индуцированного экспериментального паркинсонизма у животных с генетическим нокаутом альфа-синуклеина.

Задачи исследования:

1. Провести моделирование МФТП-индуцированного паркинсонического синдрома на двух линиях нокаутных по гену альфа-синуклеина мышей, различающимися модификациями в локусе альфа-синуклеина.
2. Исследовать изменения локомоторной функции у альфа-синуклеин нокаутных мышей, в сравнении с животными с немодифицированным геномом, в условиях МФТП-индуцированного экспериментального паркинсонизма.
3. Выполнить морфометрическое исследование популяций ДА-ергических нейронов в чёрной субстанции (ЧС) и вентральной области покрышки (ВОП) среднего мозга у альфа-синуклеин нокаутных мышей и животных с немодифицированным геномом после введения МФТП.
4. Оценить изменения содержания ДА и его метаболитов (ДОФУК и ГВК) в стриатуме альфа-синуклеин нокаутных мышей и животных с немодифицированным геномом после введения МФТП.
5. Проанализировать влияние посторонних последовательностей, внесенных в модифицированный геномный локус, на экспрессию близлежащего гена мультимерина-1.

6. Исследовать эффект возможного функционального замещения двух других высоко гомологичных членов семейства синуклеинов на развитие МФТП-индуцированного паркинсонического синдрома у бессинуклеиновых мышей с делецией генов α -, β -, γ -синуклеинов.

Научная новизна исследования

1. Впервые была изучена роль дефицита альфа-синуклеина в селективном поражении ДА-ергических нейронов ЧС и ВОП мозга нокаутных по гену альфа-синуклеина мышей в условиях моделирования паркинсонического синдрома путём системного введения МФТП.

2. Получены новые данные по характеристике МФТП-индуцированного паркинсонизма на модельных системах генетического нокаута, воспроизводящих недостаточность альфа-синуклеина, или всех трёх членов семейства синуклеинов.

3. Впервые установлено влияние привнесённых в геном экспериментальных моделей *in vivo* модификаций в локусе альфа-синуклеина на экспрессию гена мультимерина 1, картированного в непосредственной близости с альфа-синуклеином.

Теоретическая значимость

Выявлены особенности патогенеза МФТП-индуцированного паркинсонического синдрома у двух линий мышей с избирательной инактивацией гена альфа-синуклеина (Abel-KO и Δ Flox-KO), а также линии бессинуклеинового нокаута (abg-KO). Установлено, что генетическая инактивация альфа-синуклеина приводит к снижению общего числа ДА-ергических нейронов в чёрной субстанции (ЧС) и вентральной области покрышки (ВОП). Введение нокаутным животным МФТП не влияет на число ДА-ергических нейронов ЧС и ВОП, но индуцирует манифестацию поведенческих и биохимических признаков экспериментального

паркинсонизма. При генетическом «выключении» всех белков-синуклеинов в условиях МФТП-нейротоксичности развиваются типичные патоморфологические и нейрохимические симптомы паркинсонического синдрома, что предполагает наличие функционального замещения у двух других высоко гомологичных членов семейства синуклеинов.

Практическая значимость

Поскольку линию избирательного нокаута альфа-синуклеина Δ Flox-KO, а также созданной на его основе линию abg-KO с делецией генов α -, β -, γ -синуклеинов, ранее не использовали для моделирования паркинсонического синдрома, полученные данные могут быть полезны для разработки новых подходов к патогенетической диагностике и лечению паркинсонизма. В частности, открывается возможность выбора новых молекулярных мишеней таргетной терапии – семейство белков-синуклеинов.

Методология и методы исследования

Работа выполнена на мышах нескольких линий: контроль – C57Bl/6J, нокаутные линии – Abel-KO, Δ Flox-KO, β -KO, γ -KO, а также новая линия, выведенная в ходе работы. Моделирование паркинсонического синдрома осуществляли путём внутрибрюшинного введения водного раствора МФТП (30 мг/кг в сутки) в течение 5 дней, животным в возрасте 3 месяцев; контрольные мыши получали физиологический раствор в том же объёме. Оценку клинической симптоматики экспериментального паркинсонического синдрома проходило через 21 день после введения последней инъекции. Поведенческое тестирование включало: тест на вертикальном шесте, тест «перевёрнутая сетка», многофункциональный метод исследования двигательной активности на установке CatWalk XT. Молекулярно-биологические методы: генотипирование потомства, детекция мутантных аллелей проведена методом конвенционной ПЦР, оценка уровней экспрессии

мРНК – методом количественной ОТ-ПЦР. Биохимические методы: электрофорез ДНК-фрагментов в агарозном геле, анализ нейрохимических веществ полосатого тела методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). Гистологическое исследование: приготовление гистологических препаратов, иммуногистохимическое окрашивание срезов, морфометрический анализ ДА-ергических нейронов ЧС и ВОП среднего мозга с учётом поправки Аберкромби.

Обработка данных: результаты электрофореза агарозного геля документировали после визуализации ДНК в проходящем ультрафиолетовом свете с помощью системы BioSpectrum AC Chemi HR 410 (UVP, США); для анализа полученных данных ВЭЖХ использовали программное обеспечение ALEXYS (Antec Leyden, Нидерланды); результаты теста CatWalk прошли обработку в программном обеспечении CatWalk XT10.6 (Noldus, Нидерланды).

Статистический анализ полученных данных проводили с использованием программных пакетов Statistica 12.0 (StatSoft, Inc., США) и GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, Inc., США).

Научные положения, выносимые на защиту

1. В ходе морфометрического анализа популяции ДА-ергических нейронов ЧС и ВОП мозга обеих альфа-синуклеин нокаутных линий мышей установлено, что альфа-синуклеин вовлечён в процессы их специфического поражения в условиях МФТП-индуцированного паркинсонизма.

2. Дефицит альфа-синуклеина оказывает нейропротекторный эффект на ДА-ергические нейроны ЧС в субхронической модели МФТП-индуцированного паркинсонического синдрома.

3. Привнесённые в модифицированный локус альфа-синуклеина в линии Abel-KO посторонние последовательности повышают уровень экспрессии гена мультимерина-1 в нервной ткани, в то время как уровни

экспрессии в линии ΔFlox-KO не отличаются от таковых в контрольных мышцах с интактным геномом.

4. При генетической делеции всех трёх синуклеинов чувствительность ДА-ергических нейронов ЧС к токсическому действию МФТП не отличается от таковой у животных с немодифицированным геномом, по-видимому, из-за отсутствия эффекта функционального замещения бета-синуклеином, оптимизирующего захват дофамина синаптическими везикулами.

Личный вклад автора

Разработка основной научной идеи и планирование исследования выполнено при непосредственном активном участии автора. Все ключевые эксперименты выполнены автором лично. Моделирование МФТП-индуцированного паркинсонизма на экспериментальных и контрольных когортах животных было проведено автором самостоятельно в конвенциональной зоне SPF-вивария при Лаборатории генетического моделирования нейродегенеративных процессов ИФАВ РАН, Черноголовка. Анализ моноаминов методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) выполнен автором совместно с А.Ю. Романом в Кардиффском университете, Великобритания. Автором самостоятельно сформирована база данных, проведена статистическая обработка, анализ и интерпретация всех полученных результатов. Автору принадлежит ведущая роль при подготовке и написании научных публикаций по теме диссертации.

Степень достоверности результатов

Достоверность полученных результатов подтверждается использованием в работе современных нокаутных моделей *in vivo* и применёнными лабораторными методами исследования, а также адекватно поставленными задачами и выбором актуальных способов статистического

анализа. Научные выводы и положения обоснованы. Выводы диссертационной работы объективно и полноценно отражают результаты проведенных исследований. Результаты исследования опубликованы в высокорейтинговых журналах.

Апробация работы

Основные результаты диссертационной работы были представлены на: VIII Конференции Молодых Учёных ИФАВ РАН (Черноголовка, Россия, 2018), II Объединённом научном форуме, (Сочи- Дагомыс, Россия, 2019), XXVI Всероссийской конференции молодых учёных с международным участием «Актуальные проблемы биомедицины» (Санкт-Петербург, Россия, 2020), XVI Международном междисциплинарном конгрессе (Судак, Россия, 2020), VII Междисциплинарной международной конференции по нейронаукам «NEURONUS 2020 IBRO Neuroscience Forum» (Краков, Польша, 2020), VII Съезд физиологов СНГ с международным участием «Нейродегенеративные заболевания: от фундаментальных знаний механизмов патогенеза до диагностики и лечения» (Сочи-Дагомыс, 3-7 октября 2021г.).

Структура и объём работы

Диссертационное исследование представлено в виде следующих разделов: введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов собственных исследований и их обсуждения, выводов, практических рекомендаций и списка цитируемой литературы, включающего 185 наименований (19 на русском и 166 на иностранных языках). Работа изложена на 142 страницах и сопровождается 37 рисунками, 3 таблицами и 1 схемой.

Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Паркинсонический синдром как нозологическая группа нейродегенеративных расстройств, общие сведения

Паркинсонический синдром (или паркинсонизм) – это неврологический симптомокомплекс мультифакториальной этиологии, обусловленный нарушением работы экстрапирамидной системы головного мозга. Паркинсонизм клинически характеризуется триадой признаков: брадикинезией, ригидностью, тремором, а также имеет дополнительные двигательные и немоторные патологические проявления. Дебют заболевания обычно приходится на возраст от 65 до 70 лет и только менее чем в 5% случаев поражает пациентов до 45 лет. Стоит отметить, что паркинсонический синдром возникает в среднем на 2 года раньше у мужчин, нежели у женщин, и что в целом среди пациентов с БП мужчины встречаются в два раза чаще, чем женщины [Beitz, 2014; Haaxma et al., 2007; Hayes, 2019; Van Den Eeden et al., 2003], а чернокожее население и представители азиатского происхождения заболевают БП реже, чем белое население [Beitz, 2014].

По данным мировой статистики распространенность паркинсонизма в общей популяции населения колеблется от 100 до 200 случаев на 100 000 человек, а ежегодный прирост заболеваемости составляет 15 случаев на 100 000 человек [Tysnes & Storstein, 2017]. В действительности эти показатели занижены вследствие низкой выявляемости заболевания на начальных стадиях и сложной дифференциальной диагностики с другими экстрапирамидными патологиями, отягощенными паркинсоноподобным набором симптомов.

Болезнь Паркинсона (БП) является наиболее распространенной формой паркинсонического синдрома и этиопатогенетически обозначается, как первичный или идиопатический паркинсонизм. Однако существуют и другие клинические формы, которые необходимо учитывать. К ним относятся множественная системная атрофия (МСА), деменция с тельцами Леви,

прогрессирующий супрануклеарный паралич (синдром Стила – Ричардсона – Ольшевского), хорей Гентингтона, болезнь Галлевордена – Шпатца, кортикобазальная дегенерация (КБД), а также вторичный лекарственный, токсический паркинсонизм и мн. др. [Jancovic, 1992; Keener & Bordelon, 2016].

Эти заболевания могут быть дифференцированы на основе ключевых клинических признаков, а также чёткого понимания патогенетических механизмов, лежащих в основе болезни Паркинсона, что имеет решающее значение для диагностики, лечения и прогноза нейродегенеративного процесса в экстрапирамидной системе.

1.1.1 История изучения паркинсонизма

Болезнь Паркинсона впервые была описана в 1817 году лондонским врачом общей практики Джеймсом Паркинсоном в работе «Эссе о дрожательном параличе». Краткое описание наблюдаемого состояния, представленное Дж. Паркинсоном, все еще актуально:

Непроизвольное дрожащее движение с уменьшением мышечной силы в неактивных частях тела даже при поддержке; со склонностью наклонять туловище вперед и переходить от ходьбы к бегу... [Parkinson, 1817]

В этой монографии, состоящей из 5 глав и 66 страниц, автор рассмотрел исторические предпосылки описываемого им состояния, его признаки и симптомы, индивидуальные наблюдения за 6-ю пациентами, дифференциальную диагностику, предполагаемую этиологию и лечение. Будучи очень проницательным наблюдателем, Дж. Паркинсон обозначил наблюдаемое состояние, как болезнь с «коварным» началом и прогрессирующим инвалидизирующим течением, а также выделил четыре группы симптоматических изменений: тремор покоя, брадикинезию, ригидность, постуральную неустойчивость, а также отметил согнутую позу и фестинацию. Термин «дрожательный паралич» несколько вводил в

заблуждение научное сообщество, поскольку состояние, описанное Дж. Паркинсоном, обычно не вызывает пареза. Под термином “паралич” он подразумевал слабость пациентов, хотя и признавал, что нарушение “зависит не от общей слабости, а от прерывания потока нервного воздействия на пораженные части” [Parkinson, 1817]. Однако труд Джеймса Паркинсона о «дрожательном параличе» при жизни автора почти никто не оценил по достоинству. Эссе, известное ныне каждому неврологу, оставалось незамеченным в течение 40 лет после его опубликования. Лишь последующие исследования таких значимых научных фигур, как У. Говерс, С. Вильсон, В. Эрб и Ж.-М. Шарко в 1868–1881 годах позволили выделить болезнь Паркинсона в качестве самостоятельного заболевания [Louis, 1997]. Так в 1872 году «дрожательный паралич» был переименован в «болезнь Паркинсона» французским неврологом Жаном Мартеном Шарко [Charcot, 1872; Goetz, 2011].

Следующим важнейшим этапом изучения патогенеза паркинсонического синдрома стали работы немецкого невролога Фрица Генриха Леви, проводившего в лаборатории Алоиса Альцгеймера гистологические исследования аутопсийного материала больных, умерших от «дрожательного паралича». В третьем томе справочника по неврологии за 1912 год им были опубликованы первые результаты патогистологического анализа головного мозга 25 пациентов с БП, в которых Леви описал обнаруженные им новые патогистологические структуры [Goedert, Spillantini, Del Tredici, & Braak, 2013]. Усовершенствовав протокол изготовления гистологических препаратов, Ф. Леви визуализировал специфические внутриклеточные агрегаты в стволе головного мозга у больных с БП – большие эозинофильные структуры, состоящие из плотно уложенных белковых филаментов, находящихся в цитоплазме. В рамках последующих исследований он охарактеризовал наблюдаемые им типовые патогистологические включения в различных анатомических структурах

мозга: в клетках двигательных ядер блуждающего нерва, базального ядра Мейнерта, бледного шара, бокового и перивентрикулярного ядер таламуса. Стоит отметить, что современные работы подтверждают наличие телец Леви в этих структурах, а также в некоторых других: в голубом пятне, дорзальном ядре блуждающего нерва [Wakabayashi et al., 1999] и в коре мозжечка [Ikeda, Ikeda, Yoshimura, Kato, & Namba, 1978]. Важно отметить, что при анализе экспериментального материала Ф. Леви не отдавал должного значения обнаруженным им цитотоксическим агрегатам и не обозначил их связь с патогенезом болезни Паркинсона.

Дальнейшие исследования патоморфологии при паркинсонизме были продолжены российским учёным-невропатологом Константином Николаевичем Третьяковым, который внёс значительный вклад в понимание истоков нейродегенерации экстрапирамидной системы. Он впервые указал на область головного мозга, селективно поражаемую при БП – чёрную субстанцию, и доказал, что именно деструктивные изменения в этой анатомической части приводят к ригидности и тремору [Goedert et al., 2013]. Таким образом, совокупность исследований, указывающих на то, что различные заболевания с характерными общими расстройствами движений, тремором и ригидностью, характеризуются общей анатомической локализацией патологического процесса в черной субстанции, позволили К.Н. Третьякову в 1919 году сформулировать нигерную теорию паркинсонизма, которая обеспечила стремительный прогресс в исследованиях патогенеза БП [Юдина, Макаров, & Юдина, 2009]. Стоит отметить, что несмотря на многочисленные работы, направленные на изучение морфологии, белкового состава, а также способов оптимизации гистологической окраски цитотоксических агрегатов, патогенетический механизм формирования телец Леви долгое время оставался неизвестен. Современные исследования, посвященные изучению патогенеза БП, вышли на принципиально новый уровень после выявления в составе телец Леви белка альфа-синуклеина,

играющего ключевую роль в формировании этих патогистологических включений [Obeso et al., 2017].

Сегодня, спустя более 200 лет с момента открытия заболевания, положившего начало фундаментальному и многостороннему изучению болезни, можно с уверенностью сказать, что проделанный исследователями всего мира нелегкий путь оказался весьма успешным. На сегодняшний день болезнь Паркинсона признается одним из модельных нейродегенеративных заболеваний, в значительной степени определяющим прогресс целого комплекса клинических и фундаментальных дисциплин – неврологии, нейрофармакологии, нейрохирургии, нейрореабилитологии, нейрогенетики, экспериментальной нейробиологии, клеточной и молекулярной неврологии и др. Большие достижения можно наблюдать в персонифицированной фармакотерапии паркинсонизма с помощью многих доступных сегодня классов противопаркинсонических средств, а также во внедрении уникальных технологий хирургической и консервативной нейромодуляции, создании инновационных методов реабилитации с использованием компьютерной техники, разработке подходов к генной и клеточной терапии. На животных и клеточных моделях интенсивно изучаются тонкие механизмы гибели нейронов и возможности нейропротекции и нейрорепарации при паркинсонизме и других двигательных расстройствах.

1.1.2 Особенности классификации паркинсонизма

У пациентов с паркинсоническим синдромом обычно присутствует классическая триада клинических признаков: тремор покоя, ригидность и акинезия, но со временем могут проявляться и другие двигательные расстройства (**Рис. 1**), такие как синдром «включения-выключения», застывание походки, постуральная неустойчивость и др. [Маньковский Н. Б. и др., 1993]. Важно отметить, что помимо двигательных нарушений у больных БП часто проявляются симптомы вегетативной дисфункции, изменение

обоняния (дизосмия), депрессия, а также нарушение сна и когнитивной функции (т.н. немоторные симптомы), что в свою очередь может осложнить дифференциальную диагностику БП от других расстройств экстрапирамидной системы [Pfeiffer, 2016; van Wamelen et al., 2021]. В связи с этим паркинсонизм выделяют в отдельную нозологическую группу нейродегенеративных расстройств, в которой существует особая классификация по этиологическому признаку клинических проявлений.



Рисунок 1. Симптомы, регистрируемые у пациентов с БП

Адаптировано из online-публикации на сайте www.pfizerprofi.ru

Термином «паркинсонизм» определяют обширную группу заболеваний экстрапирамидной системы различной этиологии, для которых характерна триада клинических признаков – брадикинезия, пластическая мышечная ригидность и тремор. Паркинсонизм классифицируется на три основные этиопатогенетические формы: первичный (идиопатический, болезнь Паркинсона), вторичный (симптоматический) и паркинсонический синдром при различных формах мультисистемной дегенерации («паркинсонизм плюс») [Крыжановский Г.Н., 2002].

При общности клинического синдрома двигательных экстрапирамидных нарушений эти заболевания различаются по происхождению нейродегенеративного процесса, который может быть первичным (идиопатический паркинсонизм) или вторичным (симптоматический паркинсонизм и «паркинсонизм плюс»). В последние годы определилась тенденция называть симптоматический паркинсонизм псевдопаркинсонизмом. Вторичный паркинсонизм может быть следствием энцефалита, вызванного вирусами гриппа, кори, ветряной оспы, стафилококком и т.д, а также нередко может быть следствием приёма лекарственных препаратов (галоперидол, аминазин), блокирующих D₂-рецепторы на стриатных нейронах и тем самым снижающих дофаминовую передачу [Pan & Nicolazzo, 2018]. Симптоматический сосудистый паркинсонизм может формироваться на фоне дисциркуляторной энцефалопатии и атеросклероза, а также проявляться в клиническом симптомокомплексе остаточных явлений острого нарушения мозгового кровообращения. Сосудистый паркинсонизм возникает в связи с особой чувствительностью нигростриатных нейронов к гипоксии и обусловленными ею нарушениями метаболизма нейронов [Маньковский Н. Б. и др., 1982]. Этиологическими факторами симптоматического паркинсонизма служат средовые нейротоксины (гербициды, пестициды, продукты марганцевой, ртутной кобальтовой, цезиевой, нефтяной промышленности), пищевые

(тетрагидроизохинолины, метанол, этанол, героин, содержащий побочный продукт синтеза – МФТП), а также эндогенные патогены (β -карболины, глутамат) [Bettiol, Rose, Hughes, & Smith, 2015; Blandini & Armentero, 2012; Blandini, Porter, & Greenamyre, 1996; Caudle, Guillot, Lazo, & Miller, 2012; Ohta, 1989; Tanner et al., 2011].

К сожалению, в настоящее время доступны только симптоматические методы лечения. Наиболее часто используемыми препаратами для подобной терапии являются предшественник дофамина (ДА) 3,4-дигидроксифенилаланин (леводопа, L-ДОФА) и некоторые другие ДА-миметические соединения. Данный подход лечения БП улучшает моторные симптомы и продолжительность жизни пациентов, однако отмечают, что дофаминовая фармакотерапия может вызывать моторные осложнения (например, L-ДОФА – дискинезию (LID) и моторные флуктуации) [Calne, 1971; Fahn, 2000]. В практической медицине отмечается тенденция гипердиагностики БП за счет симптоматического паркинсонизма, что нередко выясняется при патологоанатомическом исследовании [Hughes, Ben-Shlomo, Daniel, & Lees, 1992]. Единственно надежными критериями для диагностики идиопатического паркинсонизма считаются специфическая реакция на леводопу (L-ДОФА), снижение поглощения меченой флюородопы тканями базальных ганглиев, определяемое с помощью позитронно-эмиссионной томографии, а также сравнительная молекулярная диагностика, направленная на определение наследственных форм паркинсонизма [Brooks, 1998; Dickson, 2018].

1.1.3 Патофизиологические признаки болезни Паркинсона

Патофизиологически Болезнь Паркинсона характеризуется дегенерацией дофаминергических нейронов в черной субстанции среднего мозга вследствие цитотоксической агрегации и формирования цитоплазматических включений – телец Леви, что приводит к дофаминовой

недостаточности в полосатом теле и сопряженных базальных ганглиях [Kalia & Lang, 2016; MacPhee G., 2001; Reich & Savitt, 2019] (**Рис. 2**). Стоит отметить, что тельца Леви содержат агрегированный формы белка альфа-синуклеина, который также присутствует при других нейродегенеративных расстройствах, включая множественную системную атрофию, деменцию с тельцами Леви, болезнь Галлервордена-Шпатца и др., в совокупности называемых «синуклеинопатиями» [Goedert, Jakes, & Spillantini, 2017]. Несмотря на то, что небольшой процент пациентов с БП имеет моногенную форму заболевания (LRRK2, parkin и др.), в большинстве случаев расстройство является спорадическим и имеет неизвестную этиологию.

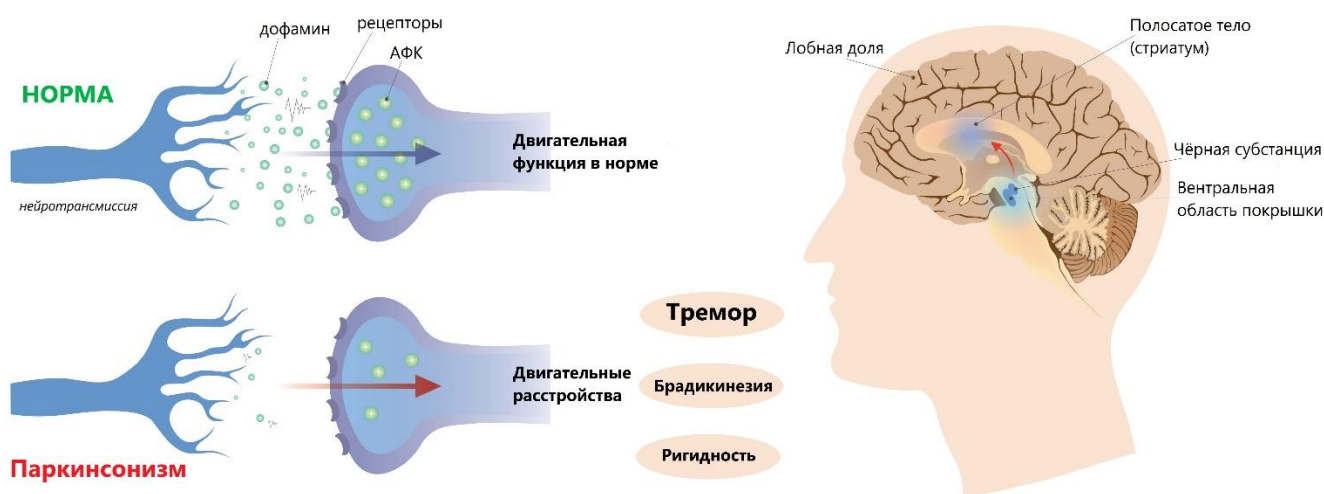


Рисунок 2. Нигростриатная система в норме и при БП.

Адаптировано из обзора Джейкоба Винсента «*PARKINSON'S DISEASE: CURING THE INCURABLE?*» на портале *Young Scientists Journal* (<https://ysjournal.com>)

Выявление телец Леви в компактной области черной субстанции у пациентов с БП при *post mortum* анализе является основным патогистологическим признаком данного заболевания и сопровождается выраженной гибелью значительного числа катехоламинергических нейронов. Важно подчеркнуть, что гибель ДА-ергических нейронов начинается задолго до проявления первых клинических симптомов, и это подтверждается многочисленными клинико-патологическими исследованиями [Dijkstra et al.,

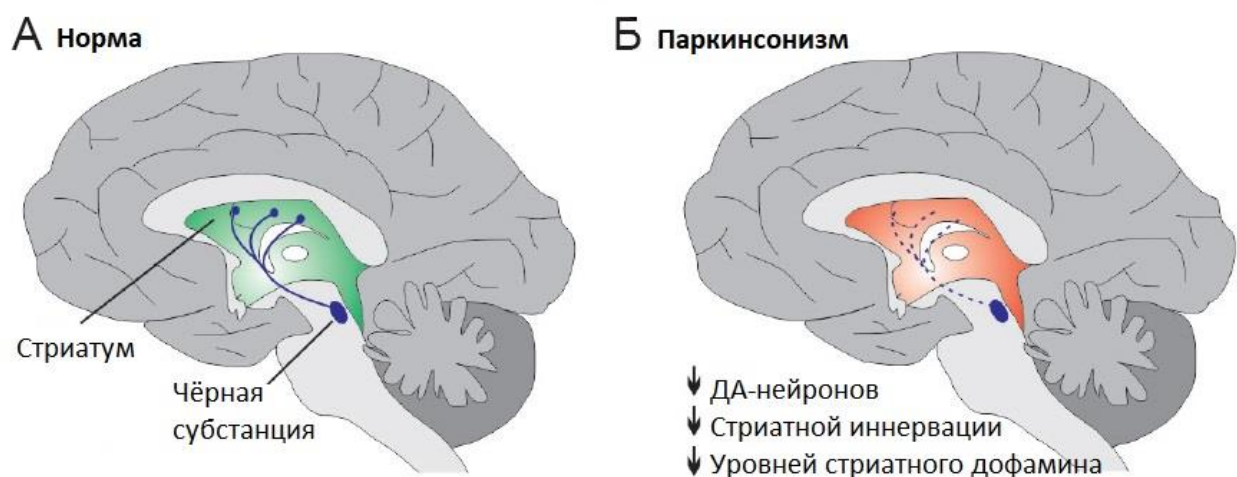
2014; Gazewood J., 2013]. Непосредственно клиническая симптоматика моторной дисфункции проявляется при потере более 70 % ДА-ергических нейронов в черной субстанции. В целом гибель ДА-ергических нейронов при БП может достигать более 85%. При этом в значительной части все еще функционирующих нейронов наблюдаются признаки нейродегенеративного процесса [Угрюмов, 2008]. В телах таких нейронов часто выявляются тельца Леви, а в их отростках – различного рода патологические структуры, такие как, например, Леви нейриты. Однако, высокие компенсаторные возможности нервной системы позволяют оставаться заболеванию в латентной фазе долгое время практически до той стадии, когда эффективное консервативное лечение уже невозможно и требуется регенеративная терапия для восстановления утраченных нейронов. Поскольку в вентролатеральной части компактного вещества черной субстанции располагаются нейроны, проецирующие отростки в основном в дорзальную скорлупу полосатого тела (стриатума), то именно там и детектируется наиболее выраженный дефицит дофамина у больных с БП. Отметим, что черная субстанция не является единственной анатомической структурой, поражающейся при БП.

Дегенеративный процесс с гибелью нейрональных клеток был выявлен, как уже отмечалось выше, и в голубом пятне (*locus coeruleus*), в ядрах шва мозга [Halliday et al., 1990] и в коре мозжечка [Ikeda et al., 1978]. Однако, центральная роль в патогенезе БП все же отводится повреждению нигростриатной системы (**Рис. 3**).

Функциональная недостаточность ДА-ергических нейронов черной субстанции, в первую очередь ее компактной области (*pars compacta*), лежит в основе патофизиологических процессов, результатом которых является клиническая симптоматика моторной дисфункции у больных с БП.

Нейроны компактной области черной субстанции и области хвостатого ядра и скорлупы, обозначаемые также дорзальным стриатумом, содержат ядра базальных ганглиев и являются частью нигростриарного пути – главного

тракта, контролирующего произвольные движения [Kandel & Squire, 2000]. Преимущественно в стриатуме располагаются тела ГАМК-ергических нейронов, которые модулируют активацию движения сразу по двум путям. Прямой путь представляет движение посредством ингибирования внутреннего бледного шара. Снижение ингибирующего эффекта приводит к активации таламо–кортикального пути. Непрямое ингибирование субталамических ядер, например, наружного бледного шара, приводит к торможению таламо-кортикального движения [Kandel & Squire, 2000]. Таким образом, выброс в синаптическую щель дорзального стриатума дофамина, синтезированного в области черной субстанции, модулирует активацию прямого и непрямого стриарного путей. Активация дофамином прямого пути происходит посредством D₁-рецепторов, в то время как активация D₂-рецепторов ингибирует не прямой возможный для ингибирования движения путь [Kandel & Squire, 2000] . Поэтому изучение роли D₁ и D₂ рецепторов в патогенезе БП является самостоятельным важным направлением в современных биомедицинских исследованиях патофизиологии паркинсонизма.



Shane V Hegarty et. al. 2014

Рисунок 3. Сигнальные пути нигростриатной системы в норме и при паркинсонизме.

(А) Рисунок интактного nigrostriatalного пути, иллюстрирующий восходящие аксоны (синие) ДА-ергических нейронов, которые берут начало в черной субстанции и иннервируют полосатое тело (стриатум).

(Б) При БП прогрессирующая дегенерация ДА-ергических нейронов приводит к снижению уровней дофамина в стриатуме и потере иннервации в полосатом теле.

Адаптировано из обзора [Hegarty, O'Keefe, & Sullivan, 2014]

К сожалению, по сей день неизвестно, как тельца Леви связаны с прогрессированием БП и что именно является ключевой причиной, запускающей нейродегенеративный процесс дофаминергической nigrostriatalной системы. Популярные теории о том, как происходит гибель ДА-ергических нейронов при болезни Паркинсона, включают митохондриальную дисфункцию, воспаление, нарушение метаболизма цитоплазматических белков, оксидативный стресс, вирусную интоксикацию через обонятельный тракт и «кишечную» гипотезу [Brown, Rumsby, Capleton, Rushton, & Levy, 2006; Ceccatelli, 2013; Chinta et al., 2013; Fritsch et al., 2012; Hawkes, Del Tredici, & Braak, 2007; Postuma, Gagnon, & Montplaisir, 2010; Schapira & Jenner, 2011].

По мере установления надежных биомаркеров БП, проблемы с диагностикой и клинической гетерогенностью паркинсонического синдрома будут исключаться, как это произошло со многими другими неврологическими расстройствами (например, спинально-мозжечковые атаксии, наследственные невропатии и т.д.). Важной задачей современных исследований является распознавание и разделение клинических подтипов на самых ранних стадиях заболевания, а также создание высокоспецифических методов лечения, тесно связанных с основным механизмом прогрессирования БП.

1.2 Альфа-синуклеин – биомаркер болезни Паркинсона

В патогенезе наследственных и идиопатических форм БП исключительно важная роль отводится нарушению нормальной функции высококонсервативного белка альфа-синуклеина. Агрегированные формы белка альфа-синуклеина (**Рис. 4**) являются структурообразующим компонентом патогистологических включений – телец Леви, в нейронах черной субстанции при болезни Паркинсона [Chaprov et al., 2021; Воронков Д.Н. и др., 2019; Jankovic J., 2013].

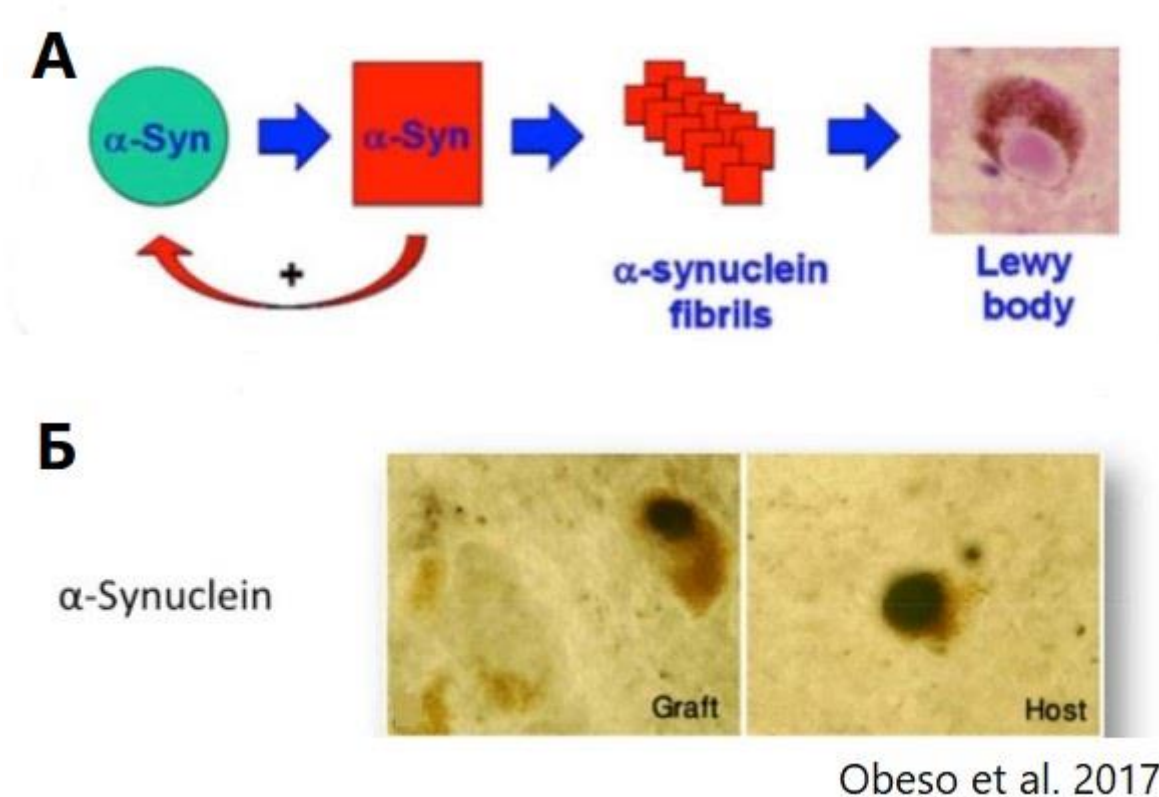


Рисунок 4. Формирование телец Леви, основным компонентом которых является альфа-синуклеин

(А) Схема мисфолдинга белка альфа-синуклеина, приводящего к образованию фибрилл с последующим формированием внутриклеточных олигомеров и агрегатов (тельца Леви).

(Б) Гистологические препараты, иллюстрирующие тельца Леви в трансплантированных эмбриональных ДА-ергических нейронах (graft) и в

нейронах черной субстанции реципиента (host). Эти наблюдения повышают вероятность того, что патологические изменения конформации белка альфа-синуклеина распространились от пораженных нейронов в мозге больного БП к имплантированным ДА-ергическим нейронам прионоподобным образом.

Адаптировано из обзора [Obeso et al., 2017]

1.2.1 Исследование роли альфа-синуклеина в процессах нейродегенерации

Впервые белок альфа-синуклеин был обнаружен в холинергических пресинаптических терминалях электрического ската *Torpedo californica* [Maroteaux, Campanelli, & Scheller, 1988], а затем и у других позвоночных [Goedert, 1997]. В ДНК человека белок альфа-синуклеин кодирован уникальным SNCA геном, который картирован на четвертой хромосоме (4q21.3-q22) [Touchman et al., 2001]. Первая мутация в гене альфа-синуклеина была описана в 1997 году в лаборатории Polymeropoulos, где было показано, что миссенс-мутация в гене альфа-синуклеина (SNCA) приводит к замене аминокислоты аланина на треонин в 53-м положении и ассоциирована с развитием наследственной формы БП [Polymeropoulos et al., 1997]. Практически в то же время при анализе аутопсийного материала больных с БП M.Spillantini было показано, что основным компонентом телец Леви, как при наследственных, так и идиопатических формах, является агрегированный белок альфа-синуклеин [Spillantini et al., 1997]. Это открытие активизировало интерес к подробному изучению синуклеинов.

Семейство синуклеинов состоит из трех сходных по структуре белков: альфа, бета- и гамма-синуклеина [Нинкина Н. Н. & Бухман В. Л., 2000а]. Альфа-синуклеин у млекопитающих имеет размер 140-143 аминокислотных остатка, и определяется в полиакриламидном геле (ПААГ), как единственная полоса с молекулярной массой 17,5 кДа. В его структуре выделяют NAC – пептид (неамилоидный компонент - гидрофобный участок), состоящий из 35 аминокислотных остатков и 6 коротких КТК- повторов. [Sung et al., 2007].

Умеренная сверхэкспрессия человеческого альфа-синуклеина в нервной системе мышей приводила к снижению дофаминовой нейротрансмиссии до уровня, который был характерен для стареющих мышей с нарушенной функцией альфа-синуклеина (генетический нокаут). Это указывает на то, что избыточная экспрессия альфа-синуклеина, нарушающая его баланс в клетке, приводит к нарушению дофаминовой нейротрансмиссии и изменению функционирования дофаминергических нейронов. Исследователи так же показали, что сверхэкспрессия альфа-синуклеина снижает движение и плотность синаптических пузырьков. Следовательно, повышенные уровни альфа-синуклеина, наблюдаемые у пациентов с мультипликациями гена альфа-синуклеина, могут влиять на синаптическую передачу.

Очевидным становится вопрос, в чем же тогда причина столь высоких агрегационных свойств альфа-синуклеина. Белок, в физиологических условиях, не имеет определенной вторичной структуры, в растворе, он находится в расплетенном состоянии, но при этом N-концевой домен имеет тенденцию к образованию альфа-спирали. Однако, альфа-синуклеин приобретает более компактную конформацию при связывании с липидной мембраной, а С-концевой домен при этом остается в развернутом состоянии. Таким образом, возможно именно такая дезорганизованная структура альфа-синуклеина и присутствие гидрофобных участков могут являться причиной высоких агрегационных свойств этого белка [Тарасова Т. В., 2016].

В связи с этим были сформулированы гипотезы о роли альфа-синуклеина в патогенезе БП. Согласно одной из них альфа-синуклеин в результате воздействия различных мутаций или иных воздействий окружающей среды может менять свою конформацию. Агрегация молекул и переход в нерастворимое состояние приводит к изменению внутриклеточной концентрации физиологически активного растворенного альфа-синуклеина и накопление его значительного количества в нефункциональном состоянии в

составе телец Леви [Сальков В.Н. и др., 2020; Chartier-Harlin et al., 2004; Ibanez et al., 2004]. Недостаточность альфа-синуклеина и, как следствие, нарушение дофаминовой нейротрансмиссии, приводит к нарушению функционирования и гибели нейронов. Другая гипотеза предполагает, что высокотоксичными и вызывающими поражение нейронов являются растворимые промежуточные продукты белковой агрегации альфа-синуклеина - мономеры и протофибриллы. Скорее всего оба эти патологических процесса являются составляющими компонентами патогенного механизма поражения дофаминергических нейронов (**Рис. 4**). Но до сих пор в научных кругах обсуждается вопрос, сами ли тельца Леви токсичны, или они являются лишь механизмом защиты нейрона от токсических растворимых промежуточных продуктов белковой агрегации, которые находятся в функциональном внутриклеточном пространстве [Tompkins & Hill, 1997].

В это же время были получены убедительные доказательства того, что крупные внутриклеточные нерастворимые депозиты, формируемые альфа-синуклеином, не токсичны. А тельца Леви накапливают и нейтрализуют растворимые промежуточные продукты белковой агрегации альфа-синуклеина, поскольку они обладают токсическим эффектом для нейронов. Было показано, что протофибриллы, образованные альфа-синуклеином, могут формировать искусственные поры, изменяющие проницаемость мембран. В сочетании с другими явными дефектами клеточной целостности, это может вызвать утечку везикул с дофамином в цитозоль, где он может вызвать окислительный стресс и гибель клеток [Тарасова Т. В., 2016].

К сожалению, в настоящее время физиологические функции синуклеинов до конца не установлены. Понимание границ между нормальным функционированием эндогенного альфа-синуклеина и его роли в нейродегенеративном процессе должно приблизить научное сообщество к формированию эффективной патогенетической терапии экстрапирамидных расстройств, связанных с синуклеинопатиями.

1.2.2 Патогенез альфа-синуклеинопатии при БП

Болезнь Паркинсона является самой известной и распространенной формой альфа-синуклеинопатии. Направленные исследования роли альфа-синуклеина в патофизиологии БП стали особо актуальны с тех пор, как: (а) было обнаружено, что точечные мутации в гене альфа-синуклеина ответственны за редкую семейную форму БП, которая клинически и патологически неотличима от наиболее распространенной спорадической формы заболевания [Kruger et al., 1998; Polymeropoulos et al., 1997]; и (б) альфа-синуклеин был идентифицирован как основной компонент телец Леви – характерного из патологистологического признака БП [Spillantini, Crowther, Jakes, Hasegawa, & Goedert, 1998]. Отметим, что помимо альфа-синуклеина в составе телец Леви выявляются белки нейрофиламентов, жирные кислоты и полисахариды, так же в больших количествах убиквитин (Рис. 5).

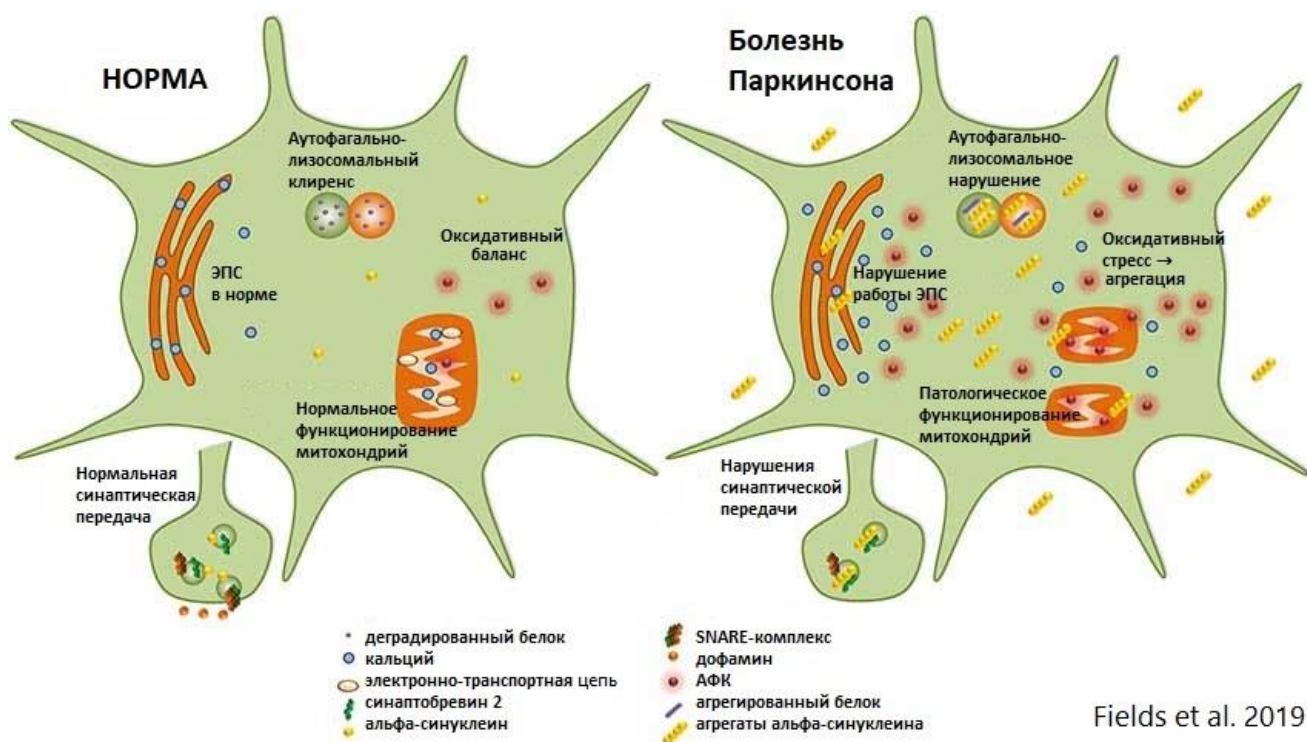


Рисунок 5. Роль альфа-синуклеина в механизмах нейрональной дисфункции при паркинсонизме, сопровождающимся образованием цитотоксических агрегатов. Слева показан нейрон в норме, справа – примеры внутриклеточных нарушений при болезни Паркинсона (БП). В нормальных

условиях аутофагально-лизосомальный клиренс утилизирует белки и другие излишние клеточные продукты метаболизма, но при БП эти механизмы блокируются, вызывая накопление агрегированного белка (убиквитин, альфа-синуклеин). В здоровых клетках функция эндоплазматического ретикулума (ЭПС) сохраняется, однако при БП нарушение работы ЭПС приводит к оттоку кальция в цитоплазму. В здоровых клетках поддерживается физиологическая функция митохондрий, что обусловлено окислительным балансом в частности, в то время как при БП нарушается работа цепи переноса электронов (электронно-транспортная цепь), что вызывает увеличение количества активных форм кислорода (АФК) и приводит к окислительному стрессу.

Адаптировано из обзора [Fields, Bengoa-Vergniory, & Wade-Martins, 2019]

После открытия первой точечной аутосомно-доминантной мутации A53T в гене альфа-синуклеина (SNCA) при семейной форме БП, начались исследования генетики альфа-синуклеина. Такая мутация приводит к нарушению нормальной альфа-спиральной структуры в этой части белковой молекулы и удлиняет соседнюю бета-складчатую область, в результате чего повышаются агрегационные свойства мутантного белка. Все семейные формы с A53T мутацией альфа-синуклеина имели общие черты течения заболевания, например, характеризовались ранним дебютом развития патологии и агрессивным течением с обильным содержанием классических телец Леви в стволовых структурах мозга [Polymeropoulos et al., 1997].

Вскоре была описана другая идентичная мутация в гене SNCA, при которой одна нуклеотидная замена в положении 88 G на C приводила к аминокислотной замене аланина на пролин (A30P) в 30-м положении белковой молекулы [Kruger et al., 1998].

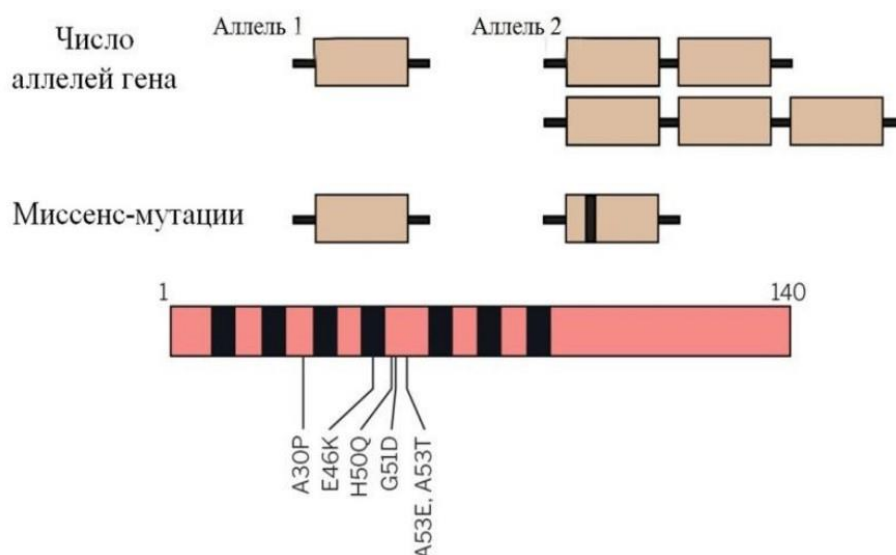


Рисунок 6. Мутации в локусе гена альфа-синуклеина

Заболевание с этой мутацией так же характеризовались ранним дебютом, а агрегационные свойства альфа-синуклеина весьма похожи. Схожими свойствами обладал и другой белок, являющийся результатом еще одной мутации в гене альфа-синуклеина. Так, единичная нуклеотидная замена G на A приводила к аминокислотной замене глутаминовой кислоты на лизин (E46K) в 46м положении молекулы альфа-синуклеина [Zarganz et al., 2004].

Таким образом, в результате исследований больных с наследственными формами БП на начальном периоде исследований было выявлено 6 мутаций, и все они были расположены между вторым и четвертым КТК (E/Q) GV -повторами [Appel-Cresswell et al., 2013; Pasanen et al., 2014]. При этом стоит отметить, что наследственные формы БП с мутациями в гене альфа-синуклеина являются довольно редкими (**Рис. 6**). Однако именно их изучение привело к значительному прогрессу в понимании фундаментальных основ патогенеза БП.

Таким образом мутации в гене альфа-синуклеина могут быть причиной формирования фибрилл амилоидного типа и агрегации этого белка. При этом далеко не для всех семейных форм БП удалось идентифицировать генетические ассоциации. И точечные мутации, и мультипликации в локусе

альфа-синуклеина могут быть не только причиной БП, но и других альфа-синуклеинопатий. Стало так же ясно, что нарушение нормальной локализации белка в клетке является важным патогенетическим фактором в развитии альфа-синуклеинопатии. Не только накопление его в цитоплазме и перевод в нефункциональное агрегированное состояние, но и депривация синаптических терминалей, где в норме наблюдается наибольшее содержание пре-синаптического белка альфа-синуклеина, могут вносить определенный вклад в прогрессию патологии [Тарасова Т. В., 2016].

1.3 МФТП-индуцированный паркинсонизм

Накопленный опыт многочисленных клинических и лабораторных исследований паркинсонизма подтолкнул учёных к созданию экспериментальной модели на животных для более детального изучения патологических путей БП путём использования особых цитонейротоксинов – химических соединений, вызывающих нейродегенерацию компактной части чёрной субстанции и угнетение нигростриатного пути реализации дофамина. Выявление у моделей *in vivo* механизмов селективного повреждения ДА-ергических нейронов в чёрной субстанции является важной фундаментальной задачей в изучении патогенеза БП, что в конечном итоге может стать основой для разработки методов ранней диагностики, а также для создания эффективной патогенетической терапии болезни Паркинсона.

В настоящее время для моделирования катехоламиндефицитных состояний широко используется пронейротоксин 1- метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридин (МФТП), который, успешно проникая через гематоэнцефалический барьер (ГЭБ), воспроизводит большинство клинических, биохимических и патогистологических особенностей БП. МФТП отличается от других нейротоксинов тем, что он последовательно вызывает избирательную дегенерацию нигростриатного пути.

1.3.1 Открытие нейротоксических свойств 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридина (МФТП)

Открытие липофильного соединения МФТП, вызывающего селективное разрушение дофаминергических нейронов нигростриатного пути, оказало значительное влияние на понимание и лечение болезни Паркинсона за последние 30 лет [Langston, 2017], однако история его появления имеет, можно сказать, эвристическое значение. В 1979 году был впервые зарегистрирован случай паркинсонизма, вызванный смесью пиридиновых соединений (1-метил-4-гидрокси-4-фенилпиперидин, 1-метил-4-пропионоксипиперидин и 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридин), которую студенты синтезировали для получения наркотического эффекта. Исследование аутопсийного материала больного, принимавшего наркотическую смесь, указало на деструктивные изменения в области чёрной субстанции среднего мозга, а также на клеточные формирования, напоминающие патогистологические включения при паркинсонизме – тельца Леви [Атаджанов, 1991]. В 1982 году семь молодых людей приобрели тяжелую форму паркинсонизма после того, как сами внутривенно использовали «синтетический героин». Введение прекурсора дофамина L-ДОФА в сочетании с бромокриптином купировало симптомы, однако в течение нескольких месяцев у пяти из семи пациентов наблюдались дискинезии или синдром «включения-выключения» [Ballard, Tetrud, & Langston, 1985; Langston, Ballard, Tetrud, & Irwin, 1983]. Позже методом химического анализа было установлено, что МФТП является побочным продуктом «синтетического героина» 1-метил-4-фенил-4-пропионоксипиперидина (МФПП), который появился в конце XX века на улицах многих городов Северной Калифорнии. Вещество МФПП было синтезировано ещё в 1947 году Зирином и Ли [Ziering & Lee, 1947], однако с тех пор его производство, распространение и даже продажа не контролировались соответствующими органами управления. На основании результатов собственных исследований и предыдущих работ, посвященных

изучению «синтетического героина», учёные Медицинского центра долины Санта-Клара в Сан-Хосе (Калифорния) предположили, что именно МФТП является специфическим нейротоксином, способным избирательно поражать дофаминергические нейроны [Langston, 1987; Langston et al., 1983]. В конечном итоге эта находка стала новым инструментом для изучения нигростриатной дегенерации и способов ее предотвращения, а также послужила поводом для создания новой экспериментальной модели болезни Паркинсона [Biagioni et al., 2021].

Открытие МФТП-индуцированного паркинсонического синдрома спровоцировало целый ряд научных исследований во всём мире, направленных на определение патофизиологических механизмов, лежащих в основе избирательного поражения дофаминергических нейронов компактной части чёрной субстанции, а также подняло на новый уровень изучение вопросов нейрохимии и нейробиологии.

1.3.2 Предполагаемый механизм патологического действия МФТП

К концу XX в. было установлено, что МФТП вызывает обширную избирательную гибель дофаминергических нейронов в черной субстанции [Vivacqua et al., 2020]. Результаты биохимических исследований, а также анализ цитоархитектоники компактной части ЧС выявили снижение содержания дофамина в полосатом теле и уменьшение количества нигростриатных дофаминергических нейронов у некоторых видов животных, обработанных МФТП, а именно – у обезьян [Fox & Brotchie, 2010], собак [Johannessen et al., 1991], кошек [Aznavour et al., 2012], мышей [Tarasova et al., 2018] и даже лягушек [Sokolowski et al., 1990]. Вследствие локальной нейродегенерации, вызванной введением инъекций МФТП в относительно небольших дозах (5-10 мг/кг для собак и кошек; 30 мг/кг для мышей), у этих животных возникает симптомокомплекс (гипокинезия, мышечная ригидность и тремор), типичный для идиопатического паркинсонизма. Стоит отметить,

что высокой чувствительностью к МФТП обладают не все лабораторные животные. Так, для проявления неврологических признаков дисфункции экстрапирамидной системы большинство линий крыс, кроликов и морских свинок обрабатывают относительно более высокими дозами нейротоксина (50-70 мг/кг), что приводит к развитию неспецифических для паркинсонизма нарушений [Волошин М. Я., 1990].

В настоящее время многие биохимические и патофизиологические особенности, лежащие в основе механизма нейротоксического действия МФТП, еще не выяснены [Yang et al., 2021]. Метаболизм МФТП представляет собой сложный, многоступенчатый процесс (**Рис. 7**). Это вещество само по себе не токсично, однако, будучи липофильным соединением, способно проникать в головной мозг. После системного введения протоксин МФТП быстро пересекает гематоэнцефалический барьер (ГЭБ) и в глиальных клетках превращается сначала в 1-метил-4-фенил-2,3-дигидропиридин (МФДП⁺), а затем в свою нейротоксическую форму, конечный метаболит МФТП в ионном состоянии – 1-метил-4-фенилпиридиний (МФП⁺) в результате опосредованного окисления ферментом моноаминоксидазы типа Б (МАО-Б) [Langston, 2017; Sablin et al., 1994]. Поскольку МФП⁺ является полярной молекулой и в отличие от своего предшественника (МФТП) не может свободно проникать внутрь клеток, её доступ будет зависеть от сродства к каналам клеточной мембраны. МФП⁺ обладает высокой аффинностью к плазматическому мембранному транспортеру дофамина (DAT) [Mayer et al., 1986], а также к транспортерам норадреналина и серотонина [Przedborski et al., 2001]. Таким образом, подчеркнём, что избирательное патологическое действие соединения МФП⁺, структурно схожего с нейромедиатором ДА-ергических нейронов – дофамином, основывается на способности нейронов к обратному захвату нейротрансмиттера из синаптической щели для восполнения внутриклеточных запасов и формирования новых везикул [Волошин М. Я., 1990].

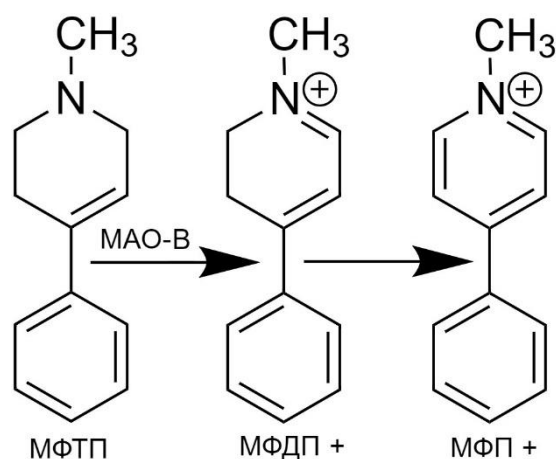


Рисунок 7. Структурная биотрансформация пронеуротоксина МФТП посредством фермента моноаминоксидазы типа В (МАО-В). МФТП (1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридин); МФДП⁺ (1-метил-4-фенил-2,3-дигидропиридин); МФП⁺ (1-метил-4-фенилпиридиний).

Из публикации: Голоборщева В.В., Воронина Н.А., Овчинников Р.К., Кучеряну В.Г., член-корреспондент РАН Морозов С.Г. Моделирование МФТП-индуцированного паркинсонизма на генетически модифицированных мышцах // Патогенез. – 2021. – Т. 19, № 2. – С. 12-23.

После трансформации МФТП в нейроглии (**Рис. 8**), токсический метаболит МФП⁺ высвобождается по неизвестному механизму во внеклеточное пространство и поглощается ДА-ергическими нейронами через дофаминовые транспортеры (DAT) [Chaprov et al., 2021; Chia, Tan, & Chao, 2020; Marti et al., 2017]. Далее МФП⁺ активно концентрируется в митохондриях ДА-ергических нейронов посредством энергозависимых механизмов, где в последствии ингибирует комплекс I митохондриальной цепи переноса электронов (сайт связывания НАДН-дегидрогеназы), что приводит к снижению потребления кислорода, угнетению синтеза молекул АТФ, нарушению ионного гомеостаза и в конечном итоге – к гибели нейронов. [Gluck et al., 1994; Vyas et al., 1986]. Другие исследования показывают, что нейротоксичность МФП⁺ частично опосредована увеличением продукции активных форм кислорода (АФК), особенно супероксида O₂⁻ [Prasad & Hung, 2020; Rossetti et al., 1988], который может вступать в реакцию с экзогенным и

эндогенным оксидом азота (NO), образуя еще один мощный окислитель – пероксинитрит (ONOO^-) [Przedborski et al., 1996; Schulz et al., 1995], способный повредить липиды, белки, ДНК, что также вызывает гибель нейронов.

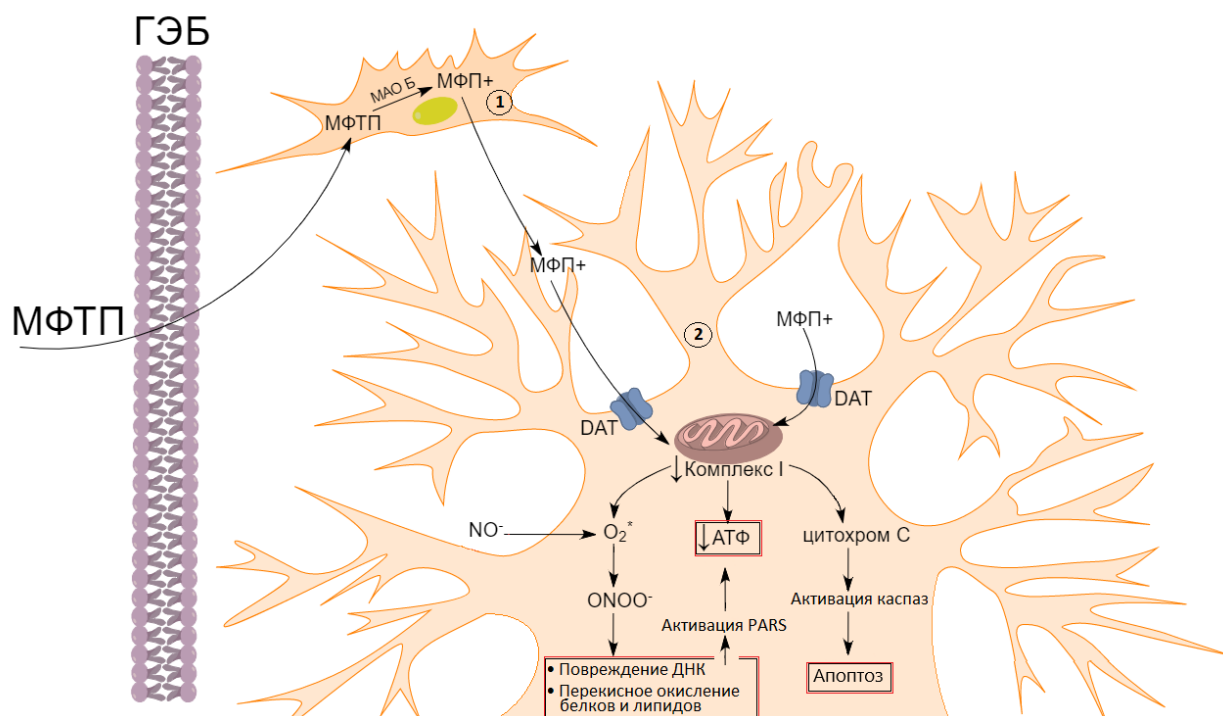


Рисунок 8. Механизмы поражения дофаминергических нейронов в черной субстанции при МФТП-индуцированном паркинсонизме. Липофильное соединение МФТП пересекает гематоэнцефалический барьер (ГЭБ), после чего метаболизируется посредством моноаминоксидазы Б (MAO-Б) в глиальных клетках (1) до токсического метаболита в ионной форме МФП+. Дофаминергические нейроны компактной части чёрной субстанции (2) с помощью мембранного переносчика DAT избирательно захватывают МФП+ из межклеточного пространства. МФП+ накапливается в митохондриях, где ингибирует комплекс I цепи переноса электронов, что приводит к угнетению клеточного дыхания, снижению выработки АТФ, окислительному стрессу, активации каспазного каскада и в конечном итоге – к гибели клетки.

Из публикации: Голоборщев В.В., Воронина Н.А., Овчинников Р.К., Кучеряну В.Г., член-корреспондент РАН Морозов С.Г. Моделирование

МФТП-индуцированного паркинсонизма на генетически модифицированных мышцах // Патогенез. – 2021. –Т. 19, № 2. – С. 12-23.

Хоть и существуют убедительные доказательства, подтверждающие гипотезу о том, что специфическое повреждающее действие МФТП на катехоламинергические нейроны обусловлено двумя основными признаками – энергетическим кризисом и окислительным стрессом [Cleeter et al. 1992; Hasegawa et al., 1990], в последнее время стало очевидно, что МФТП⁺-индуцированная митохондриальная дисфункция также связана с активацией специфических факторов клеточного апоптоза [Mat Taib & Mustapha, 2020; Wu et al., 2021]. Установлено, что поврежденная ДНК стимулирует работу протеазозависимых рецепторов (PARS), что еще больше истощает запасы АТФ. В то же время МФТП⁺ может индуцировать высвобождение цитохрома С из митохондрий в цитозоль, где тот инициирует каскад активации протеолитических ферментов – каспаз, играющих важную роль в процессах апоптоза [Przedborski et al., 2001]. Некоторые другие работы также демонстрируют, что МФТП⁺ может непосредственно ингибировать комплексы дыхательной цепи III (убихинол- цитохром С оксидоредуктаза) и IV (цитохром С - оксидаза) [Mizuno et al., 1988].

Таким образом, все эти факторы могут участвовать в каскаде патогенетических событий, которые в конечном итоге приводят к прогрессивной гибели ДА-ергических нейронов ЧС и снижению уровня дофамина в стриатуме после введения МФТП [Bezard et al., 1999; M. Ugrumov, 2020]. Экспериментальное моделирование МФТП-индуцированного паркинсонизма на животных показало сходный патогенез с идиопатическим паркинсонизмом человека [Prasad & Hung, 2020], поэтому очень важно найти надежные молекулярные биомаркеры, которые помогут отличить БП от других нейродегенеративных состояний, а также отследить его прогрессию или указать на положительный ответ терапевтического вмешательства.

1.4 Моделирование МФТП-индуцированного паркинсонического синдрома на генетически модифицированных мышах и животных с неизменённым (интактным) геномом

БП является уникальным заболеванием человека, поскольку не возникает спонтанно в популяциях животных, а этиология БП остается неизвестной. Таким образом, ни одна экспериментальная модель БП никогда не сможет воспроизвести в точности то заболевание, которое встречается у человека. Однако невропатология, определяющая паркинсонический синдром, то есть дегенерацию дофаминергических нейронов ЧС и истощение запасов дофамина в стриатуме, может воспроизводиться у различных видов животных с помощью введения нейротоксина МФТП.

МФТП-токсическая модель паркинсонизма на мышах линии C57BL/6J с немодифицированным геномом используется, в первую очередь, для изучения патогенных механизмов, лежащих в основе нарушения экстрапирамидной системы и способствующих развитию БП, а также для разработки стратегий нейропротекции. За последние десятилетия было создано множество протоколов для моделирования токсического паркинсонизма непосредственно на мышах, которые объединили по принципу скорости и тяжести проявления клинических признаков на три основные группы: протоколы «острого введения» токсина (то есть несколько доз МФТП за один день), «субхронического введения» (обычно 1-2 дозы в день в течение 5-дневного периода) и протоколы «хронического» введения (в течение 1 месяца и более). Выделим некоторые протоколы введения нейротоксина и обобщим различные модели мышей, на которых воспроизводили МФТП-индуцированный паркинсонизм. Естественно, невозможно проанализировать всю литературу, посвященную использованию МФТП, однако далее будут рассмотрены актуальные исследования, связанные с моделированием паркинсонического синдрома на генетически модифицированных мышах и животных дикого типа, которые являются наиболее репрезентативными для

поиска биомаркеров нарушения экстрапирамидной системы, а также для разработки потенциальной патогенетической терапии паркинсонизма.

1.4.1 Использование животных с немодифицированным геномом

Массовые исследования показали (*Таблица 1*), что интраперитонеальные инъекции МФТП, которые вводили по острому (12–20 мг/кг с интервалом в 2 часа) и субхроническому протоколу (15–20 мг/кг в течение нескольких дней), не только вызывали гибель ДА-ергических нейронов и снижали запасы дофамина в стриатуме, но и значительно нарушали двигательную активность экспериментальных мышей [M. V. Ugrumov et al., 2011; Wu et al., 2015; Xu, Langley, Kanthasamy, & Reddy, 2017; Воронина Н.А. и др., 2019; Козина Е.А. и др., 2016]. Стоит заметить, что использование подобных протоколов обычно не приводит к образованию патогенных цитоплазматических включений у модельных животных. Однако, Gibrat и др. (2009) обнаружили, что хроническое внутрибрюшинное введение МФТП (46 мг/кг в сутки) в течение 14 дней воспроизводило образование нейрональных включений, что сопровождалось экспрессией белка альфа-синуклеина в цитоплазме ДА-ергических нейронов чёрной субстанции [Gibrat et al., 2009].

Biju и др. (2018) вводили 125 мг/кг МФТП (25 мг/кг – доза при 3,5-дневном интервале в течение пяти недель) подкожно самцам линии C57BL/6J и оценивали терапевтическое влияние метиленового синего (1 мг/кг/сут с 11-го по 100-й день с питьевой водой) на фоне МФТП-индуцированной нейротоксичности. Лечение метиленовым синим улучшило двигательную дисфункцию, оцененную посредством теста открытого поля, вертикального шеста, горизонтальной штанги, анализа обонятельной функции и способности формировать гнёзда [Biju et al., 2018].

Zheng и др. (2017) производили инъекции 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридина самцам линии C57BL/6J внутрибрюшинно в

концентрации 30 мг/кг в сутки в течение восьми дней и оценивали эффекты пеонифлорина, биоактивного соединения из корня *Radix Paeonia Alba*. Двигательные нарушения животных, полученные вследствие субхронического введения МФТП, нивелировали введением пеонифлорина и Мадопара® внутривентрикулярно [Zheng et al., 2017].

Таблица 1. Доза, пути введения и характер поражения у животных дикого типа при МФТП-индуцированном паркинсонизме

Линия	Описание линии	Дозировка МФТП	Способ введения нейротоксина	Патологический эффект	Ссылки
C57Bl/6J (JAX# 000664)	Мыши с немодифицированным геномом	12 мг/кг – ранняя стадия; 20 мг/кг – поздняя стадия (4 подхода; интервал - 2 ч.)	и/п	↓числа ДА-нейронов в ЧС, ↓содержание дофамина и его метаболитов, ↑мышечная ригидность, ↑олигокинезия с повышением дозы	[M. V. Ugrumov et al., 2011; Воронина Н.А., 2019; Козина Е.А., 2016]
		15–20 мг/кг (3 подхода; интервал - 1 д.)	и/п	↓числа ДА-нейронов в ЧС, ↓содержания дофамина, отсутствие телец Леви, олигокинезия	[K. C. Wu et al., 2015; Xu et al., 2017]
		25 мг/кг (5 недель; интервал – 3,5 д.)	подкожно	↓числа ДА-нейронов в дорзолатеральной части стриатума (STR dl), ↓числа ДА-нейронов в ЧС, олигокинезия, дизосмия	[Biju et al., 2018]
		30 мг/кг (8 подходов; интервал – 1 д.)	и/п	↓спонтанная двигательная активность, ↓содержание дофамина и его метаболитов, ↓уровней экспрессии генов, кодирующих ТГ и DAT, ↑активность МАО-Б, ↑активность каспаз 3 и 9	[Zheng et al., 2017]
		46 мг/кг (14 подходов; интервал – 1 д.)	и/п инфузия	↓числа ДА-нейронов в ЧС, ↓содержания дофамина, ↓стриатных волокон ТГ, ↑тельца Леви, олигокинезия	[Gibrat et al., 2009]

Примечания: JAX# - номер линии в каталоге The Jackson Laboratory, и/п – интраперитонеально

1.4.2 Использование генетически модифицированных мышей

В результате исследований токсического воздействия МФТП на альфа-синуклеин дефицитных животных было установлено (*Таблица 2*), что количество утилизированного дофамина в стриатуме превышает количество новосинтезированных молекул нейромедиатора, что обусловлено гибелью ДА-ергических нейронов вследствие обработки МФТП. Примечательно, что у альфа- и гамма-синуклеин-нокаутных животных (AbelKO и γ -syn KO) повышалась резистентность ДА-ергических нейронов чёрной субстанции к токсическому воздействию МФТП [Robertson et al., 2004].

Трансгенные 4-месячные мыши G2019S-LRRK2, в геноме которых экспрессируется мутантная форма человеческого гена LRRK22 (Park8), после двух инъекций МФТП подкожно продемонстрировали тяжелые двигательные нарушения, потерю дофаминергических нейронов и астроглиоз в головном мозге, а также терапевтический ответ на L-ДОФА и ингибитор киназы LRRK2-in-1 [Arbez et al., 2020]. Следует отметить, что сверхэкспрессия мутантного гена LRRK2 у мышей увеличивает уязвимость ДА-ергических нейронов к дегенерации при воздействии подострых доз МФТП. Эта модель, сочетающая генетическую модификацию и избирательное цитотоксическое действие МФТП, может помочь прояснить роль белка LRRK2 как при спорадическом, так и при семейном БП, а также имеет потенциал для тестирования новых лекарственных средств.

Andres-Mateos и др. (2009) впервые показали, что инактивация гена LRRK2 у мышей не приводит к потере дофаминергических нейронов. Более того, мыши LRRK2 KO жизнеспособны и имеют продолжительность жизни, неотличимую от животных дикого типа. По всей видимости, у мышей ген LRRK2 не является ключевым для развития и поддержания функции ДА-ергических нейронов [Andres-Mateos et al., 2009]. Проведённое иммуногистохимическое исследование срезов среднего мозга мышей линии LRRK2 KO и животных дикого типа после введения МФТП выявило снижение

числа ТГ-позитивных нейронов в сравнении с контролем, получавшим физраствор. ВЭЖХ-анализ продемонстрировал значительное сокращение уровня дофамина и его метаболитов (ДОФУК и ГВК) в стриатуме у мышей LRRK2 KO, которым вводили МФТП, относительно животных с немодифицированным геномом. Однако статистически значимых различий в оценке числа ТГ(+)-нейронов ЧС и уровней стриатного дофамина после введения МФТП между контрольными мышами и генетическим нокаутом LRRK2 не обнаружено. Необходимы дальнейшие исследования, способствующие выяснению роли LRRK2 в патогенезе БП.

Установлено, что трансгенные линии мышей A53T и A30P экспрессируют различные мутантные формы человеческого гена альфа-синуклеина во всем мозге, включая ЧС, гиппокамп и неокортекс. У модельных животных A53T и A30P сверхэкспрессия мутантного альфа-синуклеина оказывает токсический эффект на ДА-ергические нейроны [Kahle et al., 2000; Lee et al., 2017; Szego, Gerhardt, Kermer, & Schulz, 2012; Szego, Outeiro, Kermer, & Schulz, 2013]. Выраженная дофаминергическая дегенерация, сопровождаемая истощением ТГ(+)-волокон в дорзальном и вентральном стриатуме, а также снижением содержания дофамина и его производных у гомозиготных мышей линии A30P после введения МФТП [Komnig et al., 2018], значительно усугублялась в процессе хронического введения L-ДОФА. Подобное терапевтическое вмешательство приводило также к повышению уровней экспрессии фактора апоптоза p53 [Szego et al., 2012].

Таблица 2 Доза, пути введения и характер поражения у генетически модифицированных животных при МФТП-индуцированном паркинсонизме

Линия	Описание линии	Дозировка МФТП	Способ введения нейротоксина	Патологический эффект	Ссылки
AbelKO (JAX# 003692)	Генетический нокаут альфа-синуклеина (Park4); BG: C57Bl/6J	30 мг/кг (5 инъекций; интервал – 1 д.)	и/п	*проявление резистентности ДА-нейронов ЧС к МФТП ↓ содержания дофамина и его метаболитов, изменение показателей походки	[Chaprov et al., 2021; Robertson et al., 2004]
γ-syn KO (JAX# 008843)	Генетический нокаут гамма-синуклеина; BG: C57Bl/6J	30 мг/кг (5 инъекций; интервал – 1 д.)	и/п	*проявление резистентности ДА-нейронов ЧС к МФТП	[Robertson et al., 2004]
G2019S-LRRK2 (JAX# 018785)	Трансгенные мыши, в геноме которых экспрессируется мутантная форма LRRK2 человека (Park8); BG: C57Bl/6J	2,5 мг/кг (2 инъекции; интервал – 1 д.)	подкожно	↓ числа ДА-нейронов ЧС, астроглиоз, тяжелые двигательные нарушения, *терапевтический ответ на введение L-ДОФА	[Arbez et al., 2020]
LRRK2 KO (JAX# 016121)	Генетический нокаут лейцин-богатой повторяющейся киназы 2 (Park8); BG: C57Bl/6J	20 мг/кг (4 инъекции; интервал – 2 ч.)	и/п	↓ числа ДА-нейронов ЧС, ↓ содержания дофамина и его метаболитов	[Andres-Mateos et al., 2009]
A53T (JAX# 004479)	Трансгенные мыши, в геноме которых экспрессируется мутантная форма альфа-синуклеина человека (A53T); BG: B6/C3H	10 мг/кг (5 инъекций; интервал – 1 д.)	и/п	↓ числа ДА-нейронов ЧС, *выраженные сенсо- и локомоторные нарушения	[Lee et al., 2017]
A30P [Kahle et al., 2000]	Трансгенные мыши, в геноме которых экспрессируется мутантная форма альфа-синуклеина человека (A30P); BG: C57Bl/6J	30-35 мг/кг (5 инъекций; интервал – 1 д.)	и/п	↓ числа ДА-нейронов ЧС, ↓ экспрессии DAT, ↓ содержания дофамина и его метаболитов, ↓ количества альфа-синуклеина в синапсах, *введение L-ДОФА => ↓ ДА-нейронов ЧС	[Komnig et al., 2018; Szego et al., 2012; Szego et al., 2013]
Pink1 KO (JAX# 017946)	Генетический нокаут PTEN-индуцированной киназы-1 (Park6); BG: C57Bl/6J	25 мг/кг (5 инъекций; интервал – 1 д.)	и/п	↓ числа ДА-нейронов ЧС, ↓ плотности DAT, ↓ содержания дофамина и его метаболитов	[Haque et al., 2012]
DJ-1 KO (JAX# 023968)	Генетический нокаут дегликазы 1 (Park7); BG: C57Bl/6J	30 мг/кг (4-5 инъекций; интервал – 1 д.)	и/п	↓ числа ДА-нейронов ЧС, ↓ содержания дофамина, олигокинезия, ↓ плотности стриатных ТГ(+)-волокон	[Aleyasin et al., 2010; Takahashi-Niki et al., 2015]
GBA^{+/L444P} (MMRRC# 000117-UNC)	Гетерозиготные мыши линии GBA ^{L444P} с делецией гена глюкоцереброзидазы; BG: C57Bl/6J	20 мг/кг (4 подхода; интервал - 2 ч.)	и/п	↓ числа ДА-нейронов ЧС, ↓ плотности стриатных ТГ(+)-волокон, ↓ содержания дофамина и его метаболитов, *выраженные митохондриальные и моторные дисфункции	[S. P. Yun et al., 2018]
TLR4 KO (NBRI# 000192)	Генетический нокаут Toll-подобного рецептора 4 (PRR-группы); BG: C57Bl/6J	25 мг/кг (10 инъекций; интервал – 4 д.)	подкожно	*проявление резистентности ДА-нейронов ЧС к МФТП, ↓ активации астроцитов и микроглии, ↓ олигокинезии, ↓ образования АФК, ↓ мутаций альфа-синуклеина	[Shao et al., 2019]
σ1R KO [Sabino, Cottone, Parylak, Steardo, & Zorrilla, 2009]	Генетический нокаут трансмембранного белка сигма-1R; BG: C57Bl/6J	25 мг/кг (10 инъекций; интервал – 3,5 д.)	подкожно	*проявление резистентности ДА-нейронов ЧС к МФТП, ↓ активации астроцитов и микроглии, ↓ олигокинезии, ↓ экспрессии DAT	[Hong et al., 2015]

Примечания: BG – генетический фон, и/п – интраперитонеально, ТГ- тирозингидроксилаза, JAX# – номер линии в каталоге The Jackson Laboratory, MMRRC# – номер линии в каталоге Mutant Mouse Resource & Research Centers, NBRI# – номер линии в каталоге Nanjing Biomedical Research Institute.

В работе Lee и др. (2017) продемонстрировано, что введение МФТП в дозе 10 мг/кг индуцировало потерю дофаминергических нейронов у геми- и гомозиготных трансгенных мышей A53T, но не у контрольных животных дикого типа. Кроме того, гомозиготные трансгенные особи проявляли более высокую чувствительность к введению МФТП. Поведенческие тесты также выявили достоверно значимое проявление сенсо- и локомоторных нарушений у мутантных мышей [Lee et al., 2017].

PTEN-индуцированная киназа-1 (Pink1, Park6) – последний идентифицированный ген, который в рецессивном гомозиготном состоянии приводит к БП. Экспрессия эндогенной Pink1 предотвращает гибель стриатных нейронов вследствие воздействия патогенных факторов, включая МФТП⁺. Naque и др. (2012) изучили, как потеря функциональной Pink1 может повлиять на выживаемость ДА-ергических нейронов при МФТП воздействии. Полученные результаты продемонстрировали: (а) животные с дефицитом Pink1 от рождения более восприимчивы к МФТП по сравнению с животными дикого типа и (б) это, вероятно, не связано с компенсаторными механизмами в онтогенезе, поскольку конвенционный нокаут Pink1, у которого прижизненно производят инактивацию PTEN-индуцированной киназы-1, демонстрирует аналогичные результаты [Naque et al., 2012].

DJ-1 был впервые идентифицирован группой учёных университета Хоккайдо в качестве онкогена, а позже было установлено его непосредственное участие в формировании семейной формы БП (Park7). Введение МФТП в концентрации 30 мг/кг влияло на DJ-1 дефицитных мышей сильнее, чем на контрольных животных, получавших физраствор, с точки зрения времени удержания на стержне в «Rota-rod» тесте (снижение на 40%), потерь дофаминергических нейронов и содержания дофамина в стриатуме [Aleyasin et al., 2010; Takahashi-Niki et al., 2015].

Результаты Yun и др. (2018) показали, что гетерозиготная мутация L444P глюкоцереброзидазы (GBA) сделала нигростриатную ДА-ергическую

систему более восприимчивой к МФТП. Гетерозиготные мыши GBA^{+/-L444P} продемонстрировали худшую Паркинсон-подобную патологию в ответ на МФТП-интоксикацию (значительное снижение числа нигростриатных ДА-ергических нейронов, истощение дофамина, выраженная моторная дисфункция, митохондриальные дефекты и глиальная пролиферация) по сравнению с контрольными животными дикого типа. Модель GBA^{+/-L444P} представляет собой ценную систему для изучения молекулярного механизма, который определяет, какую роль играют факторы окружающей среды в патогенезе БП [S. P. Yun et al., 2018].

Toll-подобные рецепторы (TLR)-это семейство паттерн-распознающих рецепторов (PRR), которые определяют консервативные структуры микроорганизмов и активируют клеточный иммунный ответ, а также высоко экспрессируются на мембране микроглии и активно участвуют в процессе нейровоспаления при повреждении ЦНС. В рамках исследования роли недостаточности TLR4 при МФТП-индуцированном паркинсонизме Shao и др. (2019) было установлено, что TLR4-дефицитные мыши более устойчивы к токсическому воздействию нейротоксина. У этих животных наблюдали снижение количества патогенного альфа-синуклеина, ослабление моторных нарушений, степени нейровоспаления и окислительного стресса. Дальнейшие исследования все еще необходимы для изучения того, является ли фармакологическая модуляция TLR4 перспективной стратегией для терапии БП [Shao et al., 2019].

Сигма-1 рецептор (σ 1R, опиоидный рецептор сигма-1) в основном обнаруживается в мотонейронах, локализованных в стволе головного и спинного мозга, а также в дофаминергических нейронах и астроцитах. В работе Hong и др. (2015) было исследовано избирательное цитотоксическое действие МФТП на моделях *in vivo* с генетическим нокаутом σ 1R [Sabino et al., 2009]. Установлено, что дефицит σ 1R может облегчить МФТП-индуцированный паркинсонизм, а именно уменьшить гибель

дофаминергических нейронов, снизить экспрессию дофаминового переносчика (DAT) в черной субстанции, нивелировать моторные нарушения, ослабить активацию астроцитов и микроглии [Hong et al., 2015].

Масштабные исследования БП на моделях животных показали, что агрегация альфа-синуклеина, окислительный стресс, митохондриальная дисфункция и нейровоспаление играют фундаментальную роль в возникновении и прогрессировании патогенеза БП. Нейротоксин МФТП воздействует на митохондрии дофаминергических нейронов чёрной субстанции, ингибируя активность комплекса I цепи переноса электронов, и, таким образом, в дальнейшем инициирует избирательную нейродегенерацию нигральных ДА-ергических нейронов, которая приводит к развитию паркинсонического синдрома. В настоящее время существуют различные протоколы введения нейротоксина МФТП для моделирования нигростриатной дисфункции на лабораторных животных. Создание идеальной экспериментальной модели для воспроизведения фенотипических и патологических особенностей БП человека, в настоящее время остается ключевой и трудной задачей. Безусловно, такая модель была бы полезна для полного понимания патогенеза БП, а также для разработок методов ранней диагностики начальных стадий патологии ДА-ергических нейронов и для выявления потенциальных молекулярных мишеней, на основе которых может быть разработана стратегия создания патогенетической терапии БП и других экстрапирамидных расстройств.

1.5 Достоинства и недостатки нейротоксической модели на мышах

БП в большинстве случаев невозможно распознать на ранней стадии из-за длительного латентного периода между начальным повреждением ДА-ергических нейронов и манифестацией клинических симптомов: олигокинезии, тремора, ригидности. Экспериментальная модель экстрапирамидных расстройств, полученная путём введения нейротоксина

МФТП в организм животного (*in vivo*), в конце XX века стала основной системой для выявления патогенетических механизмов паркинсонизма и разработки эффективной симптоматической терапии, поскольку клинически и патогистологически точно воспроизводила основные характеристики БП [Langston, 2017; Prasad & Hung, 2020; Schneider J.S., 2008]. МФТП – нейротоксин, который вызывает целый ряд внутриклеточных поражений, таких как окислительный стресс, митохондриальная дисфункция, апоптоз, воспаление, эксайтотоксичность и образование цитотоксических белковых агрегатов, приводящих в конечном итоге к повреждению ДА-ергических нейронов в компактной части черной субстанции и полосатом теле (стриатуме) [Mat Taib & Mustapha, 2020].

На протяжении многих десятилетий токсическая экспериментальная модель паркинсонизма *in vivo* была золотым стандартом в исследованиях БП, однако последние работы показывают, что она не полностью воспроизводит идиопатическую форму паркинсонизма [Francardo, 2018; Schneider J.S., 2008]. При медленно прогрессирующем паркинсонизме происходят изменения не только в ДА-ергических нейронах среднего мозга, поскольку мозг пытается компенсировать потерю дофамина. Невозможность воспроизведения всех патологических изменений, характерных для идиопатического паркинсонизма, в конечном итоге может стать большим упущением при разработке симптоматической терапии, а также при создании эффективных методов лечения БП [Mat Taib & Mustapha, 2020].

Однако многочисленные современные исследования, направленные на разработку противопаркинсонической терапии, показали обнадеживающие результаты при использовании доклинической МФТП-индуцированной модели на мышах [Liu et al., 2020; Mei et al., 2019; Rai et al., 2019; Rao, Sharma, & Kalivendi, 2020; Singh et al., 2020; Togashi et al., 2020; Yadav, Rai, & Singh, 2017]. Примененные в этих работах препараты доказали свою эффективность в способности замедлять и фактически предотвращать симптомы БП. Тем не

менее вопрос о том, могут ли эти доклинические результаты быть переведены в клинические испытания, остаётся открытым. Соответственно, МФТП-токсическая модель паркинсонизма имеет ряд достоинств и недостатков.

Достоинства МФТП-индуцированной модели БП на мышах:

1. Модель способна воспроизводить ключевые клинические (олгигокинезия, тремор, ригидность) и патофизиологические (потеря ДА-ергических нейронов в ЧС) особенности паркинсонизма у экспериментальных мышей, свойственные человеческой форме БП [Nataraj, Manivasagam, Thenmozhi, & Essa, 2016; Vidyadhara, Yarreiphang, Abhilash, Raju, & Alladi, 2016].
2. Использование токсической модели паркинсонизма *in vivo* улучшило наши знания о молекулярном и клеточном механизме, лежащем в основе БП [Dutta et al., 2019; Kin, Yasuhara, Kameda, & Date, 2019; Maiti, Manna, & Dunbar, 2017].
3. Метод моделирования на мышах более дешёвый и простой относительно других животных моделей, индуцированных нейротоксином МФТП, а также более доступный с точки зрения этических соображений [Blesa & Przedborski, 2014; J. W. Yun, Ahn, & Kang, 2015].
4. Есть возможность выявлять специфические немоторные симптомы БП [Choudhury & Daadi, 2018].
5. В электрофизиологических исследованиях Wallace и др. сообщили о роли МФТП-мышинных моделей в терапии, связанной с глубокой электрической стимуляцией мозга [Wallace et al., 2007].
6. Применение МФТП-индуцированной модели на мышах продвинуло научное сообщество в понимании роли митохондриальной дисфункции при БП [Ding et al., 2020; Meredith & Rademacher, 2011], расширило знания о значении аутофагии в патогенезе БП [Hou, Watzlawik, Fiesel, & Springer, 2020; Hu et al., 2017], а также помогло в разработке перспективных терапевтических

стратегий нейропротекции и нейрореабилитации [Mingazov et al., 2018].

7. Согласно данным Filograna и др., МФТП-токсическая модель паркинсонизма *in vivo* привела к значительному прогрессу в клинических исследованиях БП [Filograna, Beltramini, Bubacco, & Bisaglia, 2016].

Недостатки МФТП-индуцированной модели БП на мышах:

1. Наиболее распространенным недостатком этой модели является то, что она в большинстве исследований редко вызывает образование внутриклеточных агрегатов – телец Леви [Blesa & Przedborski, 2014].
2. Поведенческие и некоторые моторные особенности паркинсонизма человека трудно продемонстрировать в этой модели [Lindholm et al., 2016].

Таким образом, экспериментальная МФТП-индуцированная модель паркинсонизма на мышах расширила наше понимание о клеточных и молекулярных механизмах, лежащих в основе гибели ДА-ергических нейронов в ЧС, и предоставила исследователям возможность изучить нейропротекторные и пронейрогенные возможности многих терапевтических веществ для лечения БП. Отметим, что эта модель может быть в дальнейшем усовершенствована для того, чтобы можно было восстановить все патологические и фенотипические особенности БП человека. Вероятно, улучшенная модель может быть получена путем объединения нейротоксина МФТП и генетически модифицированных мышей, чтобы в полной мере оценить прогрессирующую нейродегенерацию, связанную с БП. Можно заключить, что МФТП-токсическая модель паркинсонизма на мышах является репрезентативной и способна помочь исследователям разработать эффективную патогенетическую терапию больных с БП и приблизиться к излечению этого нейродегенеративного заболевания, а специально подобранный в данной работе протокол введения МФТП альфа-синуклеин нокаутным животным теоретически может положить начало для нового подхода в исследовании роли функции альфа-синуклеина в патогенезе БП.

Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Работа с лабораторными животными

2.1.1 Линии экспериментальных мышей

В работе были использованы следующие чистые линии мышей (не менее 6 возвратных скрещиваний) на генетическом фоне C57Bl/6J (Charles River Laboratory, США).

Abel-KO: линия мышей с массивной делецией гена альфа-синуклеина (размер делеции ~3,2 Kb) была получена из лаборатории A. Rosenthal (Genentech, США) [Abeliovich et al., 2000]. Название и номер из каталога The Jackson Laboratory – B6.129X1-Snca^{tm1Rosl}/J и 003692, соответственно.

ΔFlox-KO: линия животных с конститутивным нокаутом гена альфа-синуклеина, несущая минимальные геномные модификации, была получена из лаборатории В.Л. Бухмана (Кардифф, Великобритания) [Ninkina et al., 2015]. Название и номер из каталога The Jackson Laboratory – B6(Cg)-Snca^{tm1.1Vlb} и 025636, соответственно.

β-KO: линия мышей с селективной инактивацией гена бета-синуклеина была получена из лаборатории T. Sudhof (Genentech, США) [Chandra et al., 2004]. Название и номер из каталога The Jackson Laboratory – B6.129-Sncb^{tm1Sud/J} и 008133, соответственно.

γ-KO: линия мышей с делецией гена, кодирующего гамма-синуклеин, была получена из лаборатории В.Л. Бухмана (Кардифф, Великобритания) [Ninkina et al., 2003]. Название и номер в каталоге The Jackson Laboratory – B6.129P2-Sncg^{tm1Vlb/J} и 008843, соответственно.

Новые линии, выведенные в ходе работы, были переведены на C57Bl/6J генетический фон путём обратного скрещивания в 6 поколениях. Все животные содержались в конвенциональной зоне SPF-вивария барьерного типа в условиях искусственного регулирования светового дня (12 часов

находились при освещении, 12 часов – в отсутствии) при температуре +20-25°C, влажности 30-70% и в свободном доступе к корму и воде. Работы с животными проводили в соответствии с "Правилами лабораторной практики в Российской Федерации" от 01.04.2016 г. № 199н.

2.1.2 Протокол введения МФТП

В возрасте 3 месяцев экспериментальным животным внутрибрюшинно вводили водный раствор МФТП (30 мг/кг в сутки) в течение 5 дней. Контрольным группам животных вводили изотонический раствор хлорида натрия (NaCl 0,9%). Вследствие потенциальных потерь животных в результате неспецифической острой токсичности МФТП, размер экспериментальных групп был заведомо больше относительно контрольных.

2.1.3 Инструментальные методы оценки локомоторной функции животных

Через 21 день после введения последней инъекции было проведено поведенческое тестирование всех животных. Этот период времени считается достаточным для адаптации и частичного восстановления основных физиологических функций животных после субхронического токсического инсульта, спровоцированного МФТП. Таким образом, в поведенческих тестах исследованы долгосрочные последствия нейротоксического действия МФТП на нейроны нигростриатной системы. Ранее этот протокол был успешно использован для выявления дифференциальной чувствительности популяций ДА-нейронов у нокаутных по синуклеинам мышей [Anwar et al., 2011; Robertson et al., 2004]. Сенсомоторные нарушения оценены в тесте с вертикальным шестом, на перевёрнутой сетке и с применением современной многофункциональной установки «CatWalk XT».

Тест на вертикальном шесте. Для оценки брадикинезии, являющуюся клиническим признаком экспериментально вызванного МФТП-

индуцированного паркинсонизма, использовали тест на способность животного распределять тело в пространстве на тонком шесте и спускаться с него. В начале тестирования животное было помещено на вершину вертикального неполированного шеста с грубой поверхностью высотой 50 см и диаметром 1,5 см таким образом, чтобы её голова была ориентирована вверх. Спускалось животное на платформу, в которой закреплён шест. Тестирование было проведено трижды, а результат зафиксирован на видеокамеру. Минимальный перерыв между тестами составил 1 минуту. Тест считался успешным, если мышь успевала переориентировать своё тело и начать спуск в течение первых 150 сек тестирования. Если этого не происходило во всех трёх испытаниях, данные такого анализируемого животного не учитывались при статистической обработке. Для статистического анализа было отобрано максимальное для каждой мыши (в 2 или 3 тестах) время спуска с шеста [Anwar et al., 2011; Connor-Robson et al., 2016].

Тест «перевернутая сетка». Координацию движений и равновесие животных определяли в тесте на способность удерживаться на перевернутой сетке. Замеряли время до падения животных в трех попытках, засчитывали максимальное значение. Максимальное время удержания – 60 сек. Если время удержания составляло 60 сек, то повторных попыток не проводили. Для статистической обработки использовано максимальное значение времени нахождения на сетке до падения [Anwar et al., 2011; Connor-Robson et al., 2016; Ninkina et al., 2020].

Многофункциональный метод исследования двигательной активности на установке CatWalk XT. Сравнительный анализ моторной функции экспериментальных и контрольных когорт животных был проведён на высокотехнологичной установке CatWalk XT, позволяющей одновременно оценивать порядка 250 параметров двигательной функции исследуемого животного.

CatWalk XT (Noldus, Нидерланды) – программно-аппаратный комплекс, включающий стеклянную пластину, над которой располагается подвижная платформа, формирующая конструкцию коридора и образующая в опущенном состоянии подсвеченный туннель (Рис. 9).



Рисунок 9. Установка CatWalk XT (Noldus, Нидерланды).

Сверху на туннель опускали иллюминированный потолок с программируемым освещением туннеля. По всей длине пластины проходит невидимый снаружи зеленый свет, который высвобождается лишь в зоне контакта конечностей животного с пластиной. Благодаря технологии Illuminated Footprints, положение следа детально фиксируется высокоскоростной видеокамерой, расположенной под пластиной.

Перед началом тестирования проводили адаптацию животных к экспериментальным условиям. Для этого за неделю до тестирования помещали мышь в чисто вымытый аппарат и оставляли на 10 минут, позволяя животному адаптироваться внутри коридора для пробегов, изучить дорожку и стенки. За 3 дня до тестирования повторяли адаптацию в течение 15 минут и позволяли животному совершить несколько пробежек по стеклянной пластине. В день тестирования животное совершало три пробежки. В

установке снимали показатели по 210 параметрам для подробной характеристики походки животного. Проводили обработку этих данных с помощью программного обеспечения CatWalk XT10.6 (Noldus, Нидерланды).

2.1.4 Диссекция структур головного мозга мышей

Через 21 день после последнего введения МФТП животных подвергали декапитации, извлекали головной мозг и помещали его на закрытую чашку Петри со льдом. На охлажденной поверхности чашки рассекали мозг на два полушария, помещали под бинокуляр и диссектировали стриатум для последующего проведения ВЭЖХ-анализа с целью исследования содержания дофамина и его метаболитов (**Рис. 10**).

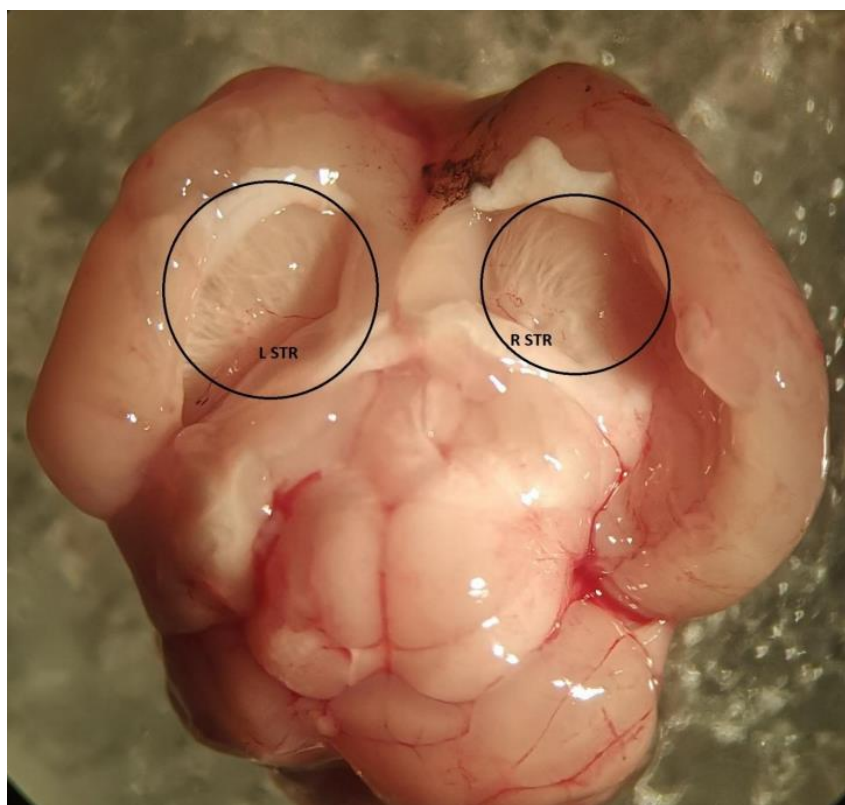


Рисунок 10. Препарирование левого и правого стриатума (L_STR и R_STR) головного мозга мыши.

Для морфометрического анализа рассечённые полушария головного мозга животных соединяли обратно, после чего цельный биоматериал

незамедлительно помещали в маркированную гистологическую кассету и фиксировали в холодном растворе Карнуа в течение ночи (+4°C).

2.2 Молекулярно-биологические методы

2.2.1 Выделение нуклеиновых кислот из образцов тканей

Для формирования экспериментальных и контрольных групп животных было проведено генотипирование потомства общих гетерозиготных производителей синуклеин-дефицитных линий. Перед выделением ДНК проводили протеолиз образцов тканей. Биопсии уха или хвоста весом от 10 до 100 мг исследуемого животного помещали в пробирку с 50 мкл раствора лизирующего буфера без SDS (100 mM NaCl, 50 mM Трис-HCl, 2 mM ЭДТА) и добавляли протеиназу-К до конечной концентрации 0,5 мг/мл, после чего инкубировали в течение 18 часов при 56°C. Инактивировали протеиназу К прогреванием при температуре 85°C в течение 60 минут в термостате «Термит» (ДНК-технология, Россия).

2.2.2 Конвенционная полимеразная цепная реакция

Детекцию мутантных аллелей определяли методом конвенционной ПЦР. Реакцию проводили в 25 мкл в ПЦР буфере (300 mM Трис-HCl pH=8.0; 166 mM (NH₄)₂SO₄; 25 mM MgCl₂; 0,2 mM dNTP) (Евроген, Россия), добавляли соответствующие праймеры (**Таблица 3**) до конечной концентрации 0,15 мкМ каждый, и 2 U Taq-полимеразы. В качестве матрицы использовали 2 мкл геномной ДНК из неочищенных лизатов биопсийного материала.

Таблица 3. Праймеры для определения мутантных аллелей:

Линия	Праймер	Последовательность праймера (5'– 3')	ПЦР продукт (п.о.)
Abel-KO	NeoA	ATGGAAGGATTGGAGCTACG	520 (ДТ)
	AKoC2	AAGGAAAGCCGAGTGATGTAC	450 (КО)
	aSupS	CAGCTCAAGTTCAGCCACGA	
ΔFlox-KO	A_Int1For	TGCTGGGCACAGTGTTGATTG	406 (Флкс)
	A_Int1Rev	AAAGGCTGGGCTTCAAGCAG	354 (ДТ)
	Cre Rev	CATGAGTACTTGTGGCTCAC	280 (Δ Флкс)
β-KO	bynUp	AGGACACCACTGGCCCCGAGTCC	320 (ДТ)
	bynKo	TGCCCCTGAAATGCTGCGCC	300 (КО)
	bynWT	GACGCACGTCCGCACGTCCACCC	
γ-KO	GDN	GGGCTGATGTGTGGCTATCT	490 (ДТ)
	NeoB	CTGAAGAACGAGATCAGCAGCCT	397 (КО)
	SAUP	AGTCCTGGCACCTCTAAGCA	

Сиквенсы праймеров подбирали в соответствии с температурой отжига в диапазоне от 58°C до 62°C. Амплификацию проводили на аппарате Mastercycler Nexus (Eppendorf AG, Германия) согласно программе:

Этап 1: первичная Денатурация	95°C 2 минуты
Этап 2: Денатурация	95°C 15 секунд
Этап 3: Отжиг праймеров	60°C 20 секунд
Этап 4: Элонгация олигонуклеотидной цепи	72°C 30 секунд
45 циклов со 2 по 4 этап	

В эксперимент включали только нокаутных и контрольных мышей дикого типа, а гетерозиготных животных удаляли из дальнейшего эксперимента.

2.2.3 Оценка уровней экспрессии мРНК методом количественной ОТ-ПЦР

Чтобы выяснить, могут ли различные модификации локуса альфа-синуклеина (Snca) влиять на экспрессию гена мультимерин 1 (Mmrn-1), расположенного всего в 160 Kb от Snca, было исследовано содержание мРНК Mmrn-1 в коре головного мозга методом ПЦР с обратной транскрипцией в реальном времени (ОТ-ПЦР).

Из тканей коры головного мозга самцов в возрасте 3 месяцев выделяли тотальную РНК с помощью наборов с колонками для очистки препаратов от примесей геномной ДНК – RNeasy Plus Mini (Qiagen, Германия) по инструкции производителя. Объем образцов для выделения был унифицирован и составлял 30 мг. Препарирование тканей происходило на льду, после чего образцы немедленно помещались в стабилизирующий буфер с добавлением 0.1М бета-меркаптоэтанола и гомогенизировались до однородной массы. Концентрацию выделенной РНК измеряли на спектрофотометре NanoDrop ND100 (ThermoScientific, США), после чего аликвоты РНК хранили в морозильной камере при -80°C. Далее полученную смесь в объеме 2 мкг очищенной РНК использовали для синтеза комплементарной цепи ДНК в реакции обратной транскрипции и последующей амплификации реагентами qPCRmix-HS SYBR (Евроген, Россия) по протоколу производителя в режиме реального времени в установке BioRad CFX 96 (BioRad, США).

Для анализа уровня экспрессии гена Mmrn-1 использовали праймеры:

Mmrn1-for: 5'- GGACACTGGCTCTCATTTAC -3';

Mmrn1-rev: 5'- CAGCATTGGATGTCTTCTGAG -3'.

В качестве референсного гена внутреннего контроля использовали глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназу (GAPDH) мыши.

Последовательности праймеров:

q_m_GAPDH_for: 5'- CACTGAGCATCTCCCTCACA -3';

q_m_GAPDH_rev: 5'- GTGGGTGCAGCGAACTTTAT -3'.

2.3 Биохимические методы

2.3.1 Электрофорез ДНК-фрагментов в агарозном геле

Разделение ДНК-фрагментов проводили при помощи электрофореза в 2,0% и 3% (для линии β -КО) агарозном геле в 1xTAE буфере (40 mM Трис-HCl, 20 mM уксусной кислоты, 1 mM ЭДТА) с добавлением бромистого этидия до концентрации 0,5 мкг/мл в установке для электрофореза Biorad Sub-Cell GT (Bio-Rad, США). В качестве маркера для определения длин фрагментов ДНК использовали 1 kb DNA Ladder (Евроген, Россия). Документирование результатов осуществляли с помощью системы BioSpectrum AC Chemi HR 410 (UVP, США) после визуализации ДНК в проходящем ультрафиолетовом свете.

2.3.2 Анализ нейрохимических веществ полосатого тела методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ)

Образцы дорсальных стриатумов извлекали на холоде и немедленно замораживали в жидком азоте с последующим хранением при температуре -80°C. Анализировали содержание дофамина и его метаболитов: диоксифенилуксусной кислоты (ДОФУК) и гомованилиновой кислоты (ГВК) путём гомогенизации по 6–12 стриатумов в 300 мкл 0.06 М перхлорной кислоты (HClO₄), центрифугировали при 15000 об/мин в течение 5 мин при температуре 4°C. В осадках определяли концентрацию белка с помощью

стандартного набора Pierce™ BCA Protein Assay Kit (“Thermo Scientific™”, США). Супернатант (50 мкл) наносили на откалиброванную фазовую колонку размером 4.6 × 150 мм C18 Microsorb MV™ HPLC Column (“Varian Inc.”, США) и измеряли с помощью электрохимического детектора Decade II Electrochemical Detector (“Antec Scientific”, Нидерланды) с рабочим электродом из стеклоуглерода (Antec Leyden, Нидерланды), настроенным на 0.7 В относительно электрода сравнения Ag/AgCl. Скорость потока была установлена на уровне 0,6 мл/мин. В рамках измерения концентрации дофамина и его метаболитов подвижная фаза состояла из 12% (по объему) метанола (CH₃OH), 0.1 М монофосфата натрия (Na₃PO₄), 2.4 мМ 1-октан сульфокислоты (C₈H₁₇NaO₃S) и 0.68 мМ EDTA, pH 3.1. Для анализа полученных данных использовали программное обеспечение ALEXYS (Antec Leyden, Нидерланды).

2.4 Гистологическое исследование

2.4.1 Фиксация тканей мозга взрослых мышей

Через 21 день после последней инъекции МФТП у животных извлекали головной мозг и помещали в подписанную гистологическую кассету. Фиксацию тканей для последующего иммуногистохимического анализа проводили в холодном растворе Карнуа при 4°C в течение ночи. Раствор был приготовлен по следующему алгоритму:

Раствор Карнуа (в расчёте на 100 мл):

Спирт 96%	60 мл
Хлороформ	30 мл
Ледяная уксусная кислота	10 мл

На следующий день образцы отмывали от фиксирующего раствора в фосфатно-солевом буфере (ФСБ) и проводили дегидратацию тканей при комнатной температуре методом последовательного инкубирования в серии спиртов с повышением концентрации по схеме:

96% EtOH	3x5 мин
100% EtOH	15 мин
100% EtOH	45 мин
EtOH 96% - Хлороформ (1:1)	30 мин
Хлороформ	1 час
Хлороформ (новый)	на ночь (+4°C)

Дегидратированные ткани головного мозга мышей насыщали расплавленным парафином в сухом термостате при 60°C (по 1 ч в 3 смены). Заключение в парафиновые блоки проводили при помощи полуавтоматической станции для заливки парафиновых блоков Leica EG1160 (Leica Biosystems, Германия).

2.4.2 Приготовление гистологических препаратов

Срезы толщиной 8 мкм производили на ротационном микротоме Leica RM2265 (Leica Biosystems, Германия). Полученные парафиновые образцы выкладывали в водяную баню с дистиллированной водой, подогретой до 38°C, после чего их монтировали на предметные стекла с полилизинным покрытием (Thermo Scientific, Великобритания) (**Рис. 11**).

Далее срезы подвергались депарафинизации в ксилоле (3 раза по 5 мин) с последующей регидратацией в серии спиртов понижающейся концентрации (100%, 95%, 70%) при комнатной температуре, после чего их промывали в дистиллированной воде в течение 10 минут.

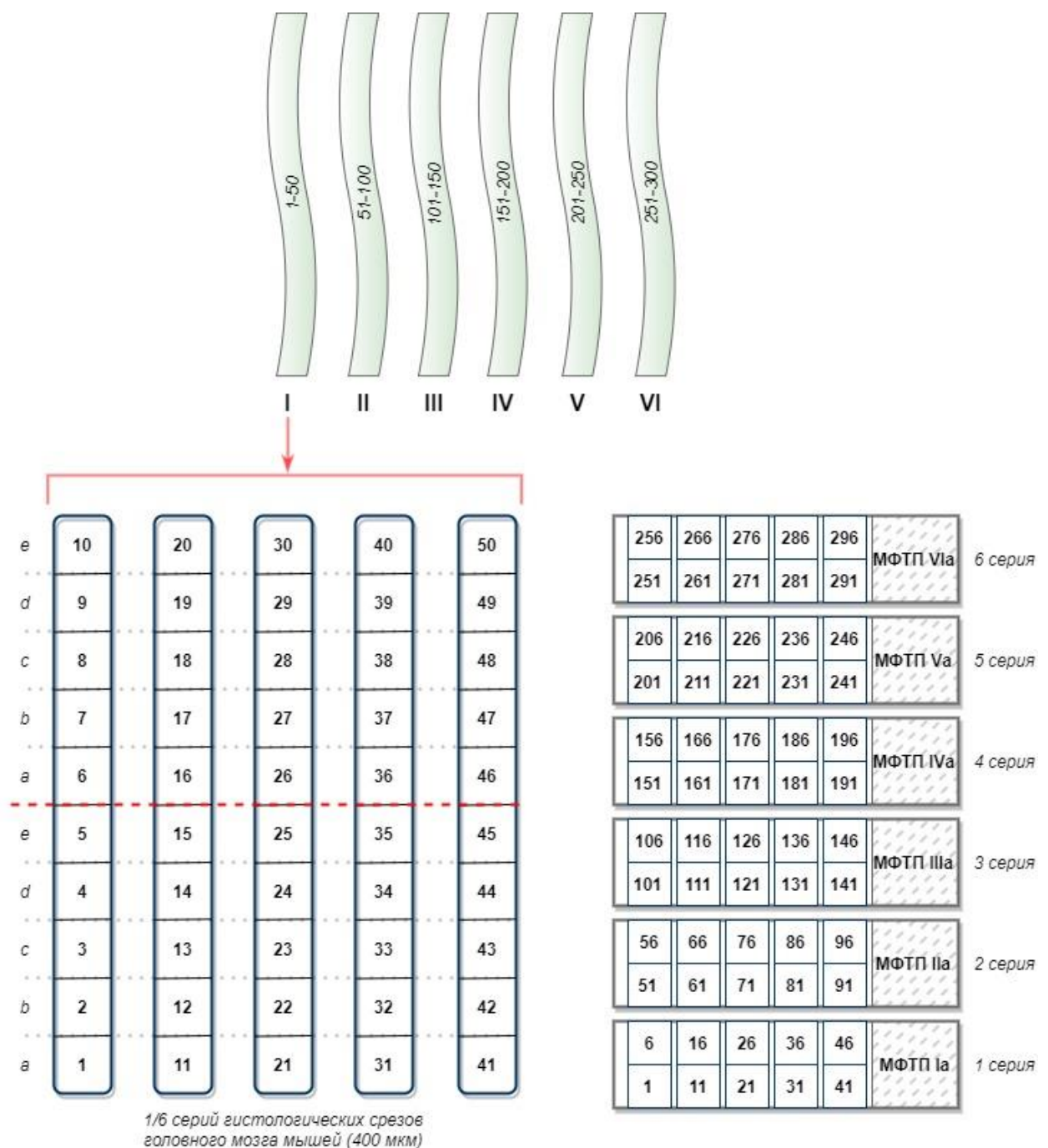


Рисунок 11. Схема монтирования серийных срезов на предметные стекла. Шесть лент длиной 400 мкм каждая составляют серии срезов, расположенных одна за другой. Образцы укладывают на полилизинное предметное стекло с шагом в пять срезов. Цифрами указана нумерация срезов области подсчёта для чёрной субстанции и вентральной области покрышки.

2.4.3 Иммуногистохимическое окрашивание срезов среднего мозга

Препараты после регидратации кипятили в течение 10 минут в 0.1М цитратном буфере (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) для демаскировки антигенов, находящихся на поверхности срезов. Затем 30 минут выдерживали в 3% растворе пероксида водорода (H_2O_2) и метанола с целью блокирования активности эндогенной пероксидазы. Отмывку срезов производили в фосфатно-солевом буфере (ФСБ) и инкубировали блокирующем ФСБ, содержащем 10% сыворотки крови козы и 0,4% ФСБ-Твин 20 (ФСБ-Т), в течение 30 мин при комнатной температуре. Далее на препараты наносили первичные поликлональные мышинные антитела против тиразингидроксилазы (Santa Cruz, США, 1:2000) в блокирующем буфере, выдерживали 2 ч и отмывали в ФСБ-Т. Затем инкубировали со вторичными биотинилированными лошадиными антителами против IgG мыши (Vectastain ABC kit, Vector Laboratories, Великобритания), приготовленными в ФСБ-Т буфере при разведении 1:1500, в течение 1,5 ч при комнатной температуре. По завершению инкубации на гистологические срезы наносили аведин-биотиновый комплекс ABC (Vector Laboratories, Великобритания) на 30 минут, после чего кратко промывали раствором ФСБ. В качестве проявочного вещества с целью визуализации дофаминергических нейронов использовали 3,3-диаминобензидин (Sigma, США) и инкубировали 7-10 минут при комнатной температуре, после чего реакцию останавливали вымачиванием срезов в дистиллированной воде в течение 5 мин. Обратную дегидратацию препаратов проводили в серии спиртов (70%, 90% и 95% этаноле по 5 мин каждый), омывали от спирта срезы в ксилоле в течение 10 мин, заключали в коммерческую среду на основе ксилола DPX (BDH, Великобритания) и подсушивали при комнатной температуре. Фотофиксацию окрашенных клеток дофаминергических нейронов выполняли при увеличении x20 и x40 с использованием камеры Leica DFS 490 и программного обеспечения Leica Application Suite 2.8.1 (Leica Microsystems, Германия).

2.4.4 Морфометрический анализ дофаминергических нейронов ЧС и ВОП среднего мозга

Для оценки числа ДА-нейронов в популяциях ЧС и ВОП был использован стереологический подход подсчета ТГ-позитивно окрашенных клеток в серии срезов во всей анатомической структуре чёрной субстанции и отдельно в вентральной области покрышки по методу, описанному ранее в работах [Anwar et al., 2011]; [Robertson et al., 2004] с незначительными изменениями. Топографию исследуемой анатомической структуры определяли согласно атласу [Fraklin & Paxinos, 2007]. **Рис. 12** в качестве примера иллюстрирует обозначения изучаемых структур головного мозга мыши. Для подсчёта окрашенных клеток каждый пятый срез из серии толщиной в 8 мкм был расположен на предметном стекле так, чтобы в сумме их было 10, как указано на **Рис. 11**. После проведения иммуногистохимического окрашивания препаратов биотиновой меткой выполняли фотофиксацию ТГ-позитивных клеток способом, описанным в предыдущей главе. Каждой фотографии был присвоен индивидуальный номер и шифр для дальнейшего двойного слепого метода подсчета количества нейронов вручную. Нейроны левой и правой половины черной субстанции и вентральной области покрышки считали отдельно. (**Рис. 12**). Затем высчитывали общее значение числа дофаминергических нейронов во всем объеме анализируемой анатомической структуры.

Так как размер нейрона значительно превышает толщину аппаратного среза на микротоме, то не все наблюдаемые в микроскоп ТГ-позитивные клетки учитываются в ручном подсчёте. С целью нивелирования ошибки и получения близкого к истине числа популяции клеток в анатомических структурах подсчет нейронов проводился с учетом поправки Аберкромби [Abercrombie, 1946] по следующей формуле:

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

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

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.

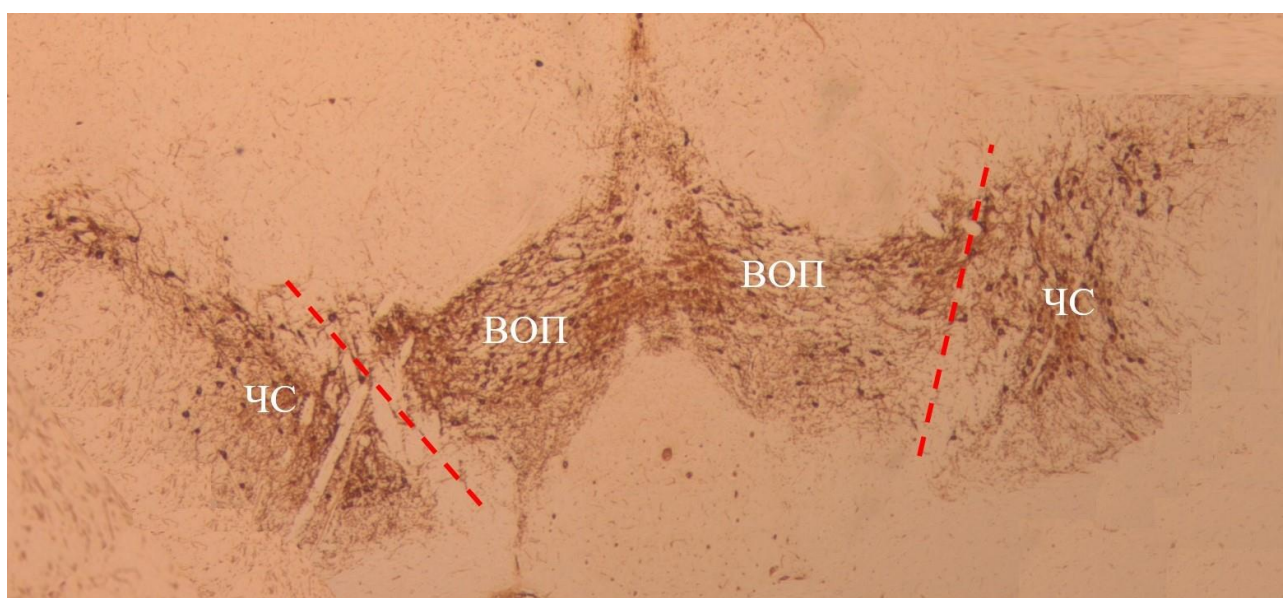


Рисунок 12. Иллюстрация деления среза на анатомические зоны при морфометрическом подсчёте ТГ(+) окрашенных клеток (аТГ в разведении 1:2000). Увеличение X5. ЧС - чёрная субстанция; ВОП - Вентральная область покрышки.

Средний диаметр ядра рассчитывали путем измерения диаметра 30 случайных ядер из обеих частей головного мозга для каждого экспериментального животного (1 животное = 2-3 стекла = 30 ядер) при помощи программного обеспечения ImageJ (NIH, США). Далее из 30 величин вычисляли средний диаметр и полученные значение подставляли в вышеуказанную формулу. В конечном итоге было получено общее количество дофаминергических нейронов левой и правой половины черной субстанции и

вентральной области покрывки для каждого животного, включенного в исследование.

2.5 Статистическая обработка данных

Результаты электрофореза агарозного геля документировали после визуализации ДНК в проходящем ультрафиолетовом свете с помощью системы BioSpectrum AC Chemi HR 410 (UVP, США). Для анализа полученных данных ВЭЖХ использовали программное обеспечение ALEXYS (Antec Leyden, Нидерланды). Результаты теста CatWalk прошли обработку в программном обеспечении CatWalk XT10.6 (Noldus, Нидерланды). Статистическая обработка данных была выполнена в программных пакетах Statistica 12.0 и GraphPad Prism 8: в случае нормального распределения для множественных сравнений использовали однофакторный дисперсионный анализа ANOVA в сочетании с критерием Фишера (PLSD post-hoc), Тьюки или Даннета, для попарных сравнений – t-критерий Стьюдента; в случае отсутствия нормальности распределения выборок для попарных сравнений использовали непараметрический критерий Манна-Уитни. Нормальность распределения массивов данных была оценена в тесте Колмогорова-Смирнова.

Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В здоровой нервной системе альфа-синуклеин локализован преимущественно в пресинаптических терминалях, что позволяет предположить его роль в выполнении особых функций в работе синапсов [Sulzer & Edwards, 2019]. Предполагается, что альфа-синуклеин принимает участие в механизмах защиты синапсов, а его дисфункция может привести к дегенерации синапсов с последующей ретроградной гибелью нейронов [Longhena et al., 2017]. Повышенная экспрессия альфа-синуклеина или экспрессия мутантных форм запускает агрегацию и нарушает аксональный транспорт этого белка [Lee et al., 2017]. Как следствие альфа-синуклеин накапливается в теле нейрональных клеток, и его синаптический пул постепенно истощается, что делает синапсы уязвимыми к стрессовым факторам окружающей среды [Bras et al., 2020]. Согласно этой гипотезе, потеря защитной функции эндогенного альфа-синуклеина является существенным, если не решающим событием в развитии нейродегенерации при синуклеинопатиях.

Другое предположение заключается в том, что у животных, моделирующих потерю функции альфа-синуклеина, должна развиваться патология синапсов, сопровождаемая аксональной дегенерацией нейронов [Greten-Harrison et al., 2010]. Однако это может быть поспешный вывод, особенно если принять во внимание, что синапсы и нейроны беспозвоночных выживают и функционируют без альфа-синуклеина или каких-либо других подобных белков [Connor-Robson et al., 2016].

Действительно, у мышей с направленной инактивацией гена альфа-синуклеина, полученных независимо в нескольких лабораториях, не было выявлено каких-либо признаков нейродегенерации, хотя сообщалось о небольших отклонениях синаптической и митохондриальной функций и снижении числа нейронов в определенных популяциях [Buchman & Ninkina, 2008; Нинкина Н. Н. и др., 2008].

Линии альфа-синуклеин нокаутных мышей, которые были сконструированы в ряде лабораторий, доказали свою эффективность в рамках исследования функциональной недостаточности альфа-синуклеина. Так, ранее проведенный исследователями анализ линии альфа-синуклеин дефицитных мышей Abel-KO [Abeliovich et al., 2000] показал, что они жизнеспособны, фертильны и не обнаруживают каких-либо серьезных патологических отклонений. Несмотря на то, что популяция нейронов в чёрной субстанции численно не менялась, у альфа-синуклеин нокаутных мышей наблюдались значительные нейрохимические, электрофизиологические и поведенческие нарушения. Было показано снижение общего уровня ДА в стриатуме, а также ослабленный локомоторный ответ на амфетамин. Эти результаты подтверждали гипотезу, что альфа-синуклеин является важным регулятором дофаминовой нейротрансмиссии [Abeliovich et al., 2000]. Позже были созданы еще две независимые линии альфа-синуклеин нокаутных мышей, исследования которых показали, что конститутивное удаление альфа-синуклеина также оказывало очень ограниченный эффект на численность нейронов нервной системы молодых модельных мышей, однако влияло на дофаминовую трансмиссию [Buchman & Ninkina, 2008].

Неожиданной характеристикой модельных животных с нокаутом альфа-синуклеина стало приобретение ими пониженной чувствительности к нейротоксину – митохондриальному ингибитору МФТП, который специфически поражает дофаминергические нейроны. Дауер и его коллеги обнаружили, что альфа-синуклеин нокаутные мыши проявляют поразительную устойчивость к острым и хроническим формам МФТП - индуцированной нейротоксичности. При хроническом введении у мышей дикого типа, получавших МФТП, наблюдалась значительная потеря как ДА-ергических нейронов и в черной субстанции (снижение на 29%), и в стриатуме (снижение на 40%). При этом показатели у альфа-синуклеин нокаутных мышей получавших нейротоксин, значительно не отличались от принимавших

физиологический раствор контрольных животных ни по одному показателю. Еще более поразительно, что мыши дикого типа, получавшие МФТП по острому режиму введения, демонстрировали еще большую потерю ДА-ергических нейронов, однако у альфа-синуклеин дефицитных мышей и при таком введении не обнаруживалось значительной нейродегенерации ДА-ергических нейронов [Schluter et al., 2003]. Интересно, что в линии мышей Та-КО, имеющих обширную спонтанную делецию альфа-синуклеина, толерантности к нейротоксину МФТП не было выявлено [Schluter et al., 2003].

Поскольку белку альфа-синуклеину (Snca), являющемуся важным компонентом телец Леви, отводится важная роль в патогенезе болезни Паркинсона, создание независимых линий мышей с генетическими модификациями локуса Snca было крайне важно [Goedert et al., 2017]. Так как в различных исследовательских работах используется индивидуальный подход в создании генетического нокаута, поэтому нельзя исключить влияния вносимых модификаций на прилежащие области генома. Для минимизации неспецифических эффектов модификаций локуса альфа-синуклеина в лаборатории В.Л. Бухмана была создана линия мышей ΔFlox-КО, из генома которой после проведенных манипуляций с локусом удалены все посторонние последовательности [Roman et al., 2017; Тарасова Т.В., 2016].

Так, например, в общепринятой линии Abel-КО (**Рис. 13**) после удаления первого (Ib) и второго экзона альфа-синуклеина с прилегающими последовательностями (размер делеции порядка 3.2 Кб), в модифицированном локусе оставался фрагмент плазмидного вектора pGT-N39 размером 1.9 Кб, содержащий кодирующую часть гена neo под промотором мышинового гена фосфоглицераткиназы Pgk1. В другой линии (ΔFlox-КО) делеция Snca гена была проведена с минимальными модификациями локуса. Из генома мыши был удален второй экзон, содержащий START-кодон, и небольшой участок прилегающей интронной последовательности размером всего 1.1 Кб, что существенно меньше, чем в линии Abel-КО. Более того, и ген neo, и все

значимые посторонние последовательности были удалены из модифицированного локуса полученных мышей. Единственной привнесённой вставкой, оставшейся в геноме Δ Flox-KO мышей, является лишь LoxP-сайт размером 34 bp.

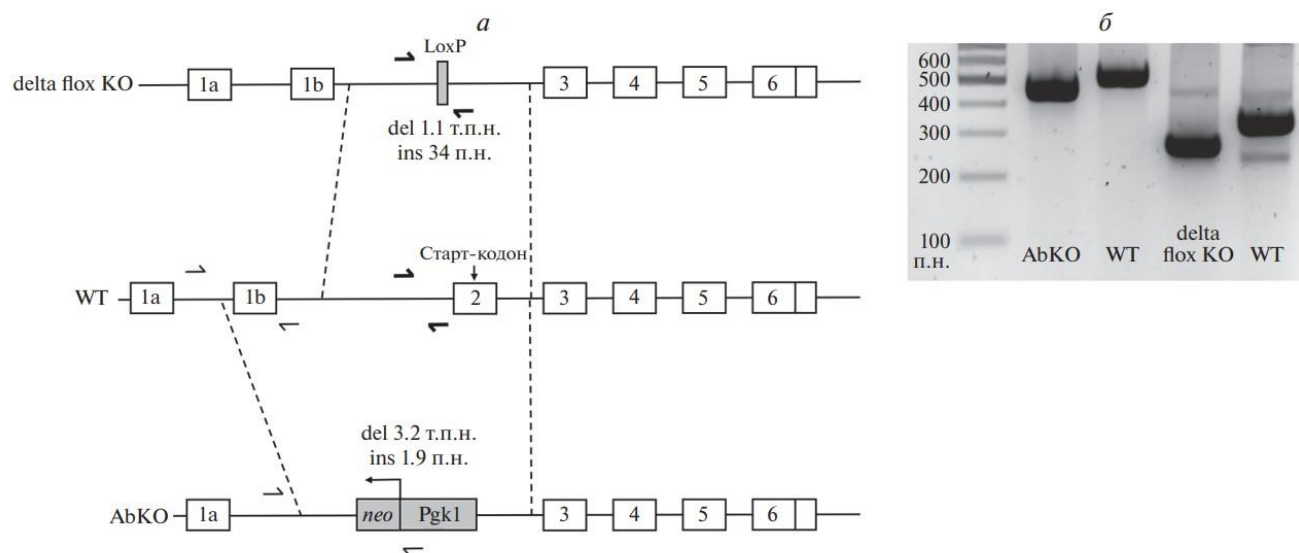


Рисунок 13. Модификации локуса альфа-синуклеина в геноме двух линий мышей.

а) Схема удаления экзона II, содержащего старт-кодон, в линиях Abel-KO и Δ Flox-KO. Стрелкой указано направление транскрипции гена нео. Положение праймеров для генотипирования обозначено полустрелками. Жирными полустрелками обозначены праймеры для анализа колонии Δ Flox-KO, тонкими – колонии Abel-KO.

б) Выявление модификаций локуса альфа-синуклеина методом конвенционной ПЦР.

Из публикации: К. Д. Чапров, Е. В. Тетерина, А. Ю. Роман, Т. А. Иванова, В. В. Голоборщеза, В. Г. Кучеряну, член-корреспондент РАН С. Г. Морозов, Е. А. Лысикова, О. А. Лыткина, И. В. Королева, Н. Я. Попова, А. И. Антохин, Р. К. Овчинников, М. С. Кухарский. Сравнительный анализ нейротоксического эффекта МФТП на двух линиях мышей с конститутивным

нокаутом гена альфа-синуклеина // Молекулярная биология – 2021. – Том 55, №1, с. 152-163.

Таким образом, в рамках диссертационного исследования были использованы две альфа-синуклеин дефицитные линии мышей. Одна из них – Abel-KO, которая была получена в лаборатории А. Rosental в 2000 году [Abeliovich et al., 2000], а другая (Δ Flox-KO) – в лаборатории В. Л. Бухмана в 2015 году [Ninkina et al., 2015]. Стоит отметить, что линию «бесследового нокаута» Δ Flox-KO ранее не использовали для моделирования МФТП-индуцированного паркинсонического синдрома и изучения роли альфа-синуклеина при БП.

3.1. Морфометрический анализ дофаминергических нейронов в компактной части чёрной субстанции у мышей с генетическим нокаутом альфа-синуклеина

Для выяснения фенотипических особенностей нигростриатной системы в двух линиях мышей с генетическим нокаутом альфа-синуклеина – Δ Flox-KO и ранее изученной Abel-KO, проводили сравнительный морфометрический анализ числа дофаминергических нейронов в компактной части чёрной субстанции (**Рис. 14**). В качестве контрольных животных были использованы мыши с немодифицированным геномом линии C57BL/6J. Для детекции ДА-ергических нейронов применяли специфических маркер – тирозингидроксилазу (ТГ). Этот фермент является ключевым катализатором синтеза внутриклеточного дофамина и широко используется в гистологических исследованиях ДА-ергических нейронов.

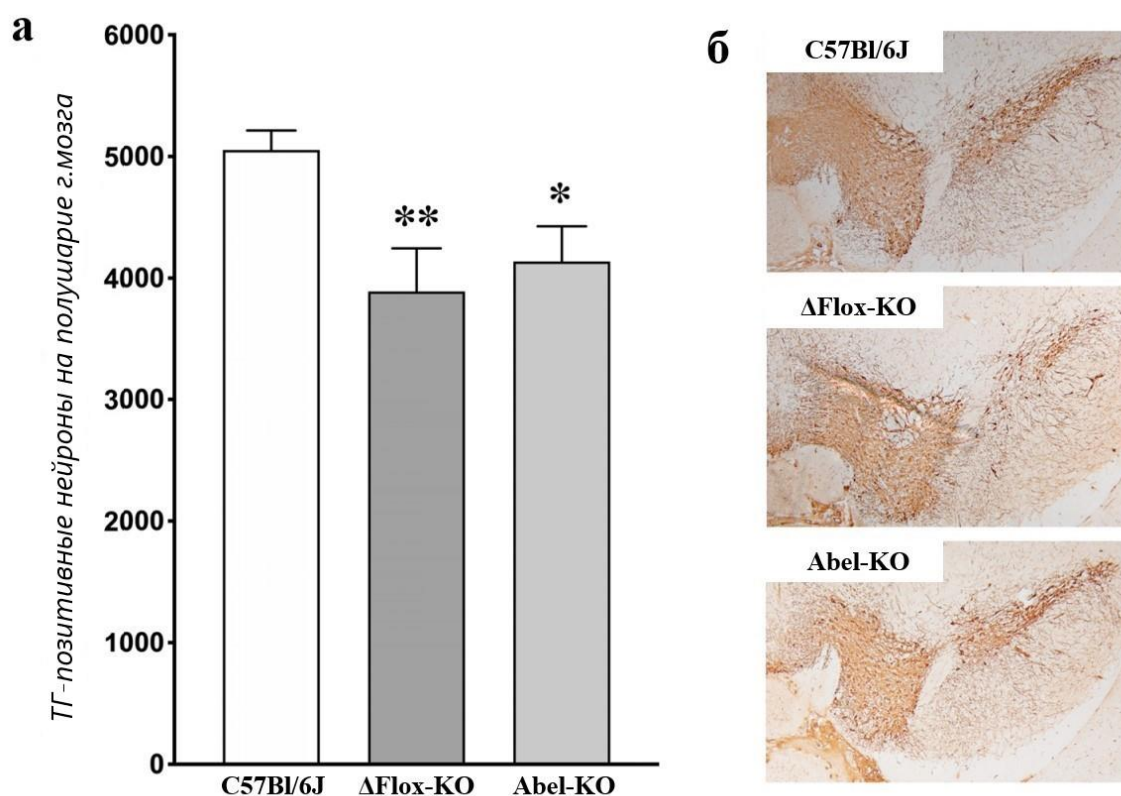


Рисунок 14. Снижение числа дофаминергических нейронов в компактной части чёрной субстанции в двух альфа-синуклеин нокаутных линиях мышей.

а) Количество ТГ-позитивных нейронов в ЧС у 4-месячных мышей с интактным геномом (C57BL/6J) и у двух линий альфа-синуклеин нокаутных животных ΔFlox-KO и Abel-KO. Гистограммы показывают среднее $\pm$ SEM числа стереологически подсчитанных нейронов в компактной части чёрной субстанции для 8 животных для каждого генотипа. Однофакторный анализ ANOVA в сочетании с тестом множественных сравнений Даннетта выявил статистически достоверную разницу между C57BL/6J и каждой из групп альфа-синуклеин дефицитных мышей ($F(2, 45) = 4,854$; $p = 0.0123$; $**p = 0,0094$; $*p = 0,0451$), однако разница между двумя группами нокаутных животных не была значимой ($p = 0,5329$).

б) Репрезентативные изображения срезов мозга в зоне компактной части ЧС, иммуногистохимическое окрашивание антителами против (ТГ) тирозингидроксилазы (1:2000). Увеличение X10.

Из публикации: Goloborshcheva V.V., Chaprov K.D., Teterina E.V., Ovchinnikov R., Buchman V.L. Reduced complement of dopaminergic neurons in the substantia nigra pars compacta of mice with a constitutive genetic knockout of alpha-synuclein // Mol Brain. – 2020. – V. 13, № 1. – P. 75. **Q1**

Проведённый морфометрический анализ показал, что общее количество дофаминергических нейронов в ЧС взрослых мышей Abel-KO было на $18 \pm 5,7\%$ ниже, чем в ЧС контрольных мышей дикого типа. Это согласуется с ранее опубликованными данными для этой линии, а также для линии альфа-синуклеин нокаутных животных Harlan UK C57Bl/6 J [Al-Wandi et al., 2010; Connor-Robson et al., 2016; Garcia-Reitboeck et al., 2013; Robertson et al., 2004]. Важно отметить, что аналогичное снижение ДА-нейронов ($23 \pm 7,0\%$) было обнаружено в чёрной субстанции новой линии ΔFlox-KO. Последний результат демонстрирует, что дефицит дофаминергических нейронов, наблюдаемый в изученных линиях мышей с генетическим нокаутом альфа-синуклеина, действительно вызван недостатком функционального белка альфа-синуклеина [Goloborshcheva et al., 2020].

Полученные результаты могут быть связаны с возможностью того, что некоторые дополнительные генетические модификации, присутствующие в обеих альфа-синуклеин дефицитных линиях мышей, вызывают частичную потерю дофаминергических нейронов, а вовсе не отсутствие альфа-синуклеина как такового.

3.2. Анализ уровней мРНК гена мультимерина 1 (Mmrn-1), картированного в непосредственной близости с альфа-синуклеином

Мультимерин-1 (Mmrn-1, известный так же как EMILIN-4) – растворимый белок, высокое содержание которого отмечено в альфа-гранулах тромбоцитов, где он обнаруживается в комплексе с фактором фон Виллебранда на поверхности активированных тромбоцитов. Мультимерин-1 синтезируется так же в мегакариocyтах, при этом в плазме крови в норме он

не обнаруживается. Его функция и роль в патологии окончательно не изучены. Стоит отметить, что ген *Mmrn-1* расположен в геноме позвоночных всегда на той же хромосоме, что и ген, кодирующий альфа-синуклеин, которому отводится важная роль в патогенезе БП, а направления их транскрипции ориентированы в противоположно расходящихся направлениях. Чтобы выяснить, могут ли различные модификации в локусе альфа-синуклеина (*Snca*) влиять на экспрессию гена *Mmrn-1*, расположенного всего в 160 Kb от *Snca* (**Рис. 15**), нами было исследовано содержание мРНК *Mmrn-1* в коре головного мозга двух линий мышей с избирательной инактивацией альфа-синуклеина: Δ Flox-КО и Abel-КО относительно животных с интактным геномом.

Из тканей коры головного мозга мышей выделяли тотальную очищенную РНК и после синтеза первой цепи кДНК с применением реакции обратной транскрипции оценивали уровни экспрессии мультимерина 1 методом ПЦР в реальном времени.

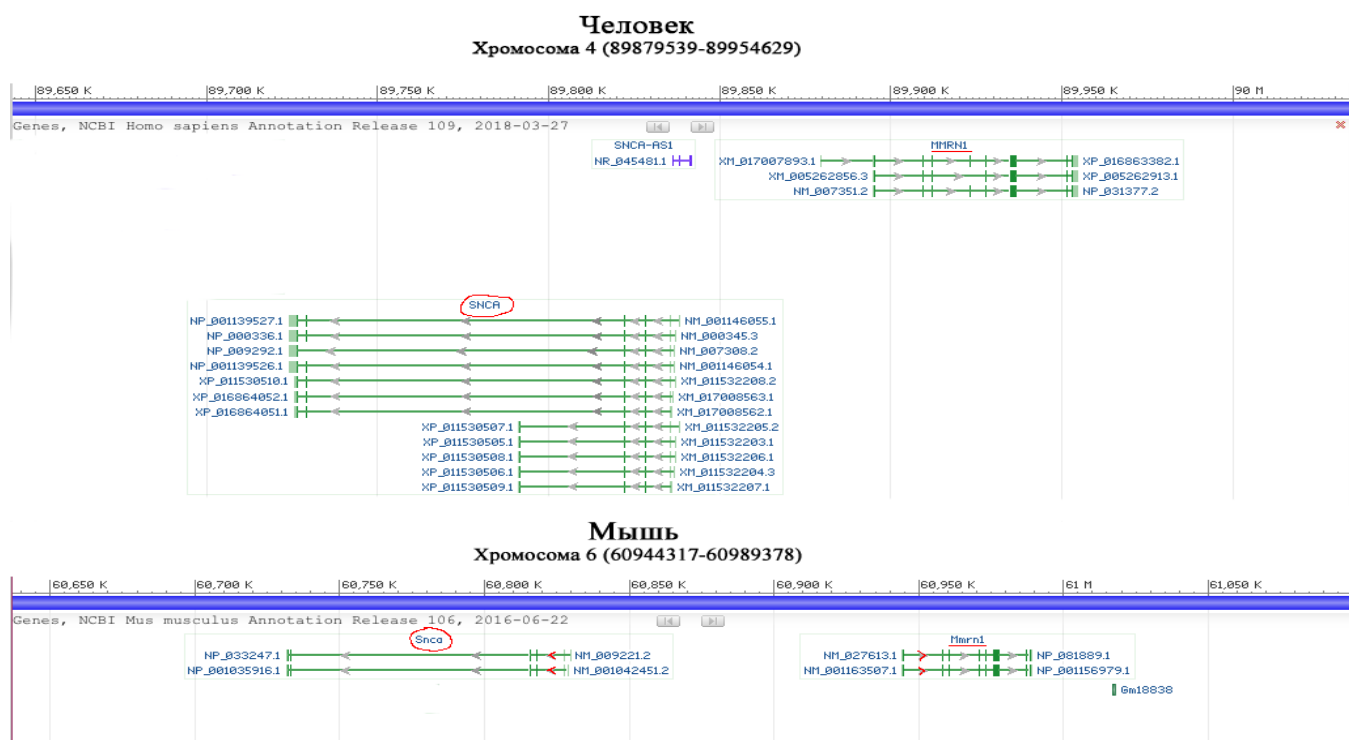


Рисунок 15. Расположение генов *Mmpn-1* и *Snca* в хромосомах человека и мыши

Проведенный анализ относительных уровней экспрессии *Mmrn-1* в двух линиях мышей с генетическим нокаутом *Snca* показал, что его уровень был повышен в 35 раз у мышей линии *Abel-KO*, в то время как у Δ *Flox-KO* мышей он практически не отличался от уровня экспрессии *Mmrn-1* в коре головного мозга контрольных животных дикого типа *C57BL/6J* (**Рис. 16**).

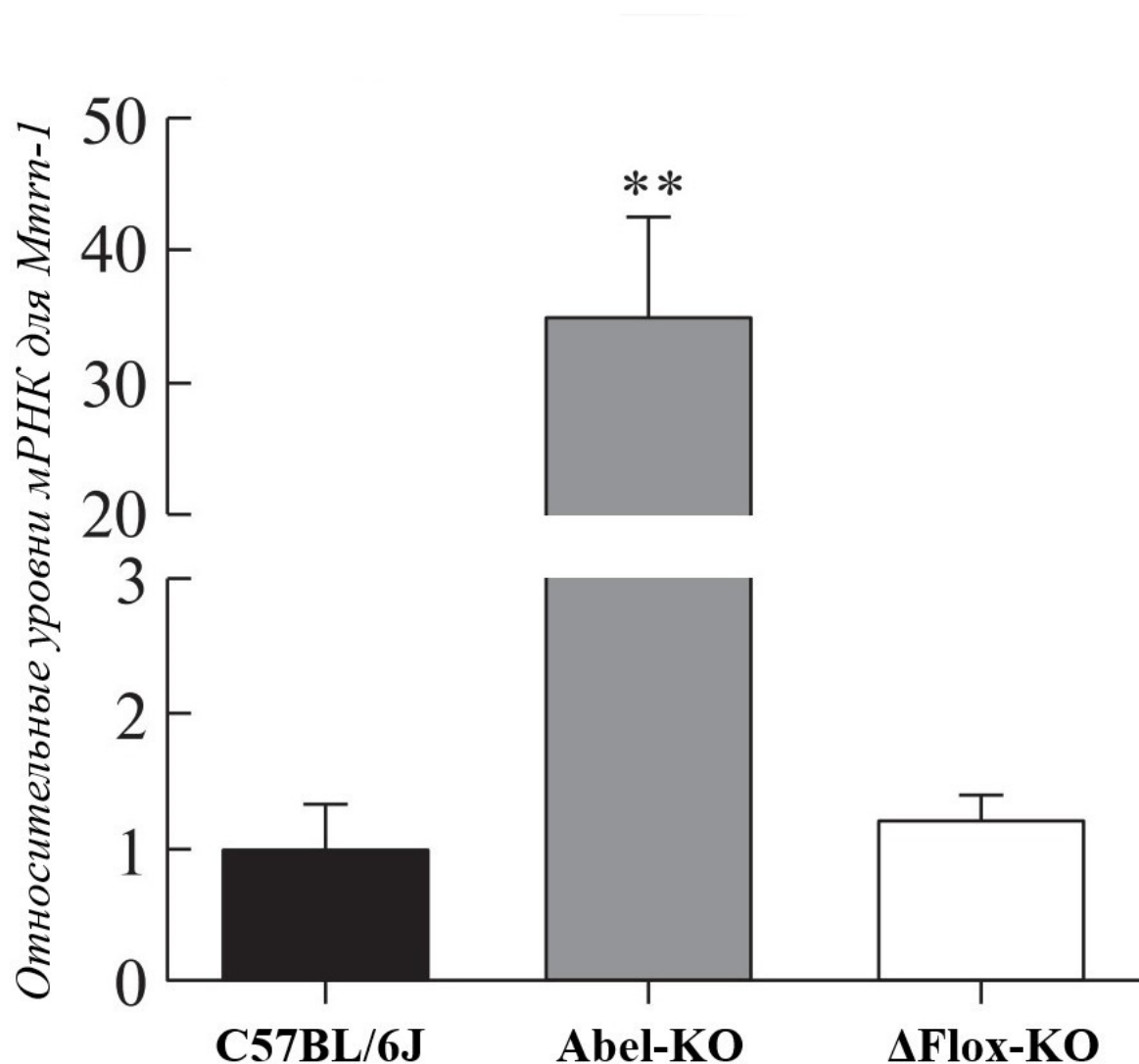


Рисунок 16. Сравнительный анализ уровней экспрессии гена *Mmrn-1* в двух линиях мышей с генетическим нокаутом альфа-синуклеина. Содержание мРНК для *Mmrn-1* определено методом количественного ОТ-ПЦР в реальном времени в тканях коры головного мозга мышей *Abel-KO*, Δ *Flox-KO* и контрольных мышей дикого типа (*C57BL/6J*). $M \pm SEM$, $n = 6$ для каждой

включал помимо гена устойчивости к неомицину еще и промотор гена фосфоглицераткиназы *Pgk1*, который направлял экспрессию нео. Отметим, что ориентация промотора в модифицированном локусе совпадала с ориентацией транскрипции гена *Mmrn-1*. Таким образом, нельзя было исключить влияние этого промотора на активность транскрипции гена *Mmrn-1* у нокаутных мышей.

В отличие от линий Abel-KO, вариант конститутивного нокаута альфа-синуклеина, полученный в лаборатории В.Л. Бухмана, не содержит в модифицированном локусе ни бактериального гена нео, ни дополнительных промоторных последовательностей, поскольку был получен из линии мышей для регулируемого нокаута альфа-синуклеина.

Эти данные указывают на то, что функционально активный промотор pGT-N39 кассеты в геноме линии Abel-KO [Abeliovich et al., 2000], ориентированный в направлении *Mmrn-1*, мог оказывать активирующий эффект на регуляторные последовательности этого гена. В новой же нокаутной линии Δ Flox-KO [Ninkina et al., 2015; Roman et al., 2017] экспрессия гена *Mmrn-1* практически не отличалась от экспрессии в немодифицированном геноме мышей дикого типа на том же генетическом фоне (Рис. 16).

Проведённый ранее биоинформационный анализ показал, что потенциальные регуляторные последовательности располагаются между генами *Snca* и *Mmrn-1*, а также в интронах *Mmrn-1*. В частности, между генами находятся два промотор-фланкирующих домена, а внутри *Mmrn-1* есть два энхансера и два сайта связывания репрессора транскрипции CTCF, который вовлечен в регуляцию архитектуры хроматина и является разграничителем между эу- и гетерохроматином [Phillips & Corces, 2009].

Полученные данные позволяют с высокой степенью вероятности предположить, что именно нарушения в работе регуляторных элементов

генома являются причиной измененной экспрессии Mmtn-1 у Abel-KO мышей. Несмотря на то, что нокаутная линия мышей Abel-KO широко используется в лабораториях мира для исследования нейродегенерации, подробный анализ уровня экспрессии Mmtn-1 ранее выполнен не был [Chaprov et al., 2020].

Обнаруженный нами эффект влияния этих посторонних последовательностей на регуляторные элементы гена Mmtn-1 следует учитывать при работе с альфа-синуклеин нокаутной линией Abel-KO, которая используется в лабораториях мира для исследования механизмов нейродегенерации.

3.3. Формирование репрезентативных синхронизированных когорт альфа-синуклеин дефицитных животных для моделирования МФТП-токсического паркинсонизма

3.3.1. Разведение альфа-синуклеин нокаутных колоний

Контрольные (C57BL/6J) и альфа-синуклеин дефицитные группы мышей были сформированы из помётов от скрещивания гетерозиготных производителей и последующего генотипирования потомков (**Схема 1**). Для получения животных линии Abel-KO было использовано 15 гетерозиготных самцов и 49 гетерозиготных самок. Для получения животных линии ΔFloх-KO было использовано 15 гетерозиготных самцов и 50 гетерозиготных самок. Через 14 дней после рождения потомства из помётов были удалены все самки и помещены в отдельные клетки для обеспечения наиболее благоприятных условий выращивания потомства. В возрасте 1 месяца все 593 особи были промаркированы с помощью ушных клипс, после чего был произведен забор биопсий уха для генотипирования (**Рис. 18**).

A)

P₁: ♂C57Bl/6J x ♀Abel-KO

F₁: f1[Abel-Het] 100%

P₁: ♂C57Bl/6J x ♀ ΔFlox-KO

F₁: f1[ΔFlox-Het] 100%

Б)

P₂: ♂ f1[Abel-Het] x ♀ f1[Abel-Het]

F₂: 50% f2[Abel-Het] : 25% f2[Abel-KO] : 25% f2[C57Bl/6J]

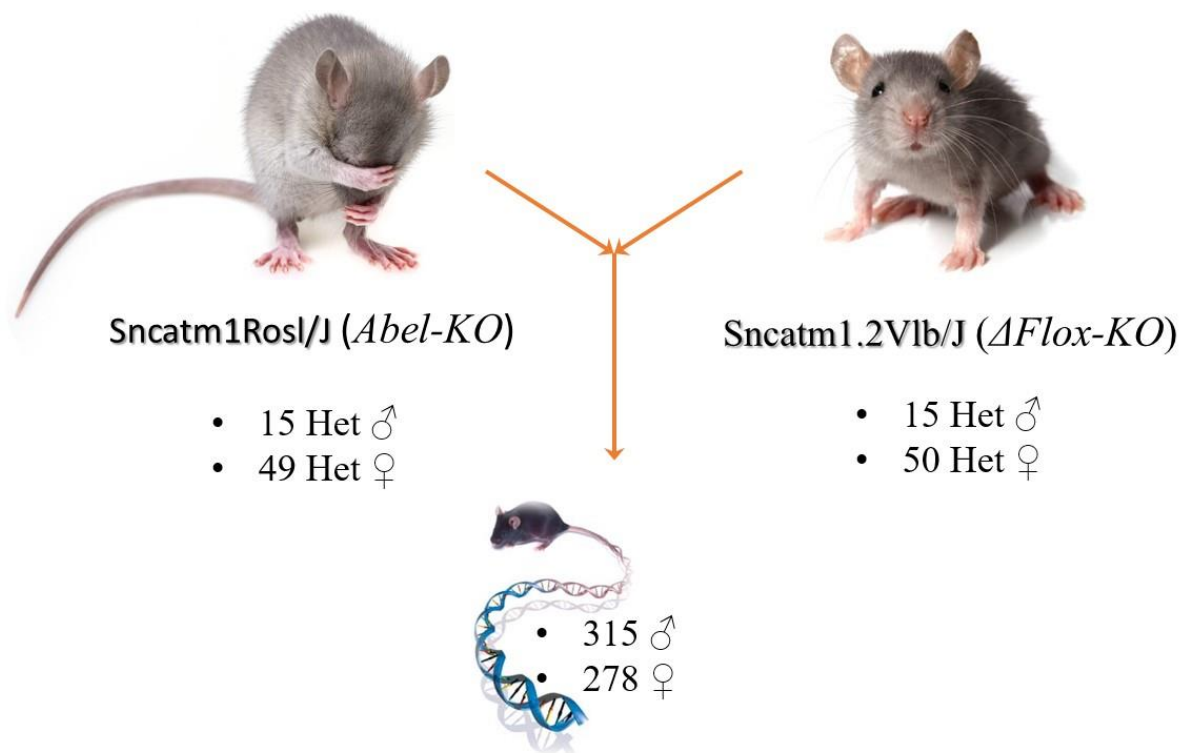
P₂: ♂ f1[ΔFlox-Het] x ♀ f1[ΔFlox-Het]

F₂: 50% f2[ΔFlox-Het] : 25% f2[ΔFlox-KO] : 25% f2[C57Bl/6J]

Схема 1. Иллюстрация серийных скрещиваний животных для формирования репрезентативных синхронизированных когорт.

A) Скрещивание самок альфа-синуклеин нокаутных линий Abel-KO и ΔFlox-KO с самцами дикого типа (C57Bl/6J) для создания общих гетерозиготных производителей. Все потомки первого поколения гетерозиготны по гену альфа-синуклеина соответствующей модификации – f1[Abel-Het] или f1[ΔFlox-Het].

Б) Финальный этап скрещивания гетерозиготных производителей. У всех потомков второго поколения произошло расщепление по генотипу согласно II закону Менделя (1:2:1): 50% гетерозиготных особей, 25% генетический нокаут Snca (Abel-KO или ΔFlox-KO), 25% дикий тип (C57Bl/6J).

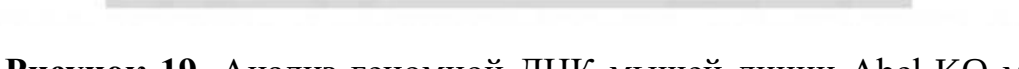


<i>Abel-KO</i>				<i>ΔFlox-KO</i>			
	♂	♀	ИТОГ		♂	♀	ИТОГ
KO	37	43	80	KO	34	36	70
WT	55	30	85	WT	36	45	81

Рисунок 18. Итоговое число альфа-синуклеин нокаутных мышей и животных дикого типа для формирования экспериментальных и контрольных когорт после проведения генотипирования.

3.3.2. Генотипирование животных с последующим формированием экспериментальных и контрольных групп

Тотальную ДНК из выделяли путём лизиса биопсии мочки уха с протеиназой К без последующей очистки образцов. Амплификацию на матрице этой ДНК проводили с использованием специфических праймеров в реакции ПЦР. Продукты ПЦР разделяли электрофорезом ДНК в агарозном геле. У альфа-синуклеин дефицитной линии *Abel-KO* модификация в геноме выявлялась по амплификации фрагмента размером 450 п.н. (**Рис. 19**). У



После анализа генотипов полученных особей всех гетерозиготных животных забивали и оставляли только нокаутных и мышей дикого типа (C57Bl/6J или WT). Контрольную группу животных с немодифицированным геномом формировали из потомков линии Δ Flox-KO, а остальных мышей дикого типа, полученных в линии Abel-KO, так же удаляли из эксперимента (Рис. 18). Оставшихся животных взвешивали и распределяли по группам. Таким образом, было сформировано 6 групп самцов соответствующего генотипа для дальнейшего исследования.

Итоговые экспериментальные и контрольные группы

самцов для исследования

- 1) *Abel-KO Контроль* ($n = 16$)
- 2) *Abel-KO МФТП* ($n = 19$)
- 3) *Δ Flox-KO Контроль* ($n = 15$)
- 4) *Δ Flox-KO МФТП* ($n = 19$)
- 5) *WT Контроль* ($n = 16$)
- 6) *WT МФТП* ($n = 20$)

3.4. Характеристика паркинсонического синдрома у мышей с селективной инактивацией гена альфа-синуклеина после введения нейротоксина МФТП по субхроническому протоколу

В возрасте 10 недель всем животным из групп 2, 4 и 6 вводили внутрибрюшинно водный раствор МФТП по субхроническому протоколу (30 мг/кг в сутки (“Sigma-Aldrich”, США) последовательно в течение 5 дней). Животным контрольных групп 1, 3 и 5 вводили физраствор (NaCl 0,9%). Через 21 день после последней инъекции мышей взвешивали и сравнивали их вес с таковым до введения МФТП. Ни в одной из групп не наблюдалось потери веса, а динамика набора веса с возрастом была одинаковой в контрольных и МФТП

группах. Это свидетельствует о том, что введение МФТП по субхроническому протоколу не вызвало у мышей тяжелых фенотипических изменений (**Рис. 21**).

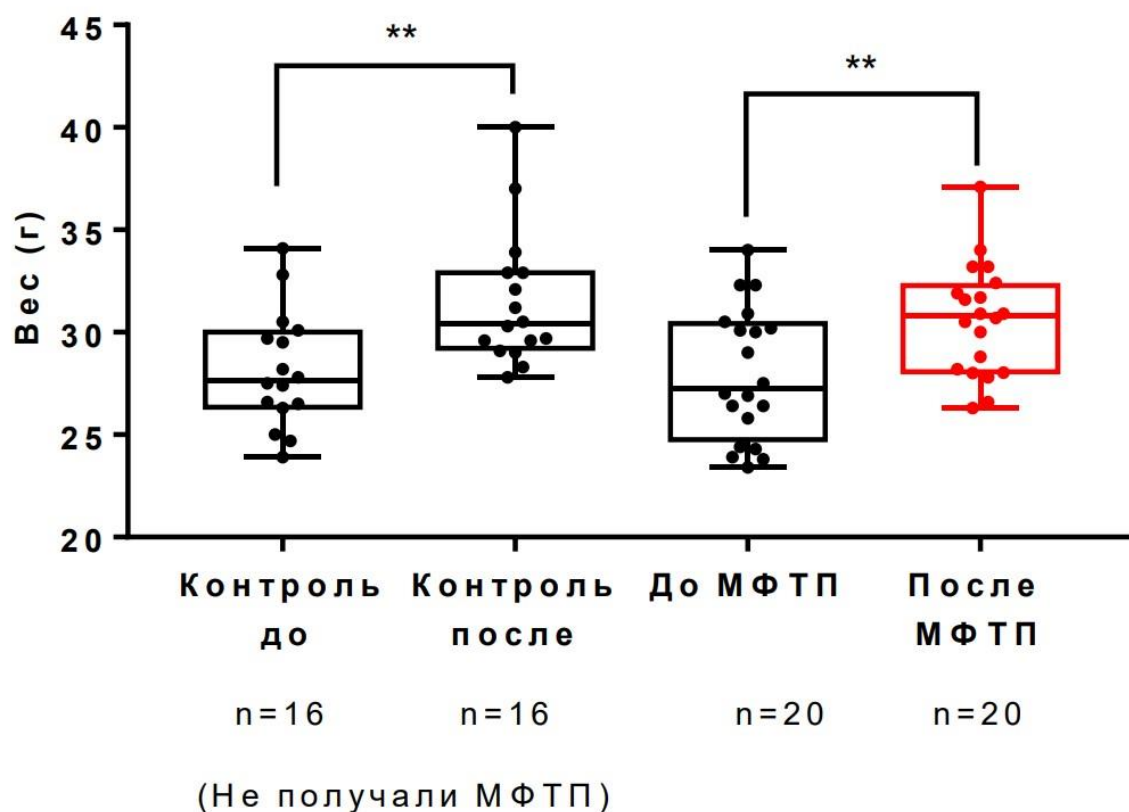


Рисунок 21. График изменения веса животных группы WT до и после введения МФТП.

На графике представлено изменение веса животных с возрастом за период после последнего введения МФТП. Наблюдали физиологически нормальное прибавление веса у животных всех групп. Статистически достоверной разницы между группами после введения физраствора и нейротоксина МФТП не выявлено. ** $p < 0.01$. Тест Манна-Уитни (Mann–Whitney U-test).

3.4.1. Инструментальный анализ двигательных нарушений

Для подтверждения эффективной компенсации на 20-й и 21-й дни после последней инъекции МФТП оценивали двигательную функцию мышей в экспериментальных и контрольных группах.

3.4.1.1. Результаты поведенческого тестирования «перевернутая сетка»

Для оценки мышечной силы и способности удерживать равновесие животных помещали в центр квадратной сетки размером 30×30 см, состоящей из квадратов со стороной 5 мм и диаметром 0.5 мм. Регистрировали время удержания животного на перевернутой сетке над толстым слоем подстилки на высоте 55 см. Животные, падающие раньше максимального времени тестирования (60 с), получали еще две попытки с интервалом 10 мин. В анализ брали лучший показатель из трех попыток.

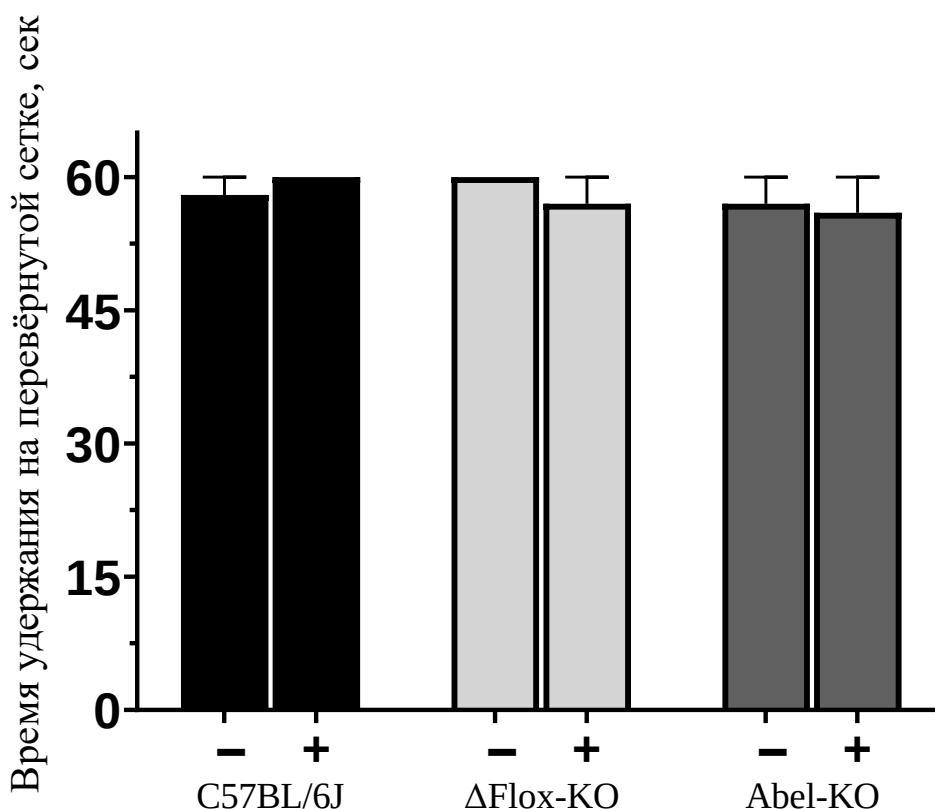


Рисунок 22. Анализ способности животных удерживаться на перевернутой сетке в группах, получавших МФТП, и в контрольных группах.

Значения в группах рассчитывали по результатам трех независимых тестирований каждого животного. “+”- МФТП и “-”- Контроль. $M \pm SEM$, $n = 8$ в каждой из шести групп. Однофакторный дисперсионный анализ (one-way ANOVA) с применением критерия множественных сравнений Тьюки.

В проведенном тесте не было выявлено каких-либо значимых различий у животных получавших нейротоксин МФТП и группы контроля (**Рис. 22**). Время, которое животные удерживались на перевернутой сетке, было близким ко времени тестирования (60 с) во всех группах, что указывало на отсутствие существенных нарушений мышечной силы конечностей и способности удерживать равновесие.

3.4.1.2. Результаты поведенческого тестирования «вертикальный шест»

Для анализа координации движений и оценки брадикинезии животное помещали на верхнюю часть деревянного вертикального шеста высотой 50 см и диаметром 10 мм и регистрировали время спуска. В анализ брали наименьшее время из пяти попыток, выполненных с интервалом 5 мин.

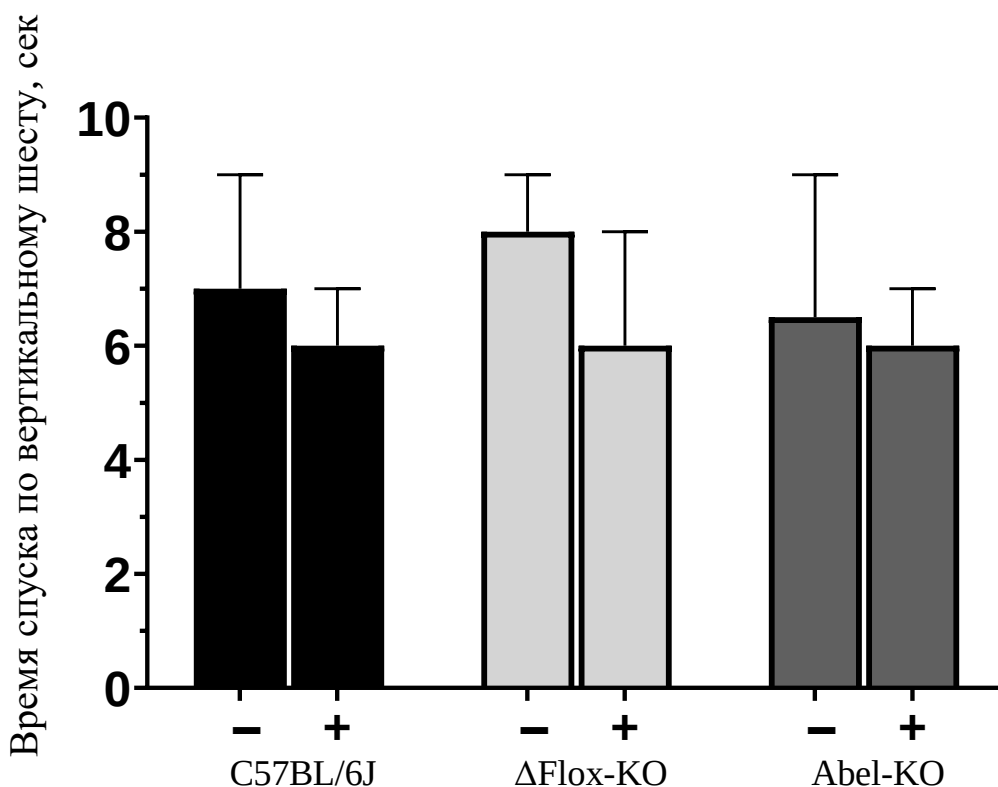


Рисунок 23. Исследование координации движений у экспериментальных животных в тесте «вертикальный шест». Значения в группах рассчитывали по результатам трех независимых тестирований каждого животного. “+”- МФТП и “-”- Контроль. $M \pm SEM$, $n = 8$ в каждой из шести групп. Однофакторный дисперсионный анализ (one-way ANOVA) с применением критерия множественных сравнений Тьюки.

Анализ способности животных спускаться по вертикальному шесту также не выявил статистически значимых различий между обработанными МФТП и контрольными животными (**Рис. 23**). И хотя наблюдалась тенденция к увеличению общего времени спуска с шеста у животных, получавших МФТП (6.00 ± 1.10), различия в показателях не были статистически значимыми, что свидетельствует об отсутствии выраженных локомоторных нарушений в наблюдаемых группах.

3.4.1.3. Результаты анализа походки в высокотехнологичной установке CatWalk XT (“Noldus”)

С целью отработки метода выявления влияния нарушения дофаминового статуса при компенсированном поражении МФТП на координацию движений проведен детальный инструментальный анализ походки мышей в высокотехнологичной установке CatWalk XT (“Noldus”) (**Рис. 24 и 25**). Тестирование проводили на 20-й и 21-й дни после последнего введения МФТП. Каждое экспериментальное животное было тестировано в установке как минимум 3 раза с регистрацией трека пробега. В случае невозможности получения необходимого количества полноценных треков динамику животного наблюдали в течение 10 минут с момента начала тестирования в установке. Все полученные параметры объединяли по группам, отражающим схожие двигательные дисфункции с симптомами БП.

Данная установка позволяет регистрировать до 250 параметров, характеризующих походку животных. Выявлены изменения ряда показателей

походки в группах мышей, обработанных МФТП. Наиболее выраженными были изменения интенсивности и формы контакта конечности с пластиной аппарата при ходьбе. В частности, у мышей, получавших МФТП, интенсивность давления конечности на поверхность снижалась в среднем на 20%. Причем снижение этого показателя наблюдалось на всех четырех конечностях. Важно отметить, что у мышей обеих “нокаутных” линий выраженность эффекта ослабления контакта конечности с поверхностью была одинаковой (**Рис. 24**).

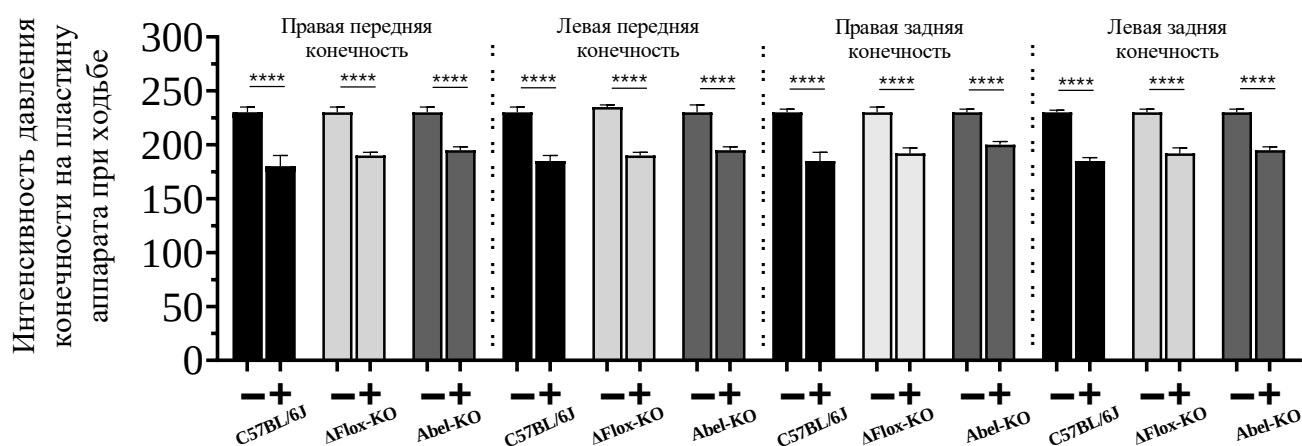


Рисунок 24. Анализ походки мышей в установке CatWalk XT (“Noldus”). Интенсивность давления конечности на пластину аппарата при ходьбе (усл. ед.). “+” - введен МФТП; “-” – введен физраствор. $M \pm SEM$, $n = 8$ в каждой из шести групп; **** $p < 0.0001$. Однофакторный дисперсионный анализ (one-way ANOVA) с применением критерия множественных сравнений Тьюки.

Также был проанализирован другой параметр – расстояние между шагами по разным осям движения тела мыши, который также менялся, однако отсутствовала строгая закономерность, количественно описывающая общую для всех групп особенность нарушения походки (**Рис. 25**).

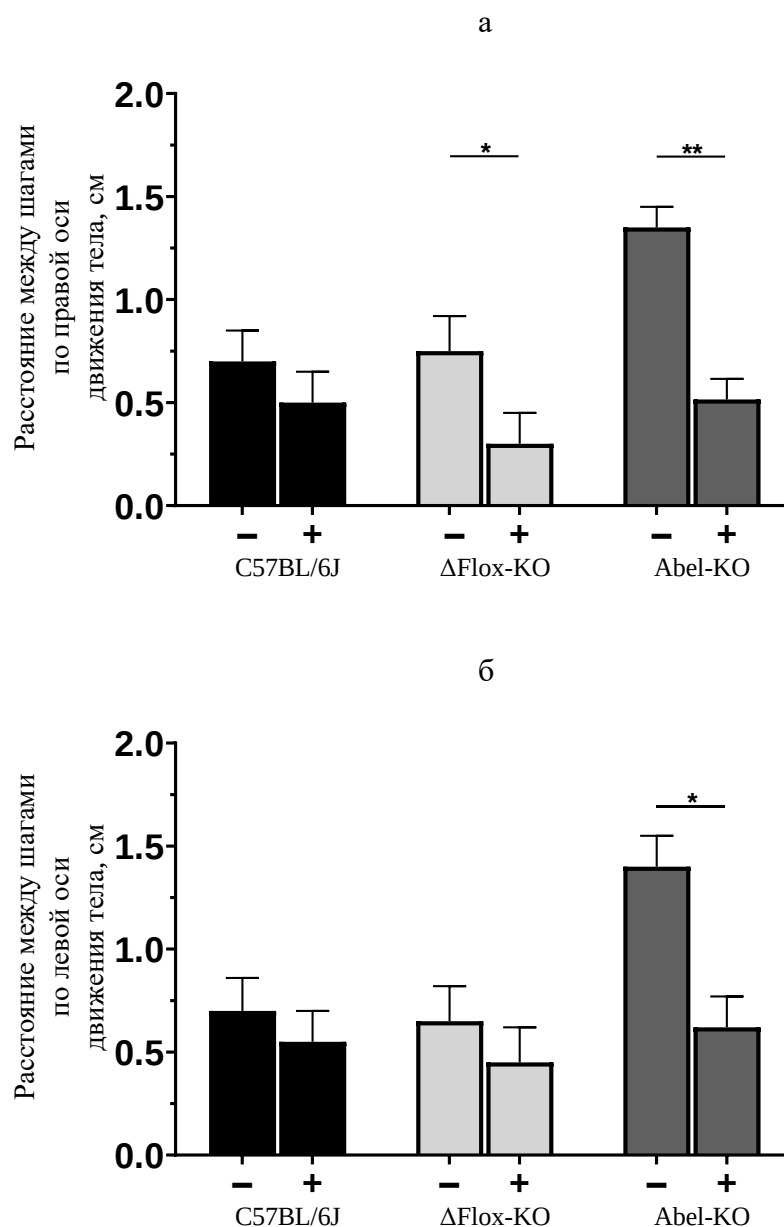


Рисунок 25. Анализ походки мышей в установке CatWalk XT (“Noldus”). Сокращение расстояния между шагами (расстояние между положением задней и ранее размещенной передней лапы на одной стороне тела в одном и том же шаговом цикле) по разным осям движения тела мыши после введения МФТП. а – Правая, б – левая ось движения тела мыши. “+” - введен МФТП; “-” – введен физраствор. $M \pm SEM$, $n = 8$ в каждой из шести групп; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$. Однофакторный дисперсионный анализ (one-way ANOVA) с применением критерия множественных сравнений Тьюки.

3.4.2. Биохимическое исследование дофамина и его метаболитов в стриатуме

Уровни дофамина и его метаболитов определяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) в тканях стриатума, поскольку в стриатуме располагаются синапсы ДА-ергических нейронов ЧС, и там осуществляется трансмиссия дофамина. Отдельно препарировали и анализировали стриатумы из каждого полушария головного мозга, как описано ранее в работе [Ninkina et al., 2020]. На **Рис. 26** представлены результаты измерения уровней стриатного дофамина и его метаболитов у мышей дикого типа и обеих линий с нокаутом альфа-синуклеина. Нами выявлено статистически значимое снижение уровней дофамина у мышей всех групп после обработки нейротоксином МФТП. При этом падение уровня дофамина в стриатуме животных линий Δ Floх-KO (0.3225 ± 0.02463) и Abel-KO (0.3950 ± 0.02603) было практически одинаковым и не отличалось от двукратного падения уровня дофамина в стриатуме мышей дикого типа (0.3314 ± 0.04257).

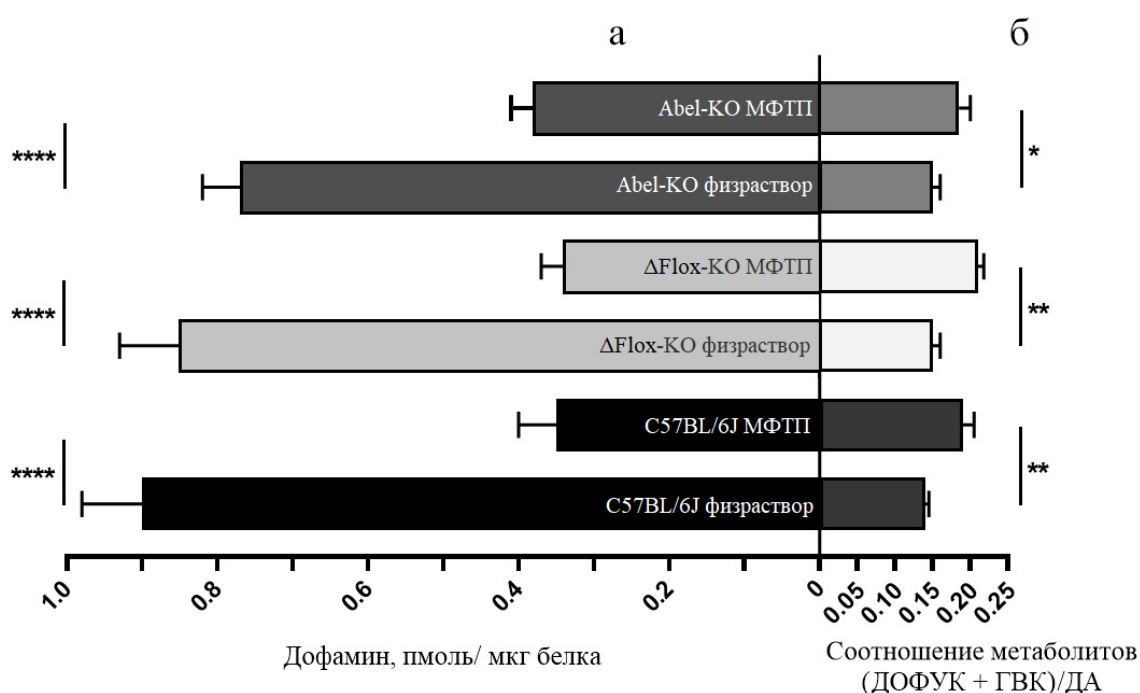


Рисунок 26. ВЭЖХ-анализ уровней дофамина и его метаболитов в стриатуме мышей через 21 день после введения МФТП. а – Содержание дофамина в стриатуме мышей дикого типа (WT) и линий с нокаутом альфа-синуклеина – Abel-KO и ΔFlox-KO; б – соотношение общего содержания метаболитов дофамина 3,4-дигидроксифенилуксусной кислоты (ДОФУК) и гомованилиновой кислоты (ГБК) с уровнем стриатного дофамина. $M \pm SEM$, $n = 8$ в каждой из шести групп; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; **** $p < 0.0001$. Однофакторный дисперсионный анализ (one-way ANOVA) с применением критерия множественных сравнений Тьюки.

В этих же образцах определено содержание метаболитов дофамина: продукта его окислительного дезаминирования 3,4-дигидроксифенилуксусной кислоты (ДОФУК) и основного конечного метаболита дофамина – гомованилиновой кислоты (ГБК). Соотношение содержания продуктов катаболизма дофамина и интактных молекул дофамина во всех образцах было повышено: 0.1875 ± 0.01297 у мышей Abel-KO, 0.2041 ± 0.01003 у ΔFlox-KO и 0.1925 ± 0.01382 у животных дикого типа (C57BL/6J или WT). Это указывало на то, что количество молекул дофамина, утилизируемых в синаптических окончаниях ДА-ергических нейронов, превышало количество новосинтезированного дофамина. Такие изменения в показателях катаболизма стриатного дофамина обусловлены гибелью тел части ДА-ергических нейронов ЧС. При этом сравнительный анализ содержания дофамина и его метаболитов в стриатумах мышей линий ΔFlox-KO и Abel-KO показал идентичность повреждающего эффекта МФТП на дофаминовый статус (Рис. 26).

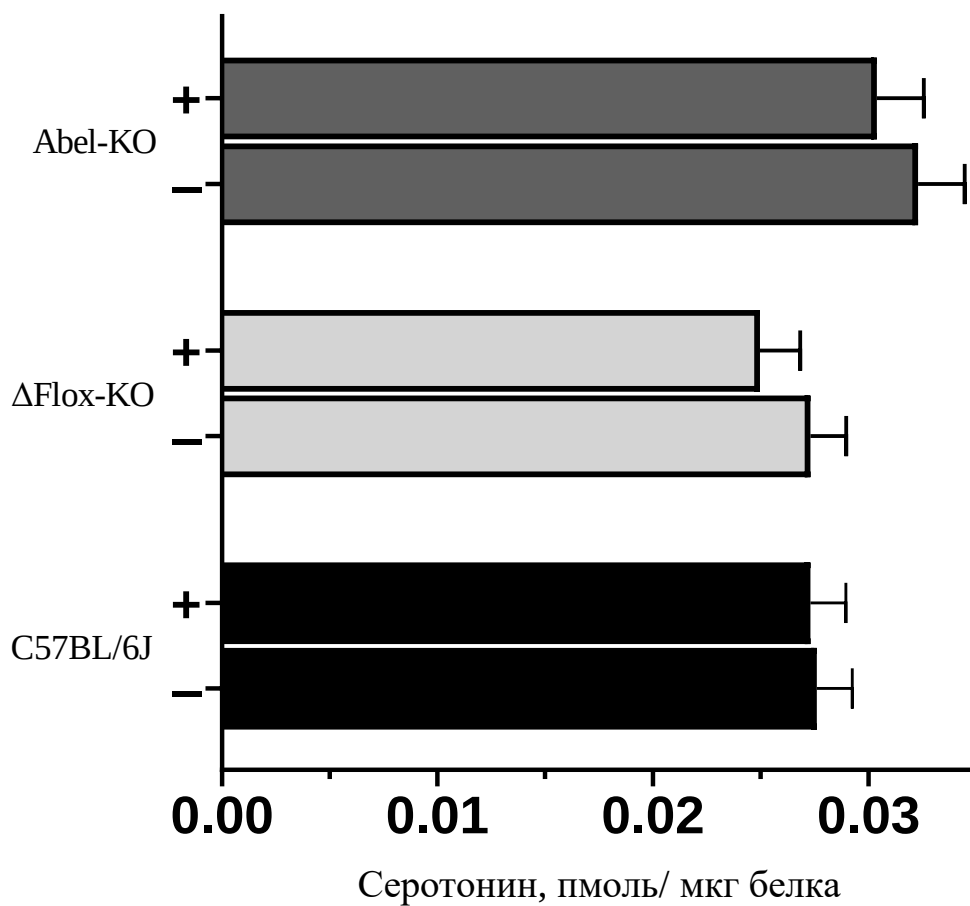


Рисунок 27. ВЭЖХ-анализ уровней серотонина в стриатуме мышей через 21 день после введения МФТП. Содержание серотонина у C57BL/6J и у нокаутных мышей двух линий: Abel-KO и ΔFlox-KO. $M \pm SEM$, $n = 8$ в каждой из шести групп. Однофакторный дисперсионный анализ (one-way ANOVA) с применением критерия множественных сравнений Тьюки.

В тех же образцах методом ВЭЖХ определены уровни серотонина (**Рис. 27**). Не выявлено статистически значимого падения уровня серотонина после обработки МФТП ни у мышей Abel-KO (0.03039 ± 0.002174), ни у мышей ΔFlox-KO (0.02496 ± 0.001867), ни у мышей дикого типа (0.02730 ± 0.001649). Эти данные указывают на специфичность токсического поражения именно тел ДА-ергических нейронов в компактной части ЧС.

3.4.3. Морфометрический анализ дофаминергических нейронов чёрной субстанции (ЧС) и вентральной области покрышки (ВОП)

Основные анатомические области мозга, которые дифференциально поражаются у больных с БП – черная субстанция и вентральная область покрышки, в различной степени реагируют на функциональный дефицит альфа-синуклеина в эмбриогенезе. Наиболее выраженный эффект он оказывает на ДА-ергические нейроны ЧС, и в меньшей степени влияет на ВОП. В исследованиях по нарушению функций альфа-синуклеина, было показано, что ДА-ергические нейроны ЧС, прошедшие онтогенетический отбор в отсутствие альфа-синуклеина, более устойчивы к действию ряда митохондриальных нейротоксинов, специфически поражающих ДА-ергические нейроны [Al-Wandi et al., 2010]. Более того, было установлено, что альфа-синуклеин участвует в формировании популяции дофаминергических нейронов ЧС, но не ВОП [Тарасова Т.В., 2016].

Для анализа выживаемости популяции зрелых нейронов ЧС и ВОП в условиях МФТП-токсического моделирования паркинсонического синдрома на двух альфа-синуклеин нокаутных линиях мышей Abel-KO и ΔFlox-KO было произведено сравнительное морфометрическое исследование. С этой целью экспериментальных и контрольных животных декапитировали через 21 день после последней инъекции МФТП. Извлеченный головной мозг мышей немедленно помещался в заранее маркированную гистологическую кассету и погружался в охлаждённый фиксирующий раствор Карнуа. Через сутки все образцы были проведены через батарею спиртов с повышением концентрации, а также через растворы хлороформ:этанол (1:1), хлороформ. Далее дегидратированные ткани головного мозга мышей насыщали расплавленным парафином в сухом термостате при 60°C, после чего образцы заключали в парафиновые блоки для дальнейшего морфометрического исследования. Визуализацию дофаминергических нейронов осуществляли методом иммуногистохимического окрашивания срезов толщиной 8 мкм,

произведённых на ротационном микротоме, с применением антител против тирозингидроксилазы (ТГ), ключевого фермента биосинтеза дофамина (**Рис. 28**). Стереологический подсчёт количества нейронов ЧС и ВОП проводился на световом микроскопе в 6-ти группах методом двойного слепого подсчёта (Double-blind control).



Рисунок 28. ТГ(+) окрашенный срез половины мозга взрослой мыши (аТГ в разведении 1:2000). Увеличение X5. ЧС - чёрная субстанция; ВОП - Вентральная область покрышки

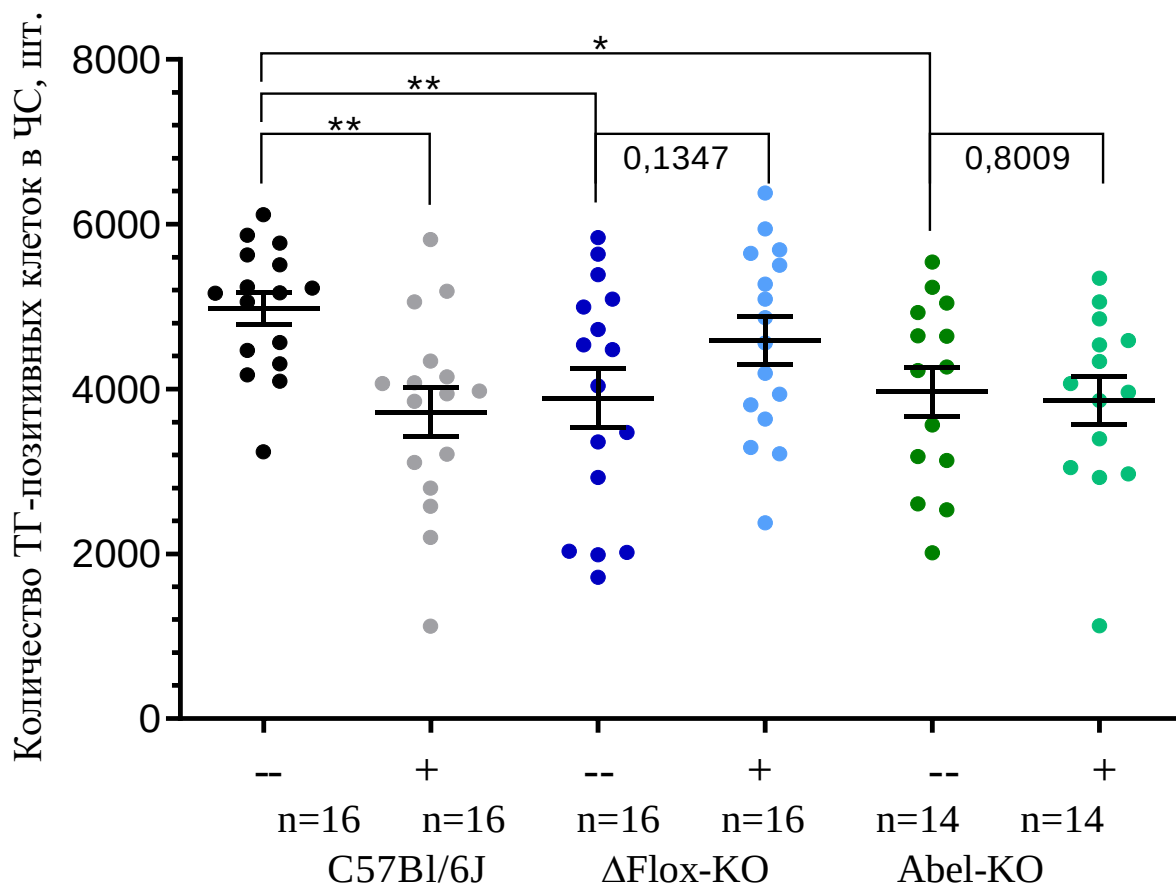


Рисунок 29. Популяция ДА-ергических нейронов ЧС после введения физраствора (—) и МФТП (+) у 4-месячных мышей двух альфа-синуклеин нокаутных линий (ΔFlox-KO и Abel-KO), и у животных с немодифицированным геномом линии C57BL/6J. Данные представлены в виде среднего и стандартной ошибки среднего ($M \pm SEM$) числа стереологически подсчитанных нейронов в компактной части ЧС. Однофакторный анализ ANOVA в сочетании с критерием Фишера (PLSD post-hoc).

Из публикации: Голоборщева В.В., Воронина Н.А., Овчинников Р.К., Кучеряну В.Г., Морозов С.Г. Морфометрический анализ дофаминергических нейронов черной субстанции головного мозга мышей с генетическим нокаутом альфа-синуклеина при МФТП-индуцированном паркинсонизме // Патогенез. – 2021. – Т. 19. – №3 – С. 32-37.

Проведённый морфометрический анализ показал, что общее количество ДА-ергических нейронов компактной ЧС у 4-месячных мышей дикого типа, получавших физиологический раствор, было на 20–22% выше по сравнению с гомозиготными альфа-синуклеин нокаутными мышами Δ Floх-KO и Abel-KO, что согласуется с результатами, полученными нами ранее [Goloborshcheva et al., 2020]. После введения МФТП произошло значительное истощение иммунореактивных ТГ-позитивных нейронов у мышей дикого типа C57BL/6J (**Рис. 29**). Примечательно, что подобный эффект не наблюдался у мышей с генетическим нокаутом альфа-синуклеина: значимых различий в группах нокаутных животных обеих линий не установлено.

Таким образом, мы обнаружили, что мыши в условиях дефицита альфа-синуклеина устойчивы к потере ДА-ергических нейронов в компактной части ЧС после введения МФТП. Эта резистентность не является следствием изменённого поглощения нейротоксина МФТП, так как ранее мы не обнаружили существенных различий в уровнях ДА и его метаболитов в стриатуме, которые достоверно снижались во всех наблюдаемых группах после введения МФТП [Chaprov et al., 2021].

Далее был проведён анализ динамики изменения числа дофаминергических нейронов для этих же групп в вентральной области покрышки (ВОП), которая структурно схожа с ЧС, дифференциально поражаемой при БП.

На **рисунке 30** представлены результаты морфометрического анализа ТГ-позитивных нейронов ВОП для Δ Floх-KO и Abel-KO мышей, а также для контрольных животных дикого типа (C57BL/6J).

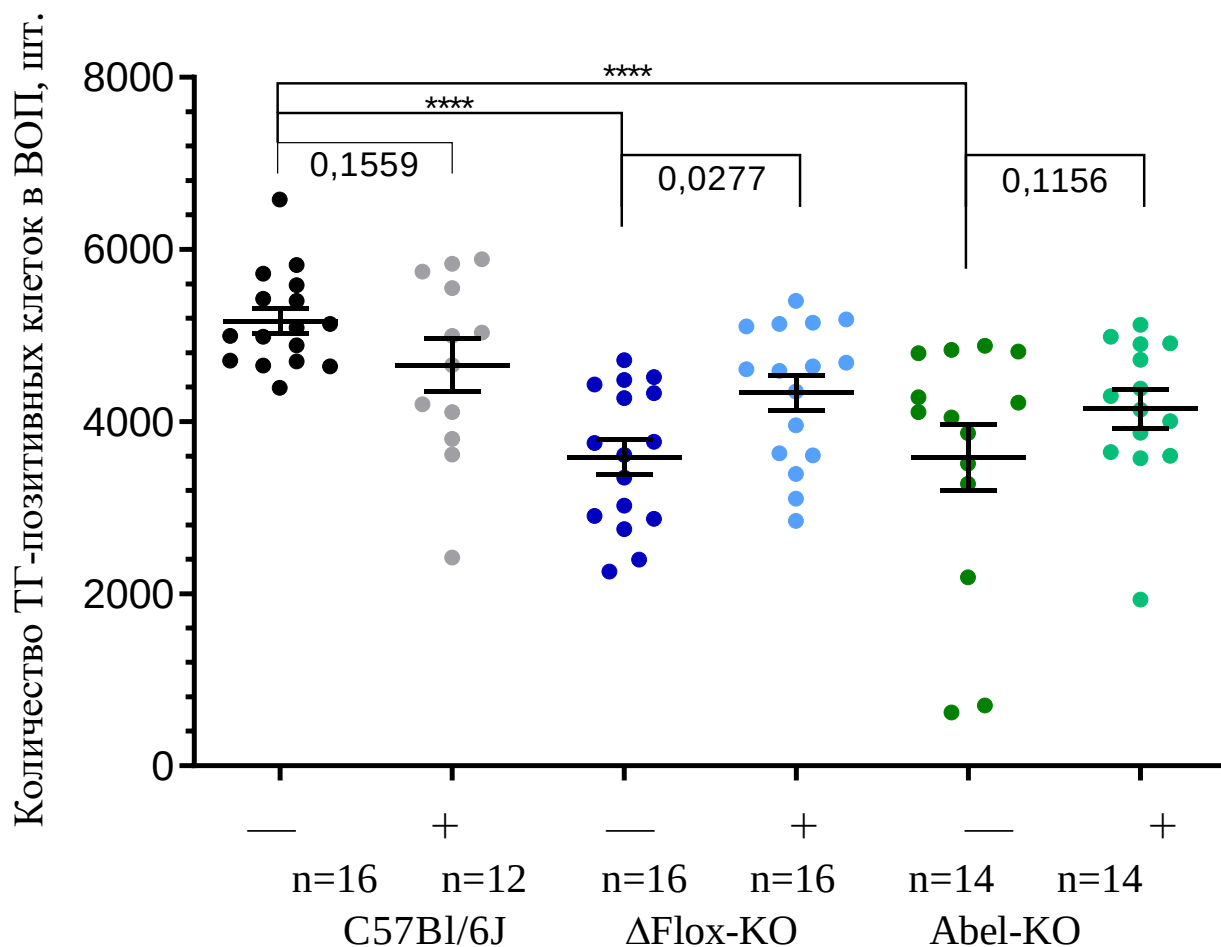


Рисунок 30. Популяция ДА-ергических нейронов ВОП после введения физраствора (—) и МФТП (+) у 4-месячных мышей двух альфа-синуклеин нокаутных линий (Δ Flox-KO и Abel-KO), и у животных с немодифицированным геномом линии C57BL/6J. Данные представлены в виде среднего и стандартной ошибки среднего ($M \pm SEM$) числа стереологически подсчитанных нейронов в ВОП. Однофакторный анализ ANOVA в сочетании с критерием Фишера (PLSD post-hoc).

Установлено, что ДА-ергические нейроны ВОП устойчивы к воздействию МФТП во всех трёх регистрируемых группах, причём линия генетического нокаута альфа- синуклеина Δ Flox-KO демонстрировала более выраженную резистентность в отличие от животных с неизменённым геномом

($p = 0,0277$). Также мыши линии Abel-KO имели тенденцию к достоверному описанию количественных изменений ДА-ергических нейронов ВОП. Однако стоит отметить, что в условиях дефицита альфа-синуклеина, у нокаутных животных линий Δ Floх-KO и Abel-KO, получавших физраствор, отмечалось достоверное снижение числа ДА-ергических нейронов относительно контрольных животных дикого типа $\sim 30\%$ ($p < 0.0001$).

Вентральная область покрышки (ВОП) — ключевой компонент «системы вознаграждения», так же известный как «система внутреннего подкрепления» в мозге млекопитающих. ВОП примерно на 55–65% состоит из дофаминергических нейронов. Можно предположить, что недостаточность альфа-синуклеина может оказывать влияние на мезокортикальный и мезолимбический пути реализации дофамина, образованных отростками тел нейронов вентральной области покрышки.

3.5. Моделирование токсического паркинсонического синдрома на линии бессинуклеиновых мышей (abg-KO)

Как было установлено ранее, мыши с нокаутом гена альфа-синуклеина не имеют выраженной дисфункции центральной нервной системы и не показывают признаков нейродегенерации [Cabin et al., 2002; Klivenyi et al., 2006]. Однако тройной нокаут генов альфа-, бета- и гамма-синуклеина сопровождается изменением в структуре синапсов, нарушением нейротрансмиссии и возрастной нейродегенерацией [Greten-Harrison et al., 2010]. Это наблюдение свидетельствует о том, что механизм нейродегенерации при БП, скорее всего, не связан с потерей функциональной активности альфа-синуклеина.

Возможным объяснением отсутствия заметных фенотипических изменений в нервной системе мышей с инактивацией альфа-синуклеина является функциональная компенсация двух других высоко гомологичных членов семейства синуклеинов – бета-синуклеина и гамма-синуклеина.

Для изучения роли белков семейства синуклеинов в механизме развития паркинсонического синдрома, индуцированного нейротоксином МФТП, необходимо было получить экспериментальную модель на мышах, не содержащую собственных эндогенных белков синуклеинов. Для этого нами была использована линия мышей abg-KO с генетической инактивацией всех трёх генов синуклеинов, впервые полученная с путём последовательного многоэтапного скрещивания линий Δ Flox-KO, β -KO и γ -KO. В качестве контроля использовали линию C57BL/6J с немодифицированным геномом. В возрасте 12 недель самцам обеих линий внутрибрюшинно вводили МФТП (30 мг/кг в сутки) в течение 5 дней. Через 21 день мышей также взвешивали и сравнивали их вес с таковым до введения нейротоксина (**Рис. 31**), после чего аналогично исследовали изменения двигательной функции с помощью батареи базовых поведенческих моторных тестов: «перевернутая сетка», «вертикальный шест», а также в установке для анализа походки CatWalk

(Noldus). По окончании тестирования производили морфометрический анализ количества дофаминергических нейронов в ЧС и ВОП, после чего определяли уровни дофамина и его метаболитов в полосатом теле с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии.

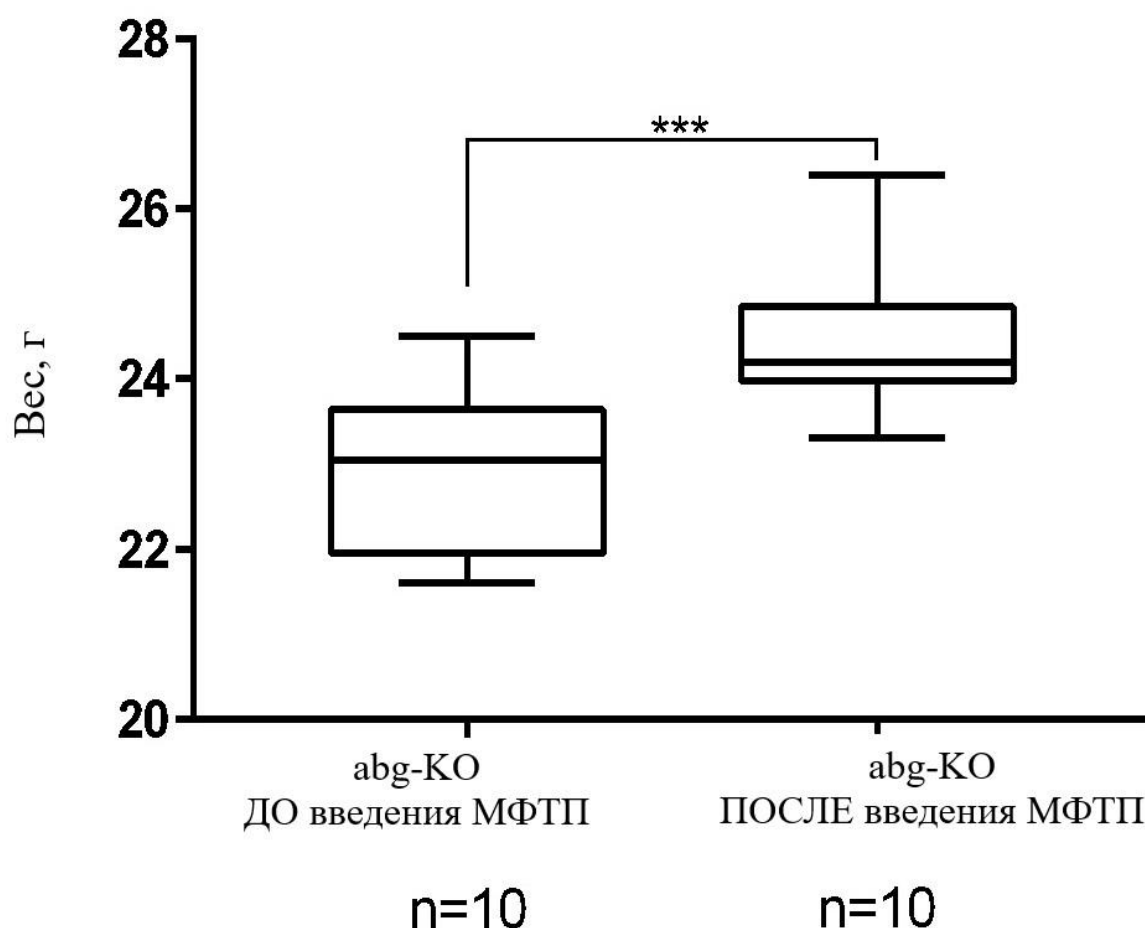


Рисунок 31. График изменения веса бессинуклеиновых животных до и после введения МФТП.

График иллюстрирует изменение веса животных через 21 день после последней инъекции МФТП. Отмечено увеличение веса у животных в группе, принимавшей МФТП. Выявлена статистически достоверная разница между группами до и после введения нейротоксина МФТП. *** $p < 0.001$, $M \pm SEM$. Тест Манна-Уитни (Mann–Whitney U-test).

3.5.1. Отсутствие выраженных расстройств локомоторной функции у животных линии *abg-KO*

Исследование двигательной функции у бессинуклеиновых мышей линии *abg-KO* было проведено в батарее инструментальных тестов, аналогичных для альфа-синуклеин дефицитных животных: «перевернутая сетка», «вертикальный шест» и в установке CatWalk. Для этого были сформированы репрезентативные группы животных, которым интраперитонеально вводили нейротоксин МФТП ($n = 10$), и контрольных животных, получавших физраствор ($n = 11$). Мыши обеих групп в возрасте 4 месяцев были способны распределять тело в пространстве на тонком шесте и оперативно спускаться с него, не падая на платформу, в которую закреплён шест, причём разницы между показателями в группах контрольных и получавших МФТП выявлено не было (**Рис. 32**).

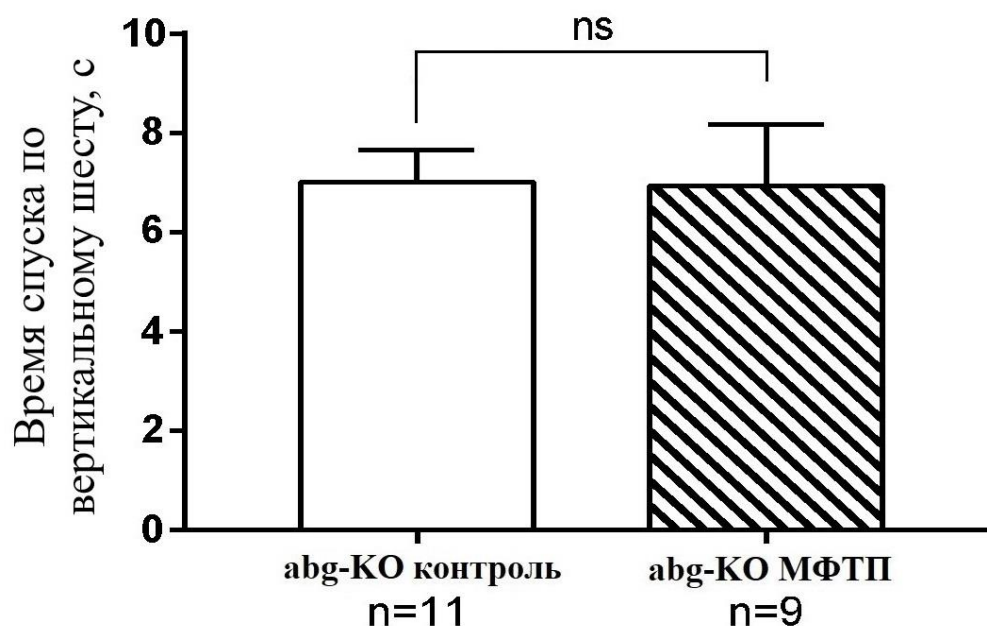


Рисунок 32. Анализ двигательной активности у 4-месячных животных линии *abg-KO* в базовом моторном тесте «вертикальный шест». Статистически значимых различий между группой, обработанной нейротоксином МФТП, и

контрольной группой, принимавшей физраствор, не выявлено. $p = 0.5510$, $M \pm SEM$. Тест Манна-Уитни (Mann–Whitney U-test).

Координация движений и мышечная сила конечностей, оцененные по способности мышей удерживаться на перевёрнутой сетке, также не различаются между группами: все животные успешно удерживались в течение всего времени теста, которое составляло 60 секунд (**Рис. 33**).

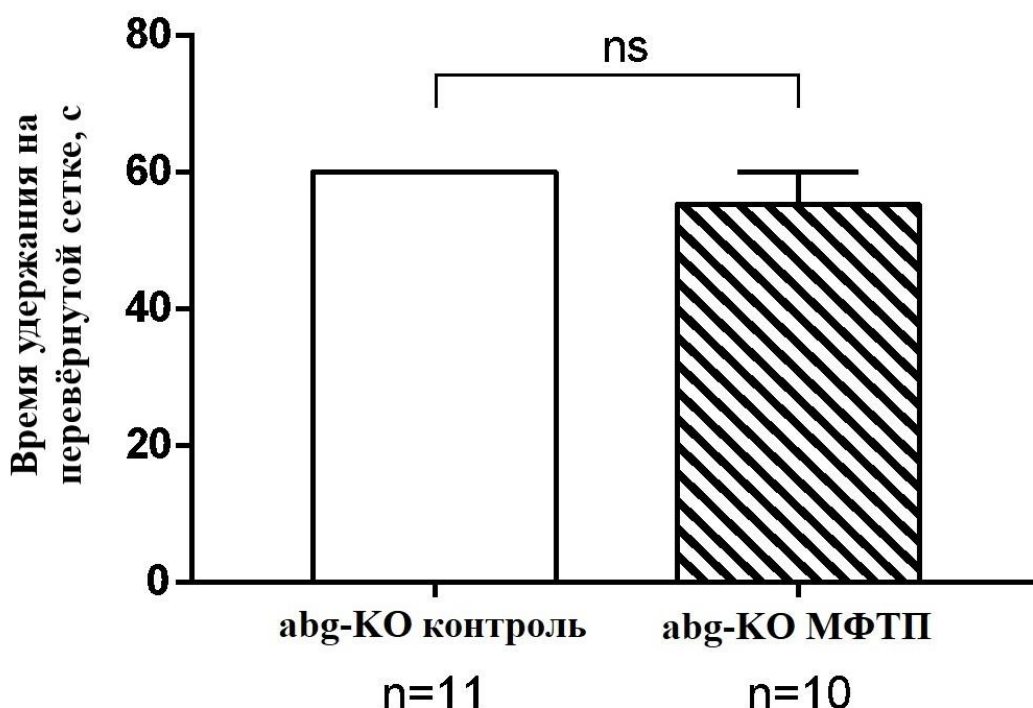


Рисунок 33. Исследование мышечной силы у бессинуклеиновых мышей в тесте «перевёрнутая сетка». Значения, использованные в статистическом анализе, оценивали по результатам трёх последовательных независимых тестов для каждого отдельного животного. $p = 0.4762$, $M \pm SEM$. Тест Манна-Уитни (Mann–Whitney U-test).

Таким образом, нами было установлено, что базовые моторные тесты не выявили МФТП-индуцированных изменений у бессинуклеиновых мышей линии abg-KO. Анализ двигательной функции на установке CatWalk показал, что у животных дикого типа, МФТП достоверно изменяет множество

параметров, описывающих походку. В то же время, у abg-KO животных под действием МФТП не изменяется ни один из 216 параметров, детектируемых установкой CatWalk (Noldus) (**Рис. 34**).

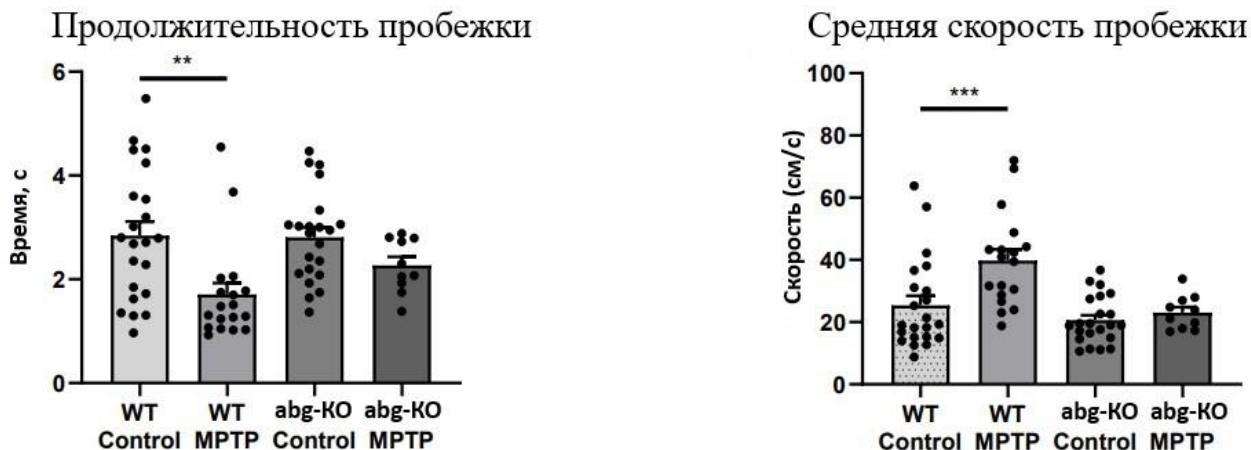


Рисунок 34. Устойчивый фенотип линии abg-KO к нарушениям походки, регистрируемый на установке CatWalk (Noldus) на примере параметров «Продолжительность пробежки» и «Средняя скорость пробежки», характеризующих брадикинезию у мышей. Однофакторный анализ ANOVA с использованием множественных сравнений Сидака (** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

3.5.2. Исследование нейрохимического дофаминового статуса в стриатуме у мышей, моделирующих дисфункцию всех трёх членов семейства синуклеинов

Извлечение структур стриатума из головного мозга экспериментальных мышей производили аналогичным методом, использованным ранее для альфа-синуклеин дефицитных животных. В ходе приготовления экстрактов для количественного определения катехоламинов выделенные структуры стриатумов извлекали из жидкого азота, измельчали в гомогенизаторе, после чего центрифугировали и наносили на фазовую колонку после инкубации в коммерческом наборе Pierce™ BCA Protein Assay Kit (“Thermo Scientific™”, США). Образцы подвергались исследованию

методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) для количественного определения дофамина (ДА) и его метаболитов – диоксифенилуксусной кислоты (ДОФУК), гомованилиновой кислоты (ГВК).

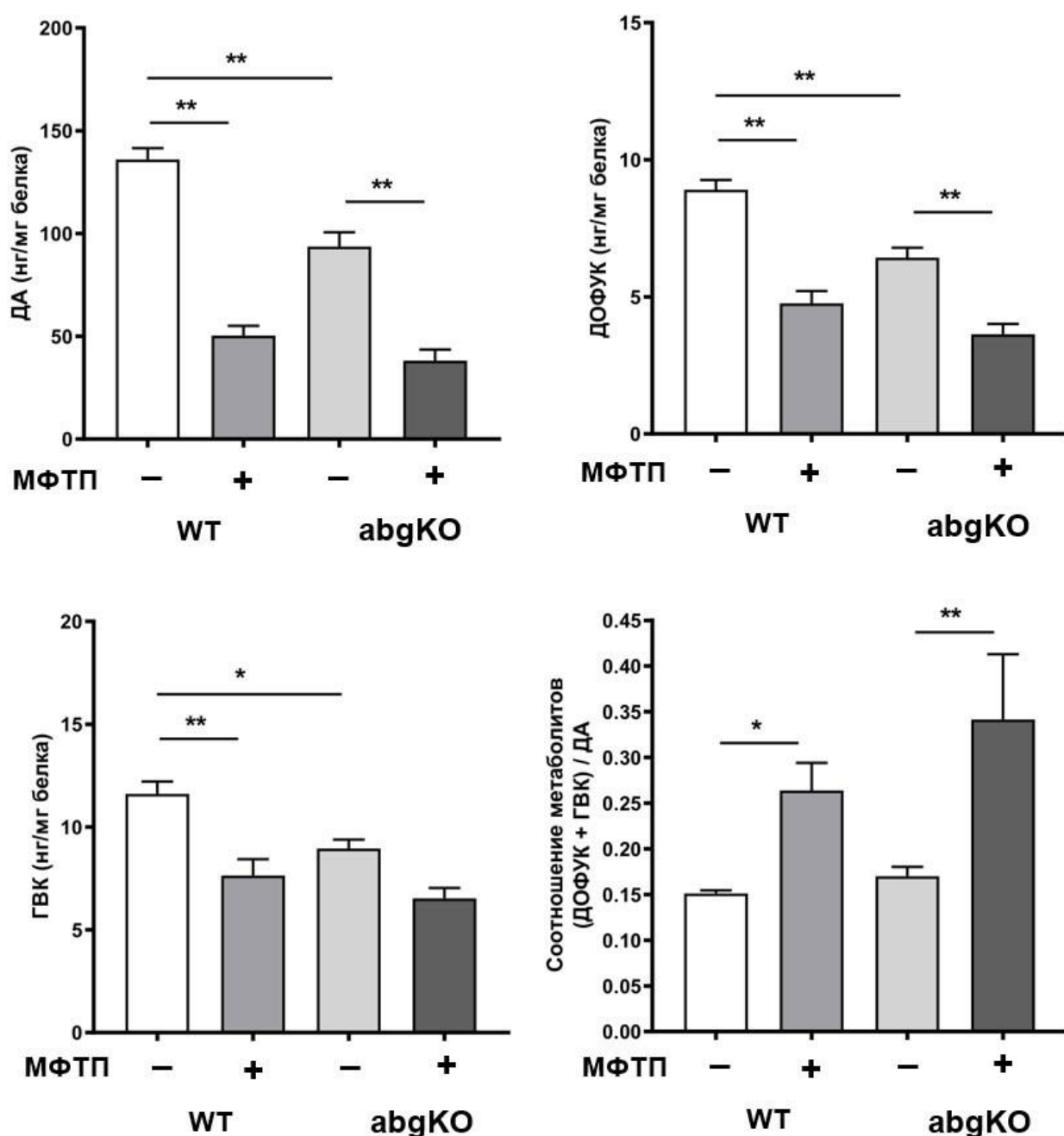


Рисунок 35. ВЭЖХ-анализ уровней дофамина и его метаболитов в стриатуме бесинуклеиновых мышей до и после введения МФТП. $M \pm SEM$, $n = 10$ в каждой группе; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$. Однофакторный дисперсионный анализ (one-way ANOVA) с применением критерия множественных сравнений Тьюки.

Полученные результаты измерения уровней дофамина и его метаболитов в стриатуме животных линии abg-КО продемонстрировали схожую с альфа-синуклеин дефицитными мышами клиническую картину (Рис. 35). Так, уровни дофамина достоверно снижались в контрольной (WT) и экспериментальной группах животных после введения МФТП (** $p < 0,01$), а соотношение содержания продуктов катаболизма дофамина (ДОФУК+ГБК/ДА) повышалось вследствие активного истощения молекул ДА в синаптических окончаниях ДА-ергических нейронов (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$). Однако стоит отметить, что у бессинуклеиновых животных, принимавших физраствор, обнаружено статистически значимое снижение дофамина, ДОФУК и ГБК относительно контрольных животных дикого типа (WT), что может свидетельствовать о нехватке функциональных белков семейства синуклеинов в регуляции дофаминовой нейротрансмиссии (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$).

Таким образом, сравнительный анализ содержания дофамина и его метаболитов в стриатуме головного мозга животных линии abg-КО и мышей с немодифицированным геномом показал схожесть токсического эффекта МФТП на нейрохимический дофаминовый статус.

3.5.3. Сравнительный морфометрический анализ дофаминергических нейронов чёрной субстанции и вентральной области покрышки у бессинуклеиновых мышей и животных с немодифицированным геномом

Ранее нами было продемонстрировано, что внутрибрюшинное введение МФТП по субхроническому протоколу вызывает стремительную потерю ДА-ергических нейронов в компактной части чёрной субстанции животных дикого типа C57BL/6J, в то время как мыши с селективной инактивацией гена альфа-синуклеина проявляют устойчивость к воздействию этого митохондриального нейротоксина. что согласуется с исследованиями,

проведёнными на Abel-KO линии [Abeliovich et al., 2000; Klivenyi et al., 2006; Robertson et al., 2004].

Для выяснения влияния других гомологичных членов семейства синуклеинов на выживаемость ДА-ергических нейронов ЧС и ВОП в условиях МФТП нейротоксичности был проведён морфометрический анализ числа ТГ-позитивно окрашенных клеток у бессинуклеиновых мышей линии abg-KO в соответствующих анатомических структурах, дифференциально поражаемых при БП.

Показано (Рис. 36), что в группах мышей, получавших физраствор, популяция ДА-ергических нейронов ЧС у животных этой линии не отличалась от таковой у контрольных животных с интактным геномом. Значимое снижение числа ДА-ергических нейронов в компактной части ЧС в группах мышей, получавших МФТП, было сходным у мышей с тройной делецией всех белков-синуклеинов и у контрольных животных с немодифицированным геномом. Данные результаты свидетельствуют о том, что нейротоксин МФТП воспроизводит аналогичный эффект гибели ДА-ергических нейронов ЧС на бессинуклеиновых мышях линии abg-KO.

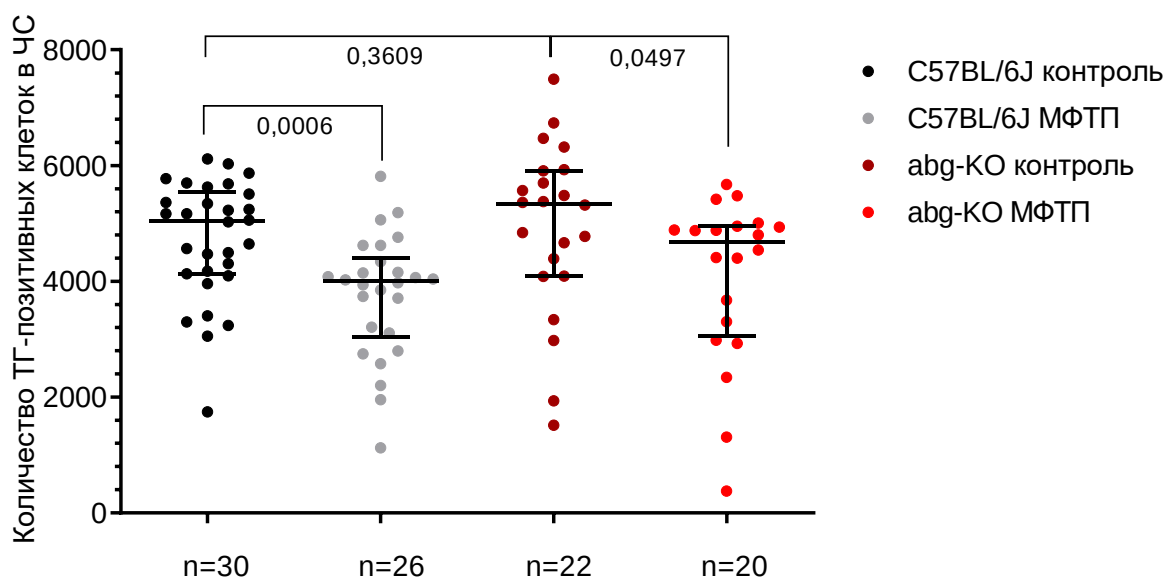


Рисунок 36. Популяция ДА-ергических нейронов ЧС у бессинуклеиновых и контрольных мышей с немодифицированным геномом. Данные представлены в виде медианы и межквартильного размаха (Ме [25%; 75%]) числа стереологически подсчитанных нейронов в компактной части ЧС животных каждого генотипа (abg-KO и C57BL/6J).

Из публикации: Голоборщева В.В., Воронина Н.А., Овчинников Р.К., Кучеряну В.Г., Морозов С.Г. Морфометрический анализ дофаминергических нейронов черной субстанции головного мозга мышей с генетическим нокаутом альфа-синуклеина при МФТП-индуцированном паркинсонизме // Патогенез. – 2021. – Т. 19. – №3 – С. 32-37.

Наши экспериментальные данные свидетельствуют о том, что наличие в геноме всех членов семейства синуклеинов не является необходимым для МФТП-индуцированной гибели ДА-ергических нейронов. Однако недавно было установлено, что β -синуклеин способен активизировать VMAT-2-зависимый захват ДА и структурно подобных ему молекул (например, конечный метаболит МФТП – 1-метил-4-фенил пиридиний (МФП+)) синаптическими везикулами для дальнейшей их секвестрации [Ninkina N., 2021]. Таким образом, вероятно, повышенная активность β -синуклеина в синаптических везикулах, а не дефицит других синуклеинов как таковых, объясняет пониженную чувствительность ДА-ергических нейронов ЧС к токсическому эффекту МФТП у альфа-синуклеин нокаутных животных.

Морфометрический анализ ТГ-позитивных клеток в вентральный области покрышки среднего мозга показал, что ДА-ергические нейроны ВОП мышей линии abg-KO более устойчивы к токсическому воздействию нейротоксина МФТП. В свою очередь у бессинуклеиновых животных, принимавших физраствор, не наблюдается изменений в числе ДА-ергических нейронов в ВОП по сравнению с животными дикого типа (**Рис. 37**).

Полученные нами результаты убедительно демонстрируют потерю устойчивости ДА-ергических нейронов ЧС к токсическому эффекту МФТП у мышей, моделирующих функциональную недостаточность всех членов семейства синуклеинов, по сравнению с альфа-синуклеин дефицитными животными. Таким образом, при генетическом «выключении» всех белков-синуклеинов в условиях МФТП-нейротоксичности развиваются типичные патоморфологические особенности паркинсонического синдрома. Отметим, что ДА-ергические нейроны вентральной области покрышки у мышей линии abg-KO менее чувствительны к МФТП относительно контрольных животных дикого типа.

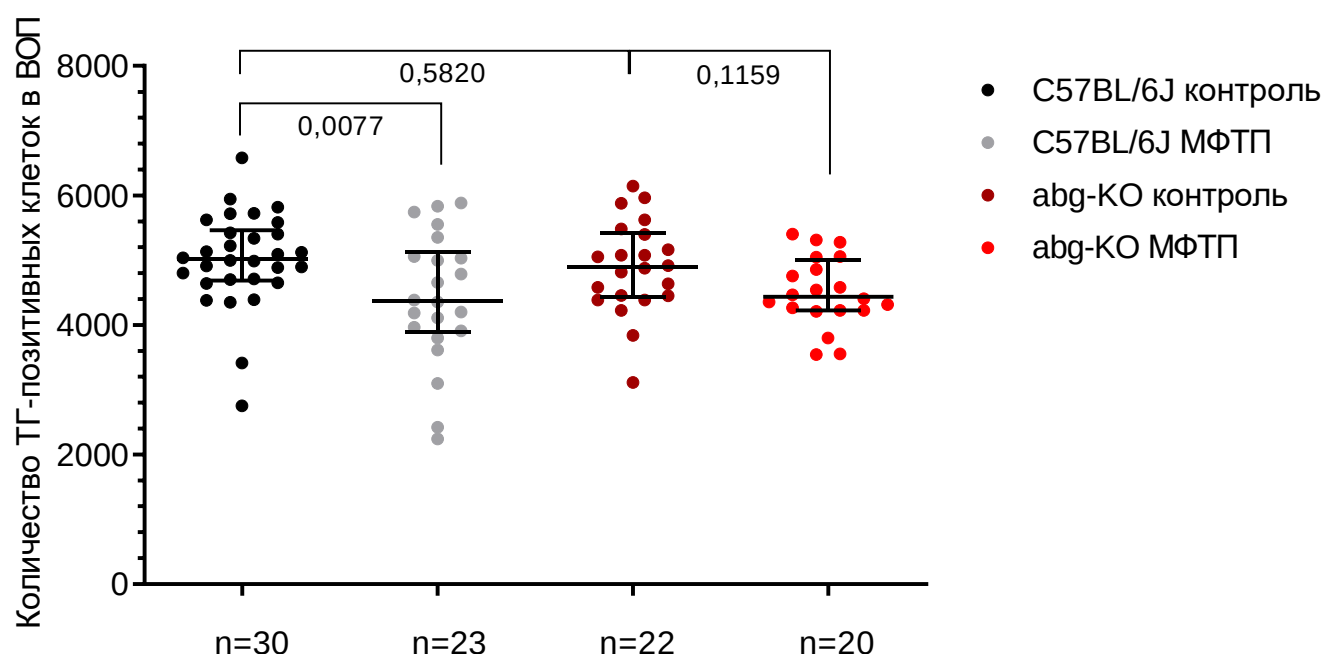


Рисунок 37. Популяция ДА-ергических нейронов ВОП у бессинуклеиновых и контрольных мышей с немодифицированным геномом. Данные представлены в виде среднего и стандартной ошибки среднего ($M \pm SEM$) числа стереологически подсчитанных нейронов в ВОП. Однофакторный анализ ANOVA в сочетании с критерием Фишера (PLSD post-hoc).

Таким образом, на основании проведённого морфометрического анализа предполагается, что особенности чувствительности к нейротоксину МФТП у альфа-синуклеин нокаутных линий мышей обусловлены повышением функциональной активности (замещением) бета-синуклеина, оптимизирующего захват ДА синаптическими везикулами.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Болезнь Паркинсона (БП) является тяжелым нейродегенеративным заболеванием, которое характеризуется резким истощением стриатного дофамина вследствие обширной гибели дофаминергических нейронов в черной субстанции среднего мозга. Белок альфа-синуклеин, обнаруженный в патогистологических включениях дофаминергических нейронов, стал важной и актуальной мишенью для исследований паркинсонизма в мировом научном сообществе.

В представленном исследовании моделирование компенсированного паркинсонического синдрома выполнено на двух независимых линиях мышей с генетическим нокаутом альфа-синуклеина (Δ Flox-KO и Abel-KO) путем введения нейротоксина МФТП по субхроническому протоколу. Ранее нейротоксический эффект у мышей линии Δ Flox-KO не был изучен.

Показано, что МФТП вызывает снижение уровня дофамина и изменение соотношения его метаболитов в стриатуме мышей обеих линий до одинакового уровня. Сравнительный морфометрический анализ установил повышенную резистентность дофаминергических нейронов компактной части чёрной субстанции к токсическому воздействию МФТП, однако в вентральной области покрышки этот эффект был менее выражен. Тестирование мышей Δ Flox-KO и Abel-KO в установке CatWalk XT (“Noldus”) выявило идентичные нарушения походки по показателю интенсивности давления конечности на поверхность пластины аппарата. Полученные данные позволяют заключить, что у мышей Δ Flox-KO и Abel-KO с нокаутом гена альфа-синуклеина компенсированный паркинсонический синдром развивается по сходному механизму. Это актуально, поскольку линия Δ Flox-KO является конечной формой генетического нокаута для прижизненной делеции гена альфа-синуклеина. До настоящего времени линия Δ Flox-KO остается единственной линией мышей для кондиционной инактивации альфа-синуклеина.

В недавнем исследовании было продемонстрировано, что инактивация гена альфа-синуклеина с той же генетической модификацией, что и у линии Δ Flox-KO, но индуцированная Cre-рекомбиназой в нейронах взрослых или стареющих животных, вызвала полное истощение альфа-синуклеина из дорсального стриатума – области мозга, где располагаются пресинаптические терминалы, богатые альфа-синуклеином. Однако такое позднее истощение не привело к потере дофаминергических нейронов в ЧС [Ninkina et al., 2020] в отличие от результатов, полученных на животных с конечной формой генетического нокаута альфа-синуклеина [Goloborshcheva et al., 2020]. Взятые вместе, результаты этих исследований убедительно свидетельствуют о том, что альфа-синуклеин необходим для эффективного выживания или созревания дофаминергических нейронов в развивающейся ЧС, но не является важным для выживания зрелых дофаминергических нейронов. В настоящее время также нельзя исключать, что определенная популяция развивающихся дофаминергических нейронов особенно чувствительна к отсутствию альфа-синуклеина.

Стоит отметить, что подбор репрезентативной экспериментальной модели *in vivo* является чрезвычайно важным этапом научных исследований. Так, методом количественной ОТ-ПЦР нами была проведена оценка уровней экспрессии гена мультимерина 1, расположенного в непосредственной близости с модифицированным локусом альфа-синуклеина в двух независимых альфа-синуклеин дефицитных линиях Δ Flox-KO, Abel-KO. В результате было установлено, что масштабная делеция части генома в линии Abel-KO, которая затрагивает регуляторные элементы мультимерина 1, приводит к увеличению экспрессии этого гена в коре головного мозга в 35 раз, в то время как уровни экспрессии в линиях Δ Flox-KO не отличаются от таковых в контрольных мышцах с интактным геномом.

Большинство экспериментальных животных моделей, воспроизводящий недостаток альфа синуклеина, фенотипически не отличимы

от животных дикого типа. Чем объясняется тот факт, что мышинные нейроны почти безразличны к присутствию такого эволюционно консервативного и белка, как альфа-синуклеин?

Можно предположить, что развивающиеся эмбриональные нейроны синуклеин-дефицитных мышей включают определенные внутренние механизмы, которые компенсируют отсутствие синуклеинов. Активация этих механизмов позволяет нейронам выживать в критические периоды развития и функционировать во взрослой нервной системе. Хотя нет экспериментальных данных, которые могли бы дать представление о природе этих внутриклеточных механизмов и их взаимосвязи с механизмами, которые придают нейронам толерантность к альфа-синуклеину. Можно так же предположить, что активация компенсаторных процессов и путей выживания может сделать нейроны менее чувствительными к определенным токсическим воздействиям. Действительно, ДА нейроны компактной области ЧС мышей с альфа- и гамма- синуклеиновым нокаутом оказались устойчивыми к токсическому действию МФТП, параквата и малоната [Buchman & Ninkina, 2008; Chartier-Harlin et al., 2004].

Поскольку семейство синуклеинов включает три очень сходных по структуре белка, нельзя исключить и возможность замещения функции генетически инактивированного альфа-синуклеина двумя другими функционально активными членами семейства. Такое замещение возможно с высокой эффективностью в период эмбрионального развития на стадии онтогенетической селекции, когда пластичность нервной системы исключительно высока. Поэтому у взрослых нокаутных животных в фенотипе единичного нокаута не будет полностью воспроизведен механизм нарушения функции изучаемого синуклеина. Чтобы исключить феномен функционального замещения в семействе синуклеинов нами были созданы линии бессинуклеиновых мышей, из генома которых удалены все три гена, кодирующие альфа-, бета- и гамма-синуклеины, расположенные на трех

разных хромосомах. В результате анализа установили, что через три недели после последней инъекции МФТП происходит аналогичная потеря дофаминергических нейронов ЧС, аналогичные изменения в метаболизме дофамина в стриатуме, аналогичное поведение в основных двигательных тестах, и только изменения некоторых параметров походки, оцененные с помощью системы NoldusCatWalk, были различными для мышей WT и abg-КО. Таким образом, мы продемонстрировали, что наличие в геноме всех членов семейства синуклеинов не является необходимым для проявления основных эффектов субхронического протокола введения МФТП.

В лаборатории ИФАВ РАН было проведено исследование области ЧС и ВОП мышей с инактивацией трёх генов синуклеинов на 7-ой день после рождения. Проведенный анализ показал, что на данном этапе развития возможна полная компенсация эффекта отсутствия не только альфа-, но и всех трех белков-синуклеинов [Тарасова Т.В., 2016].

Таким образом, на основании всех исследований предполагается, что различия в чувствительности к нейротоксину МФТП обусловлены и являются следствием онтогенетической селекции ранних нейронов с последующей компенсацией бета-синуклеином, оптимизирующим захват ДА синапсами, за счет механизмов пластичности эмбрионального мозга. Это подтверждается данными по МФТП-токсичности на бессинуклеиновых животных с инаktivированием всех 3-х генов синуклеинов. В сравнении с одиночными нокаутами по альфа- или гамма-синуклеину у животных с тройным нокаутом чувствительность ДА-ергических нейронов к токсическому воздействию МФТП выше и почти не отличается от чувствительности у контрольных животных дикого типа, что согласуется с другими исследованиями [Anwar et al., 2011].

Полученные нами результаты указывают на важную роль альфа-синуклеина и других членов семейства синуклеинов в обороте дофамина в пресинаптических окончаниях, выживаемости дофаминергических нейронов,

а также проявлении ранних признаков паркинсонизма, что в сочетании с уже имеющимися в настоящее время данными позволяет рассматривать белки этого семейства в качестве перспективных молекулярных мишеней для разработки терапии, направленной на оптимизацию функции синапсов дофаминергических нейронов. А использованные в работе генетически «бесследовые» нокаутные линии Δ Flox-KO и abg-KO – в качестве перспективных модельных систем для исследования механизмов нейродегенеративных процессов при синуклеинопатиях.

ВЫВОДЫ

1. На МФТП-индуцированной модели паркинсонического синдрома у мышей с генетическим нокаутом альфа-синуклеина показано, что выраженность проявлений гипокинезии (интенсивность нажатия конечностей на пластину) сходна с таковой у животных с немодифицированным геномом.

2. Выявлено снижение общего количества ДА-ергических нейронов в ЧС взрослых мышей Abel-KO и ΔFlox-KO на 20-22% относительно контрольных мышей дикого типа. Введение МФТП вызвало снижение числа ДА-ергических нейронов компактной части ЧС на 25% у мышей дикого типа, на 2,7% у мышей линии Abel-KO, а в линии ΔFlox-KO снижения числа нейронов в популяции не отмечено, что иллюстрирует устойчивость альфа-синуклеин нокаутных линий к токсическому эффекту МФТП.

3. Установлено, что общее число ДА-ергических нейронов вентральной области покрышки (ВОП) в двух линиях с избирательной инактивацией альфа-синуклеина снижается на ~30% относительно животных с немодифицированным геномом. В этой популяции также отмечается устойчивость к токсическому воздействию МФТП.

4. Показано снижение уровня дофамина (ДА) и его метаболитов (ДОФУК и ГВК) у альфа-синуклеин нокаутных мышей в условиях МФТП-индуцированного паркинсонического синдрома, причем данный эффект в линии Abel-KO был менее выраженным. Изменений уровня серотонина во всех линиях исследуемых мышей не отмечено.

5. Показано, что генетическая инактивация всех трёх членов семейства синуклеинов в условиях МФТП-индуцированного паркинсонизма не влияет на выживаемость ДА-ергических нейронов ЧС и ВОП, а также на уровень дофамина и продуктов его метаболизма, по всей вероятности, вследствие дефицита бета-синуклеина, регулирующего VMAT-2-зависимый захват моноаминов синаптическими пузырьками.

6. Генетические модификации локуса альфа-синуклеина в линии ΔFlox-KO не влияют на уровни экспрессии соседнего гена мультимерин 1, в то время как привнесённые посторонние регуляторные последовательности в линии Abel-KO повышают уровни экспрессии этого гена в коре головного мозга в 35 раз.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Использование линии ΔFlox-KO является наиболее предпочтительным для моделирования потери функции альфа-синуклеина.

2. Элементы технологии CatWalk могут стать перспективной основой для разработки высокочувствительного неинвазивного метода ранней диагностики двигательных нарушений при БП.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Атаджанов М. А. Паркинсонизм и 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридин. Обзор // Невропатологии и психиатрии им. Корсакова. — 1991. — С. 117-121.
2. Волошин М. Я. Экспериментальное воспроизведение катехоламиндефицитных состояний и проблема паркинсонизма // Нейрофизиология. — 1990. — Т. 22, №3. — С. 401-414.
3. 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.
4. Воронков Д.Н., Сальков В.Н., Ануфриев П.Л., Худоерков Р.М.. Тельца Леви при болезни Паркинсона (гистологическое, иммуногистохимическое и интерферометрическое исследование) // Архив патологии. — 2018. — Т. 80. — № 4. — С. 9-13.
5. Воронков Д.Н., Сальков В.Н., Сальникова О.В., Соболев В.Б., Худоерков Р.М. Иммуногистохимическая локализация альфа-синуклеина в нервной системе интактных животных, при болезни Паркинсона и моделировании паркинсонизма // Клиническая и экспериментальная морфология. — 2019. — Т. 8. — № 1. — С. 39-46.
6. Голоборщева В.В., Воронина Н.А., Овчинников Р.К., Кучеряну В.Г., член-корреспондент РАН Морозов С.Г. Моделирование МФТП-индуцированного паркинсонизма на генетически модифицированных мышцах // Патогенез. — 2021. — Т. 19, № 2. — С. 12-23
7. Голоборщева В.В., Воронина Н.А., Овчинников Р.К., Кучеряну В.Г., Морозов С.Г. Морфометрический анализ дофаминергических нейронов черной субстанции головного мозга мышей с генетическим нокаутом альфа-синуклеина при МФТП-индуцированном паркинсонизме // Патогенез. — 2021. — Т. 19, №3 — С. 32-37

8. Иллариошкин, С.Н., Ахмадуллина Д.Р. Современные клеточные и антисинуклеиновые стратегии при болезни Паркинсона: есть ли свет в конце тоннеля? // Вестник Российской Военно-медицинской академии. – 2020. – № S3. – С. 42-49.
9. Козина Е.А. Колачёва А.А., Кудрин В.С., Кучеряну В.Г., Хайндрава В.Г., Угрюмов М.В. Хронические модели доклинической и ранней клинической стадий болезни Паркинсона на мышах // Нейрохимия. — 2016. — Т. 33, № 3. — С. 222-229.
10. Крыжановский Г.Н. Карабань И. Н., Магаева С.В., Кучеряну В.Г., Карабань Н.В. Болезнь Паркинсона (этиология, патогенез, клиника, диагностика, лечение, профилактика) // Москва: Медицина. — 2002. — С. 336.
11. Маньковский Н.Б. Вайншток А.Б., Олейник Л.И. Сосудистый паркинсонизм // Киев: Здоров'я. — 1982. — С. 208.
12. Маньковский Н.Б. Карабань И.Н., Крыжановский Г.Н., Евсеев В.А., Магаева С.В., Ветрилэ Л.А., Трекова Н.А., Башарова Л.А., Голубев К.М. Антитела к дофамину у больных паркинсонизмом и их возможная роль в патогенезе паркинсонического синдрома // Журнал невропатологии и психиатрии. — 1993. — Т. 6. — С. 7-11.
13. Нинкина Н.Н. Бухман В. Л. Синуклеины – иметь или не иметь? // Генетика. — 2000а. — Т. 36. — С. 1487-1491.
14. Нинкина Н.Н. Устюгов А.А., Бухман В.Л. . Моделирование синуклеинопатий в генетически модифицированных животных – успехи и неудачи. // Молекулярная биология. — 2008. — Т. 42, № 5. — С. 840-55.
15. Сальков В.Н., Воронков Д.Н., Хачева К.К., Федотова Е.Ю., Худоев Р.М, Иллариошкин С.Н. Клинико-морфологический анализ случая болезни Паркинсона // Архив патологии. – 2020. – Т. 82. – № 2. – С. 52-56.

16. Тарасова Т.В., Устюгов А.А., Нинкина Н.Н., Скворцова В.И. Новая линия генетически модифицированных мышей с конститутивным нокаутом гена альфа-синуклеина для изучения патогенетических аспектов дифференциального поражения дофаминергических нейронов. // Патол. Физиол. Эксп. Тер. — 2016. — Т. 60, № 3. — С. 4-9.
17. Тарасова Т. В. Роль альфа-синуклеина в формировании популяций дофаминергических нейронов ядер среднего мозга, дифференциально поражаемых при болезни Паркинсона” (экспериментальное исследование), диссертация канд.мед.наук. / Т.В.Тарасова. – Москва // — 2016. — С. 142.
18. Угрюмов М. В. Компенсаторные возможности мозга // Наука в России. — 2008. — Т. 3. — С. 4-11.
19. Юдина В. В., Макаров Н. С., Юдина Г. К. 90 лет нигерной теории паркинсонизма // Саратовский научно- медицинский журнал. — 2009. — Т. 5, № 2. — С. 279–282.
20. Abeliovich A., Schmitz Y., Farinas I., Choi-Lundberg D., Ho W. H., Castillo P. E., Shinsky N., Verdugo J. M., Armanini M., Ryan A., Hynes M., Phillips H., Sulzer D., Rosenthal A. Mice lacking alpha-synuclein display functional deficits in the nigrostriatal dopamine system // Neuron. — 2000. — Jan. — Т. 25, № 1. — С. 239-52.
21. Abercrombie M. Estimation of nuclear population from microtome sections // Anat Rec. — 1946. — Feb. — Т. 94. — С. 239-47.
22. Al-Wandi A., Ninkina N., Millership S., Williamson S. J., Jones P. A., Buchman V. L. Absence of alpha-synuclein affects dopamine metabolism and synaptic markers in the striatum of aging mice // Neurobiol Aging. — 2010. — May. — Т. 31, № 5. — С. 796-804.
23. Aleyasin H., Rousseaux M. W., Marcogliese P. C., Hewitt S. J., Irrcher I., Joselin A. P., Parsanejad M., Kim R. H., Rizzu P., Callaghan S. M., Slack R. S., Mak T. W., Park D. S. DJ-1 protects the nigrostriatal axis from the

- neurotoxin MPTP by modulation of the AKT pathway // *Proc Natl Acad Sci U S A*. — 2010. — Feb 16. — T. 107, № 7. — C. 3186-91.
- 24.** Andres-Mateos E., Mejias R., Sasaki M., Li X., Lin B. M., Biskup S., Zhang L., Banerjee R., Thomas B., Yang L., Liu G., Beal M. F., Huso D. L., Dawson T. M., Dawson V. L. Unexpected lack of hypersensitivity in LRRK2 knock-out mice to MPTP (1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine) // *J Neurosci*. — 2009. — Dec 16. — T. 29, № 50. — C. 15846-50.
- 25.** Anwar S., Peters O., Millership S., Ninkina N., Doig N., Connor-Robson N., Threlfell S., Kooner G., Deacon R. M., Bannerman D. M., Bolam J. P., Chandra S. S., Cragg S. J., Wade-Martins R., Buchman V. L. Functional alterations to the nigrostriatal system in mice lacking all three members of the synuclein family // *J Neurosci*. — 2011. — May 18. — T. 31, № 20. — C. 7264-74.
- 26.** Appel-Cresswell S., Vilarino-Guell C., Encarnacion M., Sherman H., Yu I., Shah B., Weir D., Thompson C., Szu-Tu C., Trinh J., Aasly J. O., Rajput A., Rajput A. H., Jon Stoessl A., Farrer M. J. Alpha-synuclein p.H50Q, a novel pathogenic mutation for Parkinson's disease // *Mov Disord*. — 2013. — Jun. — T. 28, № 6. — C. 811-3.
- 27.** Arbez N., He X., Huang Y., Ren M., Liang Y., Nucifora F. C., Wang X., Pei Z., Tessarolo L., Smith W. W., Ross C. A. G2019S-LRRK2 mutation enhances MPTP-linked Parkinsonism in mice // *Hum Mol Genet*. — 2020. — Mar 13. — T. 29, № 4. — C. 580-590.
- 28.** Aznavour N., Cendres-Bozzi C., Lemoine L., Buda C., Sastre J. P., Mincheva Z., Zimmer L., Lin J. S. MPTP animal model of Parkinsonism: dopamine cell death or only tyrosine hydroxylase impairment? A study using PET imaging, autoradiography, and immunohistochemistry in the cat // *CNS Neurosci Ther*. — 2012. — Nov. — T. 18, № 11. — C. 934-41.
- 29.** Ballard P. A., Tetud J. W., Langston J. W. Permanent human parkinsonism due to 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP): seven cases // *Neurology*. — 1985. — Jul. — T. 35, № 7. — C. 949-56.

30. Beitz J. M. Parkinson's disease: a review // *Front Biosci* (Schol Ed). — 2014. — Jan 1. — T. 6. — C. 65-74.
31. Bettiol S. S., Rose T. C., Hughes C. J., Smith L. A. Alcohol Consumption and Parkinson's Disease Risk: A Review of Recent Findings // *J Parkinsons Dis*. — 2015. — T. 5, № 3. — C. 425-42.
32. 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. — Feb. — T. 155, № 2. — C. 268-73.
33. Biagioni F., Vivacqua G., Lazzeri G., Ferese R., Iannaccone S., Onori P., Morini S., D'Este L., Fornai F. Chronic MPTP in Mice Damage-specific Neuronal Phenotypes within Dorsal Laminae of the Spinal Cord // *Neurotox Res*. — 2021. — Apr. — T. 39, № 2. — C. 156-169.
34. Biju K. C., Evans R. C., Shrestha K., Carlisle D. C. B., Gelfond J., Clark R. A. Methylene Blue Ameliorates Olfactory Dysfunction and Motor Deficits in a Chronic MPTP/Probenecid Mouse Model of Parkinson's Disease // *Neuroscience*. — 2018. — Jun 1. — T. 380. — C. 111-122.
35. Blandini F., Armentero M. T. Animal models of Parkinson's disease // *FEBS J*. — 2012. — Apr. — T. 279, № 7. — C. 1156-66.
36. Blandini F., Porter R. H., Greenamyre J. T. Glutamate and Parkinson's disease // *Mol Neurobiol*. — 1996. — Feb. — T. 12, № 1. — C. 73-94.
37. Blesa J., Przedborski S. Parkinson's disease: animal models and dopaminergic cell vulnerability // *Front Neuroanat*. — 2014. — T. 8. — C. 155.
38. Bras I. C., Dominguez-Mejide A., Gerhardt E., Koss D., Lazaro D. F., Santos P. I., Vasili E., Xylaki M., Outeiro T. F. Synucleinopathies: Where we are and where we need to go // *J Neurochem*. — 2020. — May. — T. 153, № 4. — C. 433-454.
39. Brooks D. J. The early diagnosis of Parkinson's disease // *Ann Neurol*. — 1998. — Sep. — T. 44, № 3 Suppl 1. — C. S10-8.

40. Brown T. P., Rumsby P. C., Capleton A. C., Rushton L., Levy L. S. Pesticides and Parkinson's disease--is there a link? // *Environ Health Perspect.* — 2006. — Feb. — T. 114, № 2. — C. 156-64.
41. Buchman V. L., Ninkina N. Modulation of alpha-synuclein expression in transgenic animals for modelling synucleinopathies--is the juice worth the squeeze? // *Neurotox Res.* — 2008. — Dec. — T. 14, № 4. — C. 329-41.
42. Cabin D. E., Shimazu K., Murphy D., Cole N. B., Gottschalk W., McIlwain K. L., Orrison B., Chen A., Ellis C. E., Paylor R., Lu B., Nussbaum R. L. Synaptic vesicle depletion correlates with attenuated synaptic responses to prolonged repetitive stimulation in mice lacking alpha-synuclein // *J Neurosci.* — 2002. — Oct 15. — T. 22, № 20. — C. 8797-807.
43. Calne D. B. Problems with L-DOPA therapy // *Clin Med.* — 1971. — T. 78. — C. 21-23.
44. Caudle W. M., Guillot T. S., Lazo C. R., Miller G. W. Industrial toxicants and Parkinson's disease // *Neurotoxicology.* — 2012. — Mar. — T. 33, № 2. — C. 178-88.
45. Ceccatelli S. Mechanisms of neurotoxicity and implications for neurological disorders // *J Intern Med.* — 2013. — May. — T. 273, № 5. — C. 426-8.
46. Chandra S., Fornai F., Kwon H. B., Yazdani U., Atasoy D., Liu X., Hammer R. E., Battaglia G., German D. C., Castillo P. E., Sudhof T. C. Double-knockout mice for alpha- and beta-synucleins: effect on synaptic functions // *Proc Natl Acad Sci U S A.* — 2004. — Oct 12. — T. 101, № 41. — C. 14966-71.
47. Chaprov K. D., Goloborshcheva V. V., Tarasova T. V., Teterina E. V., Korokin M. V., Soldatov V. O., Pokrovskiy M. V., Kucheryanu V. G., Morozov S. G., Ovchinnikov R. K. Increased Expression of the Multimerin-1 Gene in alpha-Synuclein Knockout Mice // *Dokl Biol Sci.* — 2020. — Sep. — T. 494, № 1. — C. 260-263.
48. Chaprov K. D., Teterina E. V., Roman A. Y., Ivanova T. A., Goloborshcheva V. V., Kucheryanu V. G., Morozov S. G., Lysikova E. A., Lytkina O. A.,

- Koroleva I. V., Popova N. I., Antohin A. I., Ovchinnikov R. K., Kukharsky M. S. [Comparative Analysis of MPTP Neurotoxicity in Mice with a Constitutive Knockout of the alpha-Synuclein Gene] // *Mol Biol (Mosk)*. — 2021. — Jan-Feb. — T. 55, № 1. — C. 152-163.
49. Charcot J. M. De la paralysie agitante. // *Oeuvres complètes, Recueillies et publiées par Bourneville, Paris: Bureaux du Progrès Médical*. — 1872. — C. 155-189.
50. Chartier-Harlin M. C., Kachergus J., Roumier C., Mouroux V., Douay X., Lincoln S., Levecque C., Larvor L., Andrieux J., Hulihan M., Waucquier N., Defebvre L., Amouyel P., Farrer M., Destee A. Alpha-synuclein locus duplication as a cause of familial Parkinson's disease // *Lancet*. — 2004. — Sep 25-Oct 1. — T. 364, № 9440. — C. 1167-9.
51. Chia S. J., Tan E. K., Chao Y. X. Historical Perspective: Models of Parkinson's Disease // *Int J Mol Sci*. — 2020. — Apr 2. — T. 21, № 7.
52. Chinta S. J., Lieu C. A., Demaria M., Laberge R. M., Campisi J., Andersen J. K. Environmental stress, ageing and glial cell senescence: a novel mechanistic link to Parkinson's disease? // *J Intern Med*. — 2013. — May. — T. 273, № 5. — C. 429-36.
53. Choudhury G. R., Daadi M. M. Charting the onset of Parkinson-like motor and non-motor symptoms in nonhuman primate model of Parkinson's disease // *PLoS One*. — 2018. — T. 13, № 8. — C. e0202770.
54. Cleeter M. W., Cooper J. M., Schapira A. H. Irreversible inhibition of mitochondrial complex I by 1-methyl-4-phenylpyridinium: evidence for free radical involvement // *J Neurochem*. — 1992. — Feb. — T. 58, № 2. — C. 786-9.
55. Connor-Robson N., Peters O. M., Millership S., Ninkina N., Buchman V. L. Combinational losses of synucleins reveal their differential requirements for compensating age-dependent alterations in motor behavior and dopamine metabolism // *Neurobiol Aging*. — 2016. — Oct. — T. 46. — C. 107-12.

56. Dauer W., Kholodilov N., Vila M., Trillat A. C., Goodchild R., Larsen K. E., Staal R., Tieu K., Schmitz Y., Yuan C. A., Rocha M., Jackson-Lewis V., Hersch S., Sulzer D., Przedborski S., Burke R., Hen R. Resistance of alpha-synuclein null mice to the parkinsonian neurotoxin MPTP // *Proc Natl Acad Sci U S A*. — 2002. — Oct 29. — T. 99, № 22. — C. 14524-9.
57. Dickson D. W. Neuropathology of Parkinson disease // *Parkinsonism Relat Disord*. — 2018. — Jan. — T. 46 Suppl 1. — C. S30-S33.
58. Dijkstra A. A., Voorn P., Berendse H. W., Groenewegen H. J., Netherlands Brain B., Rozemuller A. J., van de Berg W. D. Stage-dependent nigral neuronal loss in incidental Lewy body and Parkinson's disease // *Mov Disord*. — 2014. — Sep. — T. 29, № 10. — C. 1244-51.
59. Ding Y., Kong D., Zhou T., Yang N. D., Xin C., Xu J., Wang Q., Zhang H., Wu Q., Lu X., Lim K., Ma B., Zhang C., Li L., Huang W. alpha-Arbutin Protects Against Parkinson's Disease-Associated Mitochondrial Dysfunction In Vitro and In Vivo // *Neuromolecular Med*. — 2020. — Mar. — T. 22, № 1. — C. 56-67.
60. Drolet R. E., Behrouz B., Lookingland K. J., Goudreau J. L. Mice lacking alpha-synuclein have an attenuated loss of striatal dopamine following prolonged chronic MPTP administration // *Neurotoxicology*. — 2004. — Sep. — T. 25, № 5. — C. 761-9.
61. Dutta D., Kundu M., Mondal S., Roy A., Ruehl S., Hall D. A., Pahan K. RANTES-induced invasion of Th17 cells into substantia nigra potentiates dopaminergic cell loss in MPTP mouse model of Parkinson's disease // *Neurobiol Dis*. — 2019. — Dec. — T. 132. — C. 104575.
62. Fahn S. The spectrum of levodopa-induced dyskinesias // *Ann Neurol*. — 2000. — Apr. — T. 47, № 4 Suppl 1. — C. S2-9; discussion S9-11.
63. Fields C. R., Bengoa-Vergniory N., Wade-Martins R. Targeting Alpha-Synuclein as a Therapy for Parkinson's Disease // *Front Mol Neurosci*. — 2019. — T. 12. — C. 299.

64. Filograna R., Beltramini M., Bubacco L., Bisaglia M. Anti-Oxidants in Parkinson's Disease Therapy: A Critical Point of View // *Curr Neuropharmacol.* — 2016. — T. 14, № 3. — C. 260-71.
65. Fornai F., Schluter O. M., Lenzi P., Gesi M., Ruffoli R., Ferrucci M., Lazzeri G., Busceti C. L., Pontarelli F., Battaglia G., Pellegrini A., Nicoletti F., Ruggieri S., Paparelli A., Sudhof T. C. Parkinson-like syndrome induced by continuous MPTP infusion: convergent roles of the ubiquitin-proteasome system and alpha-synuclein // *Proc Natl Acad Sci U S A.* — 2005. — Mar 1. — T. 102, № 9. — C. 3413-8.
66. Fox S. H., Brotchie J. M. The MPTP-lesioned non-human primate models of Parkinson's disease. Past, present, and future // *Prog Brain Res.* — 2010. — T. 184. — C. 133-57.
67. The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates. Third Edition. / Franklin K. B. J., Paxinos G. — USA: Academic Press is an imprint of Elsevier, 2007.
68. Francardo V. Modeling Parkinson's disease and treatment complications in rodents: Potentials and pitfalls of the current options // *Behav Brain Res.* — 2018. — Oct 15. — T. 352. — C. 142-150.
69. Fritsch T., Smyth K. A., Wallendal M. S., Hyde T., Leo G., Geldmacher D. S. Parkinson disease: research update and clinical management // *South Med J.* — 2012. — Dec. — T. 105, № 12. — C. 650-6.
70. Garcia-Reitboeck P., Anichtchik O., Dalley J. W., Ninkina N., Tofaris G. K., Buchman V. L., Spillantini M. G. Endogenous alpha-synuclein influences the number of dopaminergic neurons in mouse substantia nigra // *Exp Neurol.* — 2013. — Oct. — T. 248. — C. 541-5.
71. Gazewood J. R. D., Clebak K. Parkinson Disease: An update // *American Family Physician.* — 2013. — T. 87, № 4. — C. 267-273.
72. Gibrat C., Saint-Pierre M., Bousquet M., Levesque 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. — Jun. — T. 109, № 5. — C. 1469-82.

73. Gluck M. R., Krueger M. J., Ramsay R. R., Sablin S. O., Singer T. P., Nicklas W. J. Characterization of the inhibitory mechanism of 1-methyl-4-phenylpyridinium and 4-phenylpyridine analogs in inner membrane preparations // *J Biol Chem.* — 1994. — Feb 4. — T. 269, № 5. — C. 3167-74.
74. Goedert M. Familial Parkinson's disease. The awakening of alpha-synuclein // *Nature.* — 1997. — Jul 17. — T. 388, № 6639. — C. 232-3.
75. Goedert M., Jakes R., Spillantini M. G. The Synucleinopathies: Twenty Years On // *J Parkinsons Dis.* — 2017. — T. 7, № s1. — C. S51-S69.
76. Goedert M., Spillantini M. G., Del Tredici K., Braak H. 100 years of Lewy pathology // *Nat Rev Neurol.* — 2013. — Jan. — T. 9, № 1. — C. 13-24.
77. Goetz C. G. The history of Parkinson's disease: early clinical descriptions and neurological therapies // *Cold Spring Harb Perspect Med.* — 2011. — Sep. — T. 1, № 1. — C. a008862.
78. Goloborshcheva V. V., Chaprov K. D., Teterina E. V., Ovchinnikov R., Buchman V. L. Reduced complement of dopaminergic neurons in the substantia nigra pars compacta of mice with a constitutive "low footprint" genetic knockout of alpha-synuclein // *Mol Brain.* — 2020. — May 11. — T. 13, № 1. — C. 75.
79. Greten-Harrison B., Polydoro M., Morimoto-Tomita M., Diao L., Williams A. M., Nie E. H., Makani S., Tian N., Castillo P. E., Buchman V. L., Chandra S. S. alphasynuclein-Synuclein triple knockout mice reveal age-dependent neuronal dysfunction // *Proc Natl Acad Sci U S A.* — 2010. — Nov 9. — T. 107, № 45. — C. 19573-8.
80. Haaxma C. A., Bloem B. R., Borm G. F., Oyen W. J., Leenders K. L., Eshuis S., Booij J., Dluzen D. E., Horstink M. W. Gender differences in Parkinson's disease // *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* — 2007. — Aug. — T. 78, № 8. — C. 819-24.
81. Halliday G. M., Li Y. W., Blumbergs P. C., Joh T. H., Cotton R. G., Howe P. R., Blessing W. W., Geffen L. B. Neuropathology of immunohistochemically

- identified brainstem neurons in Parkinson's disease // *Ann Neurol.* — 1990. — Apr. — T. 27, № 4. — C. 373-85.
- 82.**Haque M. E., Mount M. P., Safarpour F., Abdel-Messih E., Callaghan S., Mazerolle C., Kitada T., Slack R. S., Wallace V., Shen J., Anisman H., Park D. S. Inactivation of Pink1 gene in vivo sensitizes dopamine-producing neurons to 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) and can be rescued by autosomal recessive Parkinson disease genes, Parkin or DJ-1 // *J Biol Chem.* — 2012. — Jun 29. — T. 287, № 27. — C. 23162-70.
- 83.**Hasegawa E., Takeshige K., Oishi T., Murai Y., Minakami S. 1-Methyl-4-phenylpyridinium (MPP+) induces NADH-dependent superoxide formation and enhances NADH-dependent lipid peroxidation in bovine heart submitochondrial particles // *Biochem Biophys Res Commun.* — 1990. — Aug 16. — T. 170, № 3. — C. 1049-55.
- 84.**Hawkes C. H., Del Tredici K., Braak H. Parkinson's disease: a dual-hit hypothesis // *Neuropathol Appl Neurobiol.* — 2007. — Dec. — T. 33, № 6. — C. 599-614.
- 85.**Hayes M. T. Parkinson's Disease and Parkinsonism // *Am J Med.* — 2019. — Jul. — T. 132, № 7. — C. 802-807.
- 86.**Hegarty S. V., O'Keeffe G. W., Sullivan A. M. Neurotrophic factors: from neurodevelopmental regulators to novel therapies for Parkinson's disease // *Neural Regen Res.* — 2014. — Oct 1. — T. 9, № 19. — C. 1708-11.
- 87.**Hong J., Sha S., Zhou L., Wang C., Yin J., Chen L. Sigma-1 receptor deficiency reduces MPTP-induced parkinsonism and death of dopaminergic neurons // *Cell Death Dis.* — 2015. — Jul 23. — T. 6. — C. e1832.
- 88.**Hou X., Watzlawik J. O., Fiesel F. C., Springer W. Autophagy in Parkinson's Disease // *J Mol Biol.* — 2020. — Apr 3. — T. 432, № 8. — C. 2651-2672.
- 89.**Hu X., Song Q., Li X., Li D., Zhang Q., Meng W., Zhao Q. Neuroprotective effects of Kukoamine A on neurotoxin-induced Parkinson's model through apoptosis inhibition and autophagy enhancement // *Neuropharmacology.* — 2017. — May 1. — T. 117. — C. 352-363.

90. Hughes A. J., Ben-Shlomo Y., Daniel S. E., Lees A. J. What features improve the accuracy of clinical diagnosis in Parkinson's disease: a clinicopathologic study // *Neurology*. — 1992. — Jun. — T. 42, № 6. — C. 1142-6.
91. Ibanez P., Bonnet A. M., Debarges B., Lohmann E., Tison F., Pollak P., Agid Y., Durr A., Brice A. Causal relation between alpha-synuclein gene duplication and familial Parkinson's disease // *Lancet*. — 2004. — Sep 25-Oct 1. — T. 364, № 9440. — C. 1169-71.
92. Ikeda K., Ikeda S., Yoshimura T., Kato H., Namba M. Idiopathic Parkinsonism with Lewy-type inclusions in cerebral cortex. A case report // *Acta Neuropathol*. — 1978. — Feb 20. — T. 41, № 2. — C. 165-8.
93. Jancovic J. Theories on the etiology and pathogenesis of Parkinson's disease // *Neurology*. — 1992. — C. P. 21 -23.
94. Jankovic J. H. H., Dashe J. Etiology and pathogenesis of Parkinson Disease // UpToDate from www.uptodate.com. — 2013.
95. Johannessen J. N., Sobotka T. J., Weise V. K., Markey S. P. Prolonged alterations in canine striatal dopamine metabolism following subtoxic doses of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) and 4'-amino-MPTP are linked to the persistence of pyridinium metabolites // *J Neurochem*. — 1991. — Sep. — T. 57, № 3. — C. 981-90.
96. Kahle P. J., Neumann M., Ozmen L., Muller V., Jacobsen H., Schindzielorz A., Okochi M., Leimer U., van Der Putten H., Probst A., Kremmer E., Kretzschmar H. A., Haass C. Subcellular localization of wild-type and Parkinson's disease-associated mutant alpha -synuclein in human and transgenic mouse brain // *J Neurosci*. — 2000. — Sep 1. — T. 20, № 17. — C. 6365-73.
97. Kalia L. V., Lang A. E. Parkinson disease in 2015: Evolving basic, pathological and clinical concepts in PD // *Nat Rev Neurol*. — 2016. — Feb. — T. 12, № 2. — C. 65-6.

98. Kandel E. R., Squire L. R. Neuroscience: breaking down scientific barriers to the study of brain and mind // *Science*. — 2000. — Nov 10. — T. 290, № 5494. — C. 1113-20.
99. Keener A. M., Bordelon Y. M. Parkinsonism // *Semin Neurol*. — 2016. — Aug. — T. 36, № 4. — C. 330-4.
100. Kin K., Yasuhara T., Kameda M., Date I. Animal Models for Parkinson's Disease Research: Trends in the 2000s // *Int J Mol Sci*. — 2019. — Oct 30. — T. 20, № 21.
101. Klivenyi P., Siwek D., Gardian G., Yang L., Starkov A., Cleren C., Ferrante R. J., Kowall N. W., Abeliovich A., Beal M. F. Mice lacking alpha-synuclein are resistant to mitochondrial toxins // *Neurobiol Dis*. — 2006. — Mar. — T. 21, № 3. — C. 541-8.
102. Komnig D., Dagli T. C., Habib P., Zeyen T., Schulz J. B., Falkenburger B. H. Fingolimod (FTY720) is not protective in the subacute MPTP mouse model of Parkinson's disease and does not lead to a sustainable increase of brain-derived neurotrophic factor // *J Neurochem*. — 2018. — Dec. — T. 147, № 5. — C. 678-691.
103. Kruger R., Kuhn W., Muller T., Woitalla D., Graeber M., Kosel S., Przuntek H., Eppelen J. T., Schols L., Riess O. Ala30Pro mutation in the gene encoding alpha-synuclein in Parkinson's disease // *Nat Genet*. — 1998. — Feb. — T. 18, № 2. — C. 106-8.
104. Langston J. W. MPTP: insights into the etiology of Parkinson's disease // *Eur Neurol*. — 1987. — T. 26 Suppl 1. — C. 2-10.
105. Langston J. W. The MPTP Story // *J Parkinsons Dis*. — 2017. — T. 7, № s1. — C. S11-S19.
106. Langston J. W., Ballard P., Tetrud J. W., Irwin I. Chronic Parkinsonism in humans due to a product of meperidine-analog synthesis // *Science*. — 1983. — Feb 25. — T. 219, № 4587. — C. 979-80.
107. Lee S., Oh S. T., Jeong H. J., Pak S. C., Park H. J., Kim J., Cho H. S., Jeon S. MPTP-induced vulnerability of dopamine neurons in A53T alpha-

- synuclein overexpressed mice with the potential involvement of DJ-1 downregulation // *Korean J Physiol Pharmacol.* — 2017. — Nov. — T. 21, № 6. — C. 625-632.
- 108.** Lindholm D., Makela J., Di Liberto V., Mudo G., Belluardo N., Eriksson O., Saarma M. Current disease modifying approaches to treat Parkinson's disease // *Cell Mol Life Sci.* — 2016. — Apr. — T. 73, № 7. — C. 1365-79.
- 109.** Liu Q., Guo X., Huang Z., He Q., Zhu D., Zhang S., Peng Z., Che Y., Feng X. Anti-neuroinflammatory effects of dimethylaminomylide (DMAMCL, i.e., ACT001) are associated with attenuating the NLRP3 in inflammasome in MPTP-induced Parkinson disease in mice // *Behav Brain Res.* — 2020. — Apr 6. — T. 383. — C. 112539.
- 110.** Longhena F., Faustini G., Missale C., Pizzi M., Spano P., Bellucci A. The Contribution of alpha-Synuclein Spreading to Parkinson's Disease Synaptopathy // *Neural Plast.* — 2017. — T. 2017. — C. 5012129.
- 111.** Louis E. D. The shaking palsy, the first forty-five years: a journey through the British literature // *Mov Disord.* — 1997. — Nov. — T. 12, № 6. — C. 1068-72.
- 112.** MacPhee G. S. D. Parkinson's Disease // *Reviews in Clinical Gerontology.* — 2001. — T. 11. — C. 33-49.
- 113.** Maiti P., Manna J., Dunbar G. L. Current understanding of the molecular mechanisms in Parkinson's disease: Targets for potential treatments // *Transl Neurodegener.* — 2017. — T. 6. — C. 28.
- 114.** Maroteaux L., Campanelli J. T., Scheller R. H. Synuclein: a neuron-specific protein localized to the nucleus and presynaptic nerve terminal // *J Neurosci.* — 1988. — Aug. — T. 8, № 8. — C. 2804-15.
- 115.** Marti 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. — Sep. — T. 83. — C. 37-45.

116. Mat Taib C. N., Mustapha M. MPTP-induced mouse model of Parkinson's disease: A promising direction of therapeutic strategies // *Bosn J Basic Med Sci.* — 2020. — Dec 14.
117. Mayer R. A., Kindt M. V., Heikkila R. E. Prevention of the nigrostriatal toxicity of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine by inhibitors of 3,4-dihydroxyphenylethylamine transport // *J Neurochem.* — 1986. — Oct. — T. 47, № 4. — C. 1073-9.
118. Mei M., Zhou Y., Liu M., Zhao F., Wang C., Ding J., Lu M., Hu G. Antioxidant and anti-inflammatory effects of dexrazoxane on dopaminergic neuron degeneration in rodent models of Parkinson's disease // *Neuropharmacology.* — 2019. — Dec 1. — T. 160. — C. 107758.
119. Meredith G. E., Rademacher D. J. MPTP mouse models of Parkinson's disease: an update // *J Parkinsons Dis.* — 2011. — T. 1, № 1. — C. 19-33.
120. Mingazov E. R., Khakimova G. R., Kozina E. A., Medvedev A. E., Buneeva O. A., Bazyan A. S., Ugrumov M. V. MPTP Mouse Model of Preclinical and Clinical Parkinson's Disease as an Instrument for Translational Medicine // *Mol Neurobiol.* — 2018. — Apr. — T. 55, № 4. — C. 2991-3006.
121. Mizuno Y., Sone N., Suzuki K., Saitoh T. Studies on the toxicity of 1-methyl-4-phenylpyridinium ion (MPP⁺) against mitochondria of mouse brain // *J Neurol Sci.* — 1988. — Aug. — T. 86, № 1. — C. 97-110.
122. Nataraj J., Manivasagam T., Thenmozhi A. J., Essa M. M. Lutein protects dopaminergic neurons against MPTP-induced apoptotic death and motor dysfunction by ameliorating mitochondrial disruption and oxidative stress // *Nutr Neurosci.* — 2016. — Jul. — T. 19, № 6. — C. 237-46.
123. Ninkina N., Connor-Robson N., Ustyugov A. A., Tarasova T. V., Shelkovnikova T. A., Buchman V. L. A novel resource for studying function and dysfunction of alpha-synuclein: mouse lines for modulation of endogenous Snca gene expression // *Sci Rep.* — 2015. — Nov 13. — T. 5. — C. 16615.

- 124.** Ninkina N., Papachroni K., Robertson D. C., Schmidt O., Delaney L., O'Neill F., Court F., Rosenthal A., Fleetwood-Walker S. M., Davies A. M., Buchman V. L. Neurons expressing the highest levels of gamma-synuclein are unaffected by targeted inactivation of the gene // *Mol Cell Biol.* — 2003. — Nov. — T. 23, № 22. — C. 8233-45.
- 125.** Ninkina N., Tarasova T. V., Chaprov K. D., Roman A. Y., Kukharsky M. S., Kolik L. G., Ovchinnikov R., Ustyugov A. A., Durnev A. D., Buchman V. L. Alterations in the nigrostriatal system following conditional inactivation of alpha-synuclein in neurons of adult and aging mice // *Neurobiol Aging.* — 2020. — Jul. — T. 91. — C. 76-87.
- 126.** Ninkina N. M. S. J., Peters O.M., Connor-Robson N., Chaprov K., Montoya A., Kramer H., Withers D.J., Buchman V. . β -synuclein promotes synaptic vesicle dopamine uptake and rescues dopaminergic neurons from MPTP-induced death. // PREPRINT (Version 1). — 2021. — Дата обращения: 07.05.2021.
- 127.** Obeso J. A., Stamelou M., Goetz C. G., Poewe W., Lang A. E., Weintraub D., Burn D., Halliday G. M., Bezard E., Przedborski S., Lehericy S., Brooks D. J., Rothwell J. C., Hallett M., DeLong M. R., Marras C., Tanner C. M., Ross G. W., Langston J. W., Klein C., Bonifati V., Jankovic J., Lozano A. M., Deuschl G., Bergman H., Tolosa E., Rodriguez-Violante M., Fahn S., Postuma R. B., Berg D., Marek K., Standaert D. G., Surmeier D. J., Olanow C. W., Kordower J. H., Calabresi P., Schapira A. H. V., Stoessl A. J. Past, present, and future of Parkinson's disease: A special essay on the 200th Anniversary of the Shaking Palsy // *Mov Disord.* — 2017. — Sep. — T. 32, № 9. — C. 1264-1310.
- 128.** Ohta S. [Tetrahydroisoquinolines in connection with Parkinson's disease]. *Rinsho Shinkeigaku // Clinical neurology.* — 1989. — T. 29, № 12. — C. 1504–1506.

129. Pan Y., Nicolazzo J. A. Impact of aging, Alzheimer's disease and Parkinson's disease on the blood-brain barrier transport of therapeutics // *Adv Drug Deliv Rev.* — 2018. — Oct. — T. 135. — C. 62-74.
130. Parkinson J. *An essay on the shaking palsy.* London: Whittingham and Rowland Sherwood, Neely and Jones //. — 1817.
131. Pasanen P., Myllykangas L., Siitonen M., Raunio A., Kaakkola S., Lyytinen J., Tienari P. J., Poyhonen M., Paetau A. Novel alpha-synuclein mutation A53E associated with atypical multiple system atrophy and Parkinson's disease-type pathology // *Neurobiol Aging.* — 2014. — Sep. — T. 35, № 9. — C. 2180 e1-5.
132. Pfeiffer R. F. Non-motor symptoms in Parkinson's disease // *Parkinsonism Relat Disord.* — 2016. — Jan. — T. 22 Suppl 1. — C. S119-22.
133. Phillips J. E., Corces V. G. CTCF: master weaver of the genome // *Cell.* — 2009. — Jun 26. — T. 137, № 7. — C. 1194-211.
134. Polymeropoulos M. H., Lavedan C., Leroy E., Ide S. E., Dehejia A., Dutra A., Pike B., Root H., Rubenstein J., Boyer R., Stenroos E. S., Chandrasekharappa S., Athanassiadou A., Papapetropoulos T., Johnson W. G., Lazzarini A. M., Duvoisin R. C., Di Iorio G., Golbe L. I., Nussbaum R. L. Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease // *Science.* — 1997. — Jun 27. — T. 276, № 5321. — C. 2045-7.
135. Postuma R. B., Gagnon J. F., Montplaisir J. Clinical prediction of Parkinson's disease: planning for the age of neuroprotection // *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* — 2010. — Sep. — T. 81, № 9. — C. 1008-13.
136. Prasad E. M., Hung S. Y. Behavioral Tests in Neurotoxin-Induced Animal Models of Parkinson's Disease // *Antioxidants (Basel).* — 2020. — Oct 16. — T. 9, № 10.
137. Przedborski S., Chen Q., Vila M., Giasson B. I., Djaldatti R., Vukosavic S., Souza J. M., Jackson-Lewis V., Lee V. M., Ischiropoulos H. Oxidative post-translational modifications of alpha-synuclein in the 1-methyl-4-phenyl-

- 1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) mouse model of Parkinson's disease // *J Neurochem.* — 2001. — Jan. — T. 76, № 2. — C. 637-40.
- 138.** Przedborski S., Jackson-Lewis V., Yokoyama R., Shibata T., Dawson V. L., Dawson T. M. Role of neuronal nitric oxide in 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)-induced dopaminergic neurotoxicity // *Proc Natl Acad Sci U S A.* — 1996. — May 14. — T. 93, № 10. — C. 4565-71.
- 139.** Rai S. N., Zahra W., Singh S. S., Birla H., Keswani C., Dilnashin H., Rathore A. S., Singh R., Singh R. K., Singh S. P. Anti-inflammatory Activity of Ursolic Acid in MPTP-Induced Parkinsonian Mouse Model // *Neurotox Res.* — 2019. — Oct. — T. 36, № 3. — C. 452-462.
- 140.** Rao S. P., Sharma N., Kalivendi S. V. Embelin averts MPTP-induced dysfunction in mitochondrial bioenergetics and biogenesis via activation of SIRT1 // *Biochim Biophys Acta Bioenerg.* — 2020. — Mar 1. — T. 1861, № 3. — C. 148157.
- 141.** Reich S. G., Savitt J. M. Parkinson's Disease // *Med Clin North Am.* — 2019. — Mar. — T. 103, № 2. — C. 337-350.
- 142.** Robertson D. C., Schmidt O., Ninkina N., Jones P. A., Sharkey J., Buchman V. L. Developmental loss and resistance to MPTP toxicity of dopaminergic neurones in substantia nigra pars compacta of gamma-synuclein, alpha-synuclein and double alpha/gamma-synuclein null mutant mice // *J Neurochem.* — 2004. — Jun. — T. 89, № 5. — C. 1126-36.
- 143.** Roman A. Y., Limorenko G., Ustyugov A. A., Tarasova T. V., Lysikova E. A., Buchman V. L., Ninkina N. Generation of mouse lines with conditionally or constitutively inactivated Snca gene and Rosa26-stop-lacZ reporter located in cis on the mouse chromosome 6 // *Transgenic Res.* — 2017. — Apr. — T. 26, № 2. — C. 301-307.
- 144.** Rossetti Z. L., Sotgiu A., Sharp D. E., Hadjiconstantinou M., Neff N. H. 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) and free radicals in

- vitro // *Biochem Pharmacol.* — 1988. — Dec 1. — T. 37, № 23. — C. 4573-4.
145. Sabino V., Cottone P., Parylak S. L., Steardo L., Zorrilla E. P. Sigma-1 receptor knockout mice display a depressive-like phenotype // *Behav Brain Res.* — 2009. — Mar 17. — T. 198, № 2. — C. 472-6.
 146. Sablin S. O., Krueger M. J., Bachurin S. O., Solyakov L. S., Efange S. M., Singer T. P. Oxidation products arising from the action of monoamine oxidase B on 1-methyl-4-benzyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine, a nonneurotoxic analogue of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine // *J Neurochem.* — 1994. — May. — T. 62, № 5. — C. 2012-6.
 147. Schapira A. H., Jenner P. Etiology and pathogenesis of Parkinson's disease // *Mov Disord.* — 2011. — May. — T. 26, № 6. — C. 1049-55.
 148. Schluter O. M., Fornai F., Alessandri M. G., Takamori S., Geppert M., Jahn R., Sudhof T. C. Role of alpha-synuclein in 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced parkinsonism in mice // *Neuroscience.* — 2003. — T. 118, № 4. — C. 985-1002.
 149. Schneider J.S. A. D. W., Decamp E. . 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced mammalian models of parkinson's disease: potential uses and misuses of acute, sub-acute, and chronic models // *Parkinson's Disease*, Academic Press. — 2008. — C. 87-103.
 150. Schulz J. B., Matthews R. T., Muqit M. M., Browne S. E., Beal M. F. Inhibition of neuronal nitric oxide synthase by 7-nitroindazole protects against MPTP-induced neurotoxicity in mice // *J Neurochem.* — 1995. — Feb. — T. 64, № 2. — C. 936-9.
 151. Shao Q. H., Chen Y., Li F. F., Wang S., Zhang X. L., Yuan Y. H., Chen N. H. TLR4 deficiency has a protective effect in the MPTP/probenecid mouse model of Parkinson's disease // *Acta Pharmacol Sin.* — 2019. — Dec. — T. 40, № 12. — C. 1503-1512.
 152. Singh S. S., Rai S. N., Birla H., Zahra W., Rathore A. S., Singh S. P. NF-kappaB-Mediated Neuroinflammation in Parkinson's Disease and

- Potential Therapeutic Effect of Polyphenols // *Neurotox Res.* — 2020. — Mar. — T. 37, № 3. — C. 491-507.
- 153.** Sokolowski A. L., Larsson B. S., Lindquist N. G. Distribution of 1-(3H)-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (3H-MPTP) in the frog: uptake in neuromelanin // *Pharmacol Toxicol.* — 1990. — Apr. — T. 66, № 4. — C. 252-8.
- 154.** Spillantini M. G., Crowther R. A., Jakes R., Hasegawa M., Goedert M. alpha-Synuclein in filamentous inclusions of Lewy bodies from Parkinson's disease and dementia with lewy bodies // *Proc Natl Acad Sci U S A.* — 1998. — May 26. — T. 95, № 11. — C. 6469-73.
- 155.** Spillantini M. G., Schmidt M. L., Lee V. M., Trojanowski J. Q., Jakes R., Goedert M. Alpha-synuclein in Lewy bodies // *Nature.* — 1997. — Aug 28. — T. 388, № 6645. — C. 839-40.
- 156.** Sulzer D., Edwards R. H. The physiological role of alpha-synuclein and its relationship to Parkinson's Disease // *J Neurochem.* — 2019. — Sep. — T. 150, № 5. — C. 475-486.
- 157.** Sung E. J., Yoo S. S., Yoon H. W., Oh S. S., Han Y., Park H. W. Brain activation related to affective dimension during thermal stimulation in humans: a functional magnetic resonance imaging study // *Int J Neurosci.* — 2007. — Jul. — T. 117, № 7. — C. 1011-27.
- 158.** Szego E. M., Gerhardt E., Kermer P., Schulz J. B. A30P alpha-synuclein impairs dopaminergic fiber regeneration and interacts with L-DOPA replacement in MPTP-treated mice // *Neurobiol Dis.* — 2012. — Jan. — T. 45, № 1. — C. 591-600.
- 159.** Szego E. M., Outeiro T. F., Kermer P., Schulz J. B. Impairment of the septal cholinergic neurons in MPTP-treated A30P alpha-synuclein mice // *Neurobiol Aging.* — 2013. — Feb. — T. 34, № 2. — C. 589-601.
- 160.** Takahashi-Niki K., Inafune A., Michitani N., Hatakeyama Y., Suzuki K., Sasaki M., Kitamura Y., Niki T., Iguchi-Ariga S. M., Ariga H. DJ-1-dependent protective activity of DJ-1-binding compound no. 23 against

- neuronal cell death in MPTP-treated mouse model of Parkinson's disease // *J Pharmacol Sci.* — 2015. — Mar. — T. 127, № 3. — C. 305-10.
- 161.** Tanner C. M., Kamel F., Ross G. W., Hoppin J. A., Goldman S. M., Korell M., Marras C., Bhudhikanok G. S., Kasten M., Chade A. R., Comyns K., Richards M. B., Meng C., Priestley B., Fernandez H. H., Cambi F., Umbach D. M., Blair A., Sandler D. P., Langston J. W. Rotenone, paraquat, and Parkinson's disease // *Environ Health Perspect.* — 2011. — Jun. — T. 119, № 6. — C. 866-72.
- 162.** Tarasova T. V., Lytkina O. A., Goloborshcheva V. V., Skuratovskaya L. N., Antohin A. I., Ovchinnikov R. K., Kukharsky M. S. Genetic inactivation of alpha-synuclein affects embryonic development of dopaminergic neurons of the substantia nigra, but not the ventral tegmental area, in mouse brain // *PeerJ.* — 2018. — T. 6. — C. e4779.
- 163.** Togashi K., Hasegawa M., Nagai J., Kotaka K., Yazawa A., Takahashi M., Masukawa D., Goshima Y., Hensley K., Ohshima T. Lanthionine ketimine ester improves outcome in an MPTP-induced mouse model of Parkinson's disease via suppressions of CRMP2 phosphorylation and microglial activation // *J Neurol Sci.* — 2020. — Jun 15. — T. 413. — C. 116802.
- 164.** Tompkins M. M., Hill W. D. Contribution of somal Lewy bodies to neuronal death // *Brain Res.* — 1997. — Nov 14. — T. 775, № 1-2. — C. 24-9.
- 165.** Touchman J. W., Dehejia A., Chiba-Falek O., Cabin D. E., Schwartz J. R., Orrison B. M., Polymeropoulos M. H., Nussbaum R. L. Human and mouse alpha-synuclein genes: comparative genomic sequence analysis and identification of a novel gene regulatory element // *Genome Res.* — 2001. — Jan. — T. 11, № 1. — C. 78-86.
- 166.** Tysnes O. B., Storstein A. Epidemiology of Parkinson's disease // *J Neural Transm (Vienna).* — 2017. — Aug. — T. 124, № 8. — C. 901-905.

167. Ugrumov M. Development of early diagnosis of Parkinson's disease: Illusion or reality? // *CNS Neurosci Ther.* — 2020. — Jun 29.
168. 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. — May 5. — T. 181. — C. 175-88.
169. Van Den Eeden S. K., Tanner C. M., Bernstein A. L., Fross R. D., Leimpeter A., Bloch D. A., Nelson L. M. Incidence of Parkinson's disease: variation by age, gender, and race/ethnicity // *Am J Epidemiol.* — 2003. — Jun 1. — T. 157, № 11. — C. 1015-22.
170. van Wamelen D. J., Martinez-Martin P., Weintraub D., Schrag A., Antonini A., Falup-Pecurariu C., Odin P., Ray Chaudhuri K., International P., Movement Disorder Society Parkinson's Disease Non-Motor Study G. The Non-Motor Symptoms Scale in Parkinson's disease: Validation and use // *Acta Neurol Scand.* — 2021. — Jan. — T. 143, № 1. — C. 3-12.
171. Vidyadhara D. J., Yarreiphang H., Abhilash P. L., Raju T. R., Alladi P. A. Differential expression of calbindin in nigral dopaminergic neurons in two mice strains with differential susceptibility to 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine // *J Chem Neuroanat.* — 2016. — Oct. — T. 76, № Pt B. — C. 82-89.
172. Vivacqua G., Biagioni F., Busceti C. L., Ferrucci M., Madonna M., Ryskalin L., Yu S., D'Este L., Fornai F. Motor Neurons Pathology After Chronic Exposure to MPTP in Mice // *Neurotox Res.* — 2020. — Feb. — T. 37, № 2. — C. 298-313.
173. Vyas I., Heikkila R. E., Nicklas W. J. Studies on the neurotoxicity of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine: inhibition of NAD-linked substrate oxidation by its metabolite, 1-methyl-4-phenylpyridinium // *J Neurochem.* — 1986. — May. — T. 46, № 5. — C. 1501-7.

174. Wakabayashi K., Toyoshima Y., Awamori K., Anezaki T., Yoshimoto M., Tsuji S., Takahashi H. Restricted occurrence of Lewy bodies in the dorsal vagal nucleus in a patient with late-onset parkinsonism // *J Neurol Sci.* — 1999. — Jun 1. — T. 165, № 2. — C. 188-91.
175. Wallace B. A., Ashkan K., Heise C. E., Foote K. D., Torres N., Mitrofanis J., Benabid A. L. Survival of midbrain dopaminergic cells after lesion or deep brain stimulation of the subthalamic nucleus in MPTP-treated monkeys // *Brain.* — 2007. — Aug. — T. 130, № Pt 8. — C. 2129-45.
176. Wu K. C., Lu Y. H., Peng Y. H., Tsai T. F., Kao Y. H., Yang H. T., Lin C. J. Decreased expression of organic cation transporters, Oct1 and Oct2, in brain microvessels and its implication to MPTP-induced dopaminergic toxicity in aged mice // *J Cereb Blood Flow Metab.* — 2015. — Jan. — T. 35, № 1. — C. 37-47.
177. Wu W. J., Lu C. W., Wang S. E., Lin C. L., Su L. Y., Wu C. H. MPTP toxicity causes vocal, auditory, orientation and movement defects in the echolocation bat // *Neuroreport.* — 2021. — Jan 13. — T. 32, № 2. — C. 125-134.
178. Xu Q., Langley M., Kanthasamy A. G., Reddy M. B. Epigallocatechin Gallate Has a Neurorescue Effect in a Mouse Model of Parkinson Disease // *J Nutr.* — 2017. — Oct. — T. 147, № 10. — C. 1926-1931.
179. Yadav S. K., Rai S. N., Singh S. P. Mucuna pruriens reduces inducible nitric oxide synthase expression in Parkinsonian mice model // *J Chem Neuroanat.* — 2017. — Mar. — T. 80. — C. 1-10.
180. Yang W., Hao W., Meng Z., Ding S., Li X., Zhang T., Huang W., Xu L., Zhang Y., Yang J., Gu X. Molecular Regulatory Mechanism and Toxicology of Neurodegenerative Processes in MPTP/Probenecid-Induced Progressive Parkinson's Disease Mice Model Revealed by Transcriptome // *Mol Neurobiol.* — 2021. — Feb. — T. 58, № 2. — C. 603-616.

- 181.** Yun J. W., Ahn J. B., Kang B. C. Modeling Parkinson's disease in the common marmoset (*Callithrix jacchus*): overview of models, methods, and animal care // *Lab Anim Res.* — 2015. — Dec. — T. 31, № 4. — C. 155-65.
- 182.** Yun S. P., Kim D., Kim S., Kim S., Karuppagounder S. S., Kwon S. H., Lee S., Kam T. I., Lee S., Ham S., Park J. H., Dawson V. L., Dawson T. M., Lee Y., Ko H. S. alpha-Synuclein accumulation and GBA deficiency due to L444P GBA mutation contributes to MPTP-induced parkinsonism // *Mol Neurodegener.* — 2018. — Jan 8. — T. 13, № 1. — C. 1.
- 183.** Zarranz J. J., Alegre J., Gomez-Esteban J. C., Lezcano E., Ros R., Ampuero I., Vidal L., Hoenicka J., Rodriguez O., Atares B., Llorens V., Gomez Tortosa E., del Ser T., Munoz D. G., de Yebenes J. G. The new mutation, E46K, of alpha-synuclein causes Parkinson and Lewy body dementia // *Ann Neurol.* — 2004. — Feb. — T. 55, № 2. — C. 164-73.
- 184.** Zheng M., Liu C., Fan Y., Yan P., Shi D., Zhang Y. Neuroprotection by Paeoniflorin in the MPTP mouse model of Parkinson's disease // *Neuropharmacology.* — 2017. — Apr. — T. 116. — C. 412-420.
- 185.** Ziering A., Lee J. Piperidine derivatives; 1,3-dialkyl-4-aryl-4-acyloxypiperidines // *J Org Chem.* — 1947. — Nov. — T. 12, № 6. — C. 911-914.