

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
ИНСТИТУТ БИОЛОГИИ РАЗВИТИЯ ИМ. Н.К. КОЛЬЦОВА РАН (ИБР РАН)

ИНДЕКС УДК 577.25

Per. № ГЗ 0088-2021-0018

Per. № НИОКТР АААА-А21-121011490125-7



ОТЧЕТ
О НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЙ РАБОТЕ
ИЗУЧЕНИЕ КЛЕТОЧНЫХ И МОЛЕКУЛЯРНЫХ МЕХАНИЗМОВ
НЕЙРОДЕГЕНЕРАЦИИ И НЕЙРОПЛАСТИЧНОСТИ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ
МОДЕЛИРОВАНИИ БОЛЕЗНИ ПАРКИНСОНА
(промежуточный)

Руководитель темы
заведующий лабораторией
академик РАН

подпись, дата М.В. Угрюмов

28.12.2021 г.

Москва, 2021

СПИСОК ИСПОЛНИТЕЛЕЙ

Руководитель, заведующий лабораторией, академик РАН, доктор биологических наук


28.12.2021
подпись, дата

М.В. Угрюмов (Введение, заключение)

Исполнители:

Старший научный сотрудник, кандидат биологических наук


28.12.2021
подпись, дата

Т.С. Пронина (раздел 1)

Научный сотрудник, кандидат биологических наук


28.12.21
подпись, дата

Ю.О. Никишина (раздел 1)

Научный сотрудник, кандидат биологических наук


28.12.21
подпись, дата

С.В. Беляков (раздел 1)

Научный сотрудник, кандидат биологических наук


28.12.2021
подпись, дата

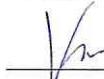
А. Р. Муртазина (раздел 1)

Научный сотрудник, кандидат биологических наук


28.12.21
подпись, дата

А.А. Колачева (раздел 1)

Старший научный сотрудник, кандидат биологических наук


28.12.2021
подпись, дата

А.Р. Ким (раздел 1)

Младший научный сотрудник, кандидат биологических наук


28.12.2021
подпись, дата

В.В. Сафандеев (раздел 1)

Младший научный сотрудник


29.12.2021
подпись, дата

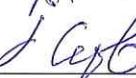
В.В. Богданов (раздел 1)

Инженер-исследователь


28.12.2021
подпись, дата

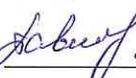
В.Е. Блохин (раздел 1)

Инженер-исследователь


28.12.2021
подпись, дата

С.А. Сурков (раздел 1)

Инженер-исследователь


28.12.21
подпись, дата

Е.Н. Павлова (раздел 1)

Инженер-исследователь


28.12.2021
подпись, дата

А.Е. Банникова (раздел 1)

Инженер-исследователь


28.12.21
подпись, дата

Л. Алекперова (раздел 1)

Нормоконтроль, руководитель информационно-аналитического отдела, кандидат биологических наук


28.12.21
подпись, дата

Е.Б. Абрамова

РЕФЕРАТ

Отчет 34 с., 13 рисунков, 51 источник, отчетных публикаций 9.

НЕЙРОДЕГЕНЕРАЦИЯ, НЕЙРОПЛАСТИЧНОСТЬ, ДОФАМИН, НЕЙРОН, МОДЕЛИРОВАНИЕ БОЛЕЗНИ ПАРКИНСОНА, ДОКЛИНИЧЕСКАЯ СТАДИЯ.

Цель работы: анализ молекулярных механизмов нейродегенерации и нейропластичности в nigrostriatной системе мозга при нейротоксическом моделировании различных стадий болезни Паркинсона.

Задачи: на ранее разработанной модели доклинической стадии болезни Паркинсона у мышей провести широкомасштабный анализ экспрессии более, чем 100 генов, вовлеченных в различные механизмы гибели дофаминергических нейронов (маркеры воспаления, мисфолдинга белков, оксидативного стресса, апоптоза, некроза и т.п.) и нейропластичности nigrostriatной системы (маркеры дофаминергического профиля нейронов, внутриклеточный и везикулярный транспорт, нейротрофические факторы и т.п.).

Объектами исследования были самцы мышей линии C57BL/6 в возрасте 2–2,5 месяца.

Полученные результаты: 1) воспроизведена доклиническая стадия болезни Паркинсона на мышах; 2) проведена оценка экспрессии порядка 100 генов, вовлеченные в различные клеточно-молекулярные процессы в черной субстанции при моделировании доклинической стадии болезни Паркинсона на мышах; 3) показано компенсаторное увеличение экспрессии гена тау-белка, участвующего в стабилизации микротрубочек, и синтаксина, ключевого белка выброса дофамина из синаптических пузырьков; 4) обнаружено, что спустя 2 недели после введения МФТП не происходит полного восстановления редокс статуса клеток; 5) показаны первые изменения в убиквитин-протеасомной системе деградации белков; 6) в сохранившихся дофаминергических нейронах и клетках, их окружающих, не происходит активации клеточной гибели, однако, экспрессия рецепторов к нейротрофическим факторам снижена.

Полученные результаты вносят существенный вклад в фундаментальные представления о процессах нейродегенерации и нейропластичности на доклинической стадии болезни Паркинсона, что в дальнейшем позволит найти новые мишени для поддержания nigrostriatной системы и замедления гибели дофаминергических нейронов.

СОДЕРЖАНИЕ

СОКРАЩЕНИЯ И ОБОЗНАЧЕНИЯ.....	5
ВВЕДЕНИЕ.....	6
ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ.....	7
ИЗУЧЕНИЕ КЛЕТОЧНЫХ И МОЛЕКУЛЯРНЫХ МЕХАНИЗМОВ НЕЙРОДЕГЕНЕРАЦИИ И НЕЙРОПЛАСТИЧНОСТИ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ МОДЕЛИРОВАНИИ БОЛЕЗНИ ПАРКИНСОНА.....	7
1 Цели и задачи.....	7
2 Материалы и методы	7
3 Результаты и обсуждение.....	10
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	27
СПИСОК ЦИТИРОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ.....	28
ОТЧЕТНЫЕ ПУБЛИКАЦИИ.....	33

СОКРАЩЕНИЯ И ОБОЗНАЧЕНИЯ

В настоящем отчете о НИР применяют следующие сокращения и обозначения:

ВЭЖХ-ЭД – высокоэффективная жидкостная хроматография с электрохимической детекцией;

ЭДТА – этилендиаминтетрауксусной кислоты;

ДГБА – 3,4 гидробромида дигидроксибензиламин;

L-ДОФА – L-диоксифенилаланин;

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

ЧС – черная субстанция;

ДА – дофамин;

ДА-ергический нейрон – дофаминергический нейрон.

ВВЕДЕНИЕ

Болезнь Паркинсона (БП) – нейродегенеративное заболевание, характеризующееся гибелью дофаминергических нейронов nigrostriatной системы. Важной особенностью БП является длительное бессимптомное течение на протяжении многих лет, что обусловлено включением компенсаторных процессов по мере деградации nigrostriatной системы [1]. Молекулярные механизмы, запускающие нейродегенерацию дофаминергических нейронов, до сих пор не выяснены, более того по мере прогрессирования заболевания они могут изменяться, так же, как и компенсаторные процессы. Для изучения этих молекулярных механизмов актуально использование моделей *in vivo*, воспроизводящие доклиническую и клиническую стадии болезни Паркинсона. Дальнейшее сопоставление полученных результатов на двух моделях позволит выявить: возможные причины нейродегенерации и новые мишени для ее замедления и/или активации компенсаторных механизмов мозга, что в итоге должно либо замедлить, либо препятствовать развитию заболевания.

ОСНОВАЯ ЧАСТЬ

ИЗУЧЕНИЕ КЛЕТОЧНЫХ И МОЛЕКУЛЯРНЫХ МЕХАНИЗМОВ НЕЙРОДЕГЕНЕРАЦИИ И НЕЙРОПЛАСТИЧНОСТИ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ МОДЕЛИРОВАНИИ БОЛЕЗНИ ПАРКИНСОНА

1 Цели и задачи

Целью исследования является анализ молекулярных механизмов нейродегенерации и нейропластичности в nigrostriатной системе мозга при нейротоксическом моделировании доклинической стадии болезни Паркинсона.

Задачи:

- На разработанной нейротоксической модели доклинической стадии болезни Паркинсона у мышей с помощью высокопроизводительного ПЦР в реальном времени (технология OpenArray компании Thermo Fisher Scientific) провести широкомасштабный анализ экспрессии генов в nigrostriатной системе.

- Оценить роль гидрокситриптофана в пролиферации и клеточной гибели.

2 Материалы и методы

2.1 Животные

Работа была выполнена на самцах мышей линии C57Bl/6 в возрасте 2-2,5 месяца весом 22-25 г. Животных содержали при 21-23 °С при светло-темном 12-часовом цикле со свободным доступом к пище и воде.

2.2 Моделирование доклинической стадии болезни Паркинсона

Для моделирования доклинической стадии болезни Паркинсона мышам (n = 8) двукратно подкожно вводили 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридин (МФТП, Sigma Aldrich, St.Louis, MO, США) в разовой дозе 6 мг/кг с интервалом 2 часа. Контрольная группа (n = 8) получала физиологический раствор по аналогичной схеме.

Спустя 2 недели мышей усыпляли с помощью изофлурана, декапитировали и разрезали головной мозг по средней сагиттальной плоскости на две половины из которых выделяли стриатум и черную субстанцию на хладоэлементе согласно атласу [2] (рисунок 1 и 2), взвешивали и замораживали в жидком азоте до последующего анализа. Также собрали плазму крови, лимфоциты и слезы мышей для определения уровня катехоламинов.

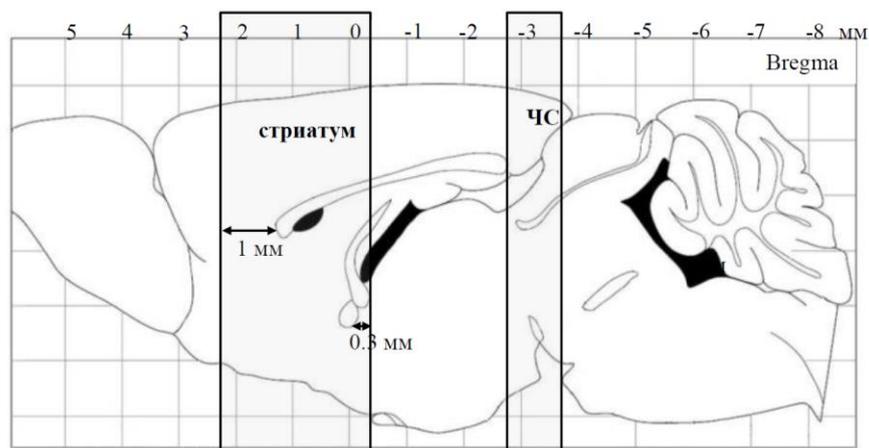


Рисунок 1 – Схематичное изображение выделения фронтальных срезов, содержащих стриатум и черную субстанцию из половины мозга, разрезанного в средне сагиттальной плоскости

ЧС – черная субстанция.

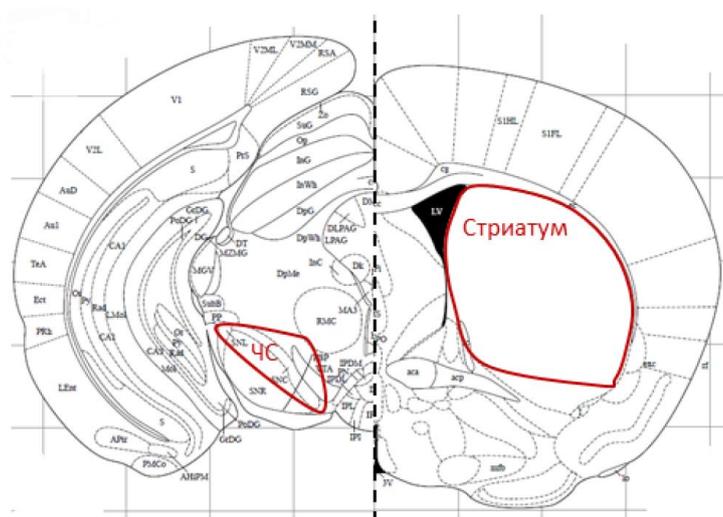


Рисунок 2 – Схема выделения черной субстанции (А) и дорсального стриатума (Б) из фронтальных слайсов мозга
ЧС – компактная часть черной субстанции.

Стриатум и черную субстанцию с правой стороны мозга использовали для последующего анализа содержания катехоламинов с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии с электрохимической детекцией (ВЭЖХ с ЭД). Черную субстанцию левой стороны использовали для постановки высокопроизводительного ПЦР в реальном времени (технология OpenArray компании Thermo Fisher Scientific, США).

2.3 Высокоэффективная жидкостная хроматография с электрохимической детекцией

Выделенные кусочки мозга (стриатум и черная субстанция) гомогенизировали в соответственно 400 и 150 мкл 0,1 н HClO₄, содержащей в качестве внутреннего стандарта 250 пмоль/мл 3,4 гидробромида дигидроксибензиламина (ДГБА), при помощи ультразвукового гомогенизатора (Labsonic M, Sartorius) и центрифугировали при 16500g в течение 20 минут. Супернатант отбирали и хранили при -70°C до определения катехоламинов и их метаболитов методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с электрохимической детекцией (ВЭЖХ-ЭД).

Измерение содержания катехоламинов в кусочках мозга осуществляли с помощью ВЭЖХ-ЭД на хроматографе LC-20ADsp (Shimadzu, Japan). Электрохимический детектор DECADE II (Antec, Нидерланды) был оборудован стеклянной углеродной проточной кюветой и солевым мостиком Ag/AgCl, электрод сравнения с потенциалом, установленным на + 0,85 В. Разделение веществ проводилось на обратно-фазной колонке ReproSil-Pur, ODS-3, 4x100 мм с диаметром пор 3 мкм (Dr.Majsch GMBH, Германия) при температуре +30°C и скорости подвижной фазы 1 мл/мин. В качестве подвижной фазы использовался 0,1 М цитратно-фосфатный буфер, состоящий из 0,3 мМ октансульфоната натрия, 0,1 мМ ЭДТА и 8% ацетонитрила (все реактивы – Sigma, США), (pH = 2,52). Пики катехоламинов определяли по времени их выхода в стандартном растворе. Содержание рассчитывали методом внутреннего стандарта с помощью программного обеспечения LabSolutions (Shimadzu, Япония), используя отношение площадей пиков в стандартной смеси и образце:

$$C_{КАпр} = \frac{S_{КАпр}}{S_{ДГБАпр}} \times \frac{S_{ДГБАст}}{S_{КАст}} \times C_{ДГБАпр}$$

$C_{КАпр}$ – концентрация катехоламинов в пробе, $S_{КАпр}$ – площадь пика катехоламинов в пробе, $S_{ДГБАпр}$ – площадь пика ДГБА в пробе, $S_{ДГБАст}$ – площадь пика ДГБА в стандарте, $S_{КАст}$ – площадь пика катехоламинов в стандарте, $C_{ДГБАпр}$ – концентрация ДГБА в пробе.

2.4 Высокопроизводительная полимеразная цепная реакция в реальном времени (технология OpenAmply компании Thermo Fisher Scientific)

РНК экстрагировали из черной субстанции в 1 мл TRI-Reagent (Sigma, США) в соответствии с инструкциями производителя. Для преципитации РНК использовали 1 мкг гликогена (Thermo Fisher Scientific, США) на образец. Концентрация РНК была определена с использованием Nanodrop 8000 (Thermo Scientific, США). Для синтеза кДНК использовали только образцы с коэффициентами поглощения РНК A₂₆₀ / 280 в диапазоне

от 1,9 до 2,1. Тотальную РНК обрабатывали ДНКазой I, свободной от РНКазы (Thermo Fisher Scientific, США), для удаления остаточной геномной ДНК.

В обратную транскрипцию для синтеза кДНК из проб черной субстанции брали 0,5 мкг РНК. Для ее проведения использовали набор RevertAid H Minus First Stand cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific, США) со случайным гексамерными праймерами в соответствии с инструкциями производителя (Thermo Fisher Scientific). Реакция продолжалась 60 мин при 42° С и останавливалась нагреванием в течение 10 мин при 70° с последующим охлаждением образцов на льду.

Для проведения количественного ПЦР-анализа с применением технологии Open Array (Thermo Fisher Scientific, США) использовали чипы от того же производителя, содержащие 112 генов для 24 проб. Для проведения ПЦР брали 250 нг/мкл кДНК на 56 реакций. Обработка результатов производили в программе QuantStudio 12K Flex (Applied Biosystems) и Excel (Microsoft Office, США), уровни экспрессии генов выражены как значения $2^{-\Delta\Delta Ct}$, нормированные к уровню цитохрома C1 (CYC1). Формула для расчета $\Delta\Delta Ct$.

$$\Delta\Delta Ct = (\Delta Ct(\text{образца}) - \Delta Ct(\text{среднего контроля}))$$

2.5 Статистическая обработка результатов

Статистическую обработку результатов проводили с использованием программы GraphPad Prism 6. Данные представлены как среднее значение \pm стандартная ошибка средней. Достоверность различий признавалась при $p < 0,05$, при $0,05 < p < 0,1$ расценивалось как тенденция к изменению, при $p > 0,1$ различия считали недостоверными. Для определения статистической значимости полученных результатов по содержанию катехоламинов был использован тест Стьюдента, по изменению экспрессии генов - непараметрический критерий Манна–Уитни.

3 Результаты и обсуждение

Одной из глобальных проблем XXI века является борьба с социально значимыми фатальными нейродегенеративными заболеваниями, в основном, с болезнью Альцгеймера, болезнью Паркинсона (БП). Только от БП в мире страдают более 10 миллионов людей и более 200 тысяч в России, причем по прогнозам их число в ближайшие 20 лет увеличится в 2-3 раза [3, 4]. Для таких стран, как Россия, высокая смертность больных усугубляет и так остро стоящую демографическую проблему. Быстрый рост заболеваемости объясняется увеличением продолжительности жизни и загрязнением окружающей среды. Тяжелым бременем является финансирование лечения

и реабилитации больных при БП - десятки миллиардов долларов в год в развитых зарубежных странах и десятки миллиардов рублей в России [5, 6].

Несмотря на значительные усилия специалистов по совершенствованию методов диагностики и лечения, БП остается фатальным заболеванием. Низкая эффективность лечения БП объясняется ее поздним диагностированием, а, следовательно, запоздалым лечением [7, 8]. Так, это заболевание диагностируется по появлению нарушений двигательной функции через десятки лет после начала патологически ускоренной нейродегенерации [9]. К моменту диагностирования погибает большая часть дофаминергических нейронов nigrostriатной системы мозга – ключевого звена регуляции двигательной функции и истощаются компенсаторные резервы мозга, т.е. практически отсутствуют мишени для фармакотерапии [10].

Исходя из вышесказанного, одной из ключевых задач фундаментальных исследований является изучение клеточных и молекулярных механизмов патогенеза БП на ранней стадии развития. При этом особенно важно выяснить, какие механизмы запускают ускоренную по сравнению с нормой нейродегенерацию и каковы механизмы нейропластичности, обеспечивающие в течение многих лет развития БП нормальную регуляцию моторной функции [1]. Ввиду отсутствия доклинической диагностики БП проведение исследований на доклинической стадии осуществимо только на моделях на животных, а не на больных. Поэтому разработка моделей раннего развития БП имеет большое самостоятельное значение [11, 12, 13].

1.1 Содержание дофамина и его метаболитов в nigrostriатной системы при моделировании доклинической стадии болезни Паркинсона на мышах

Ранее в лаборатории на мышах с помощью 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридина (МФТП) была разработана модель доклинической стадии БП, которая удовлетворяет ключевым требованиям доклинической стадии:

- отсутствие нарушений двигательной функции;
- снижение дофамина в стриатуме не достигает порогового уровня (30% от контроля);
- количество тел дофаминергических нейронов в черной субстанции не снижается ниже 60%.

Однако снижение уровня ДА в стриатуме, а также общий токсический эффект могут различаться при введении МФТП животным одной линии, но полученным из разных питомников [14]. Поэтому за последние почти 10 лет первоначально

использованная доза введения МФТП была уменьшена с 12 мг/кг до 6 мг/кг [11, 12, 15]. Для того, чтобы убедиться в воспроизведении модели доклинической стадии БП было определено содержание дофамина и его метаболитов (рисунок 3) в нигростриатной системе через 2 недели после двукратного введения МФТП в дозе 6 мг/кг (рисунок 4).

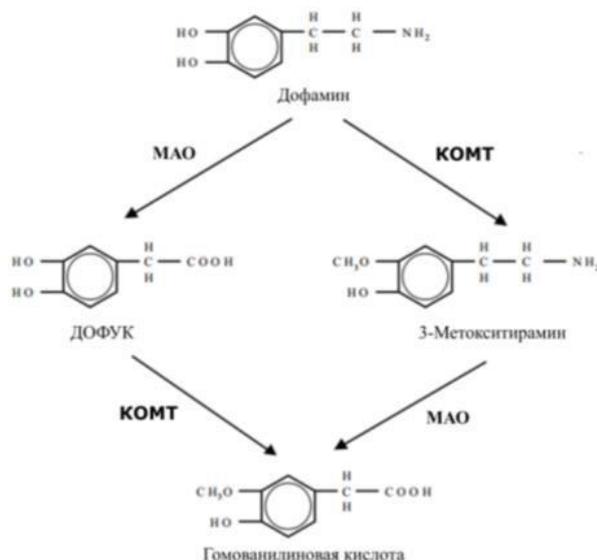


Рисунок 3 – Схема деградации дофамина

ДОФУК – дигидроксифенилуксусная кислота, MAO – моноаминоксидаза, КОМТ – катехол-о-метилтрансфераза.

Показано, что концентрация дофамина в стриатуме была снижена на 40% от уровня в контроле, соответственно составляя 59 пмоль/мг ткани в опытной и 97 пмоль/мг в контрольной группах. Снижение метаболитов ДОФУК и ГВК было равнозначно и примерно на 25%, в то время как ЗМТ не изменился. Это свидетельствует о снижении активности пути деградации ДА по пути MAO-КОМТ. Учитывая, что MAO расположен в нейронах и клетках глии, а КОМТ – в межклеточном пространстве и в клетках глии [16], то заманчиво предположить, что снижение деградации ДА происходит именно в дофаминергических нейронах.

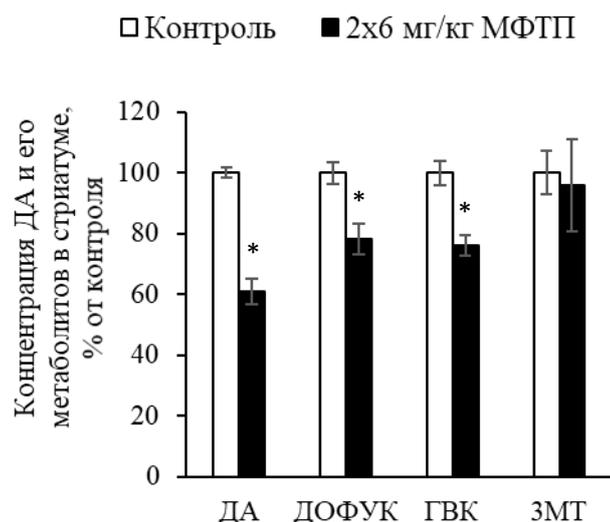


Рисунок 4 – Концентрация дофамина и его метаболитов в стриатуме после двукратного введения МФТП в разовой дозе 6 мг/кг через 14 дней
 МТ – 3-метокситирамин, ГВК – гомованилиновая кислота, ДА – дофамин, ДОФУК – дигидроксифенилуксусная кислота.

В черной субстанции изменений в содержании дофамина или его метаболитов через 2 недели после двукратного введения МФТП в дозе 6 мг/кг не обнаружено (рисунок 5).

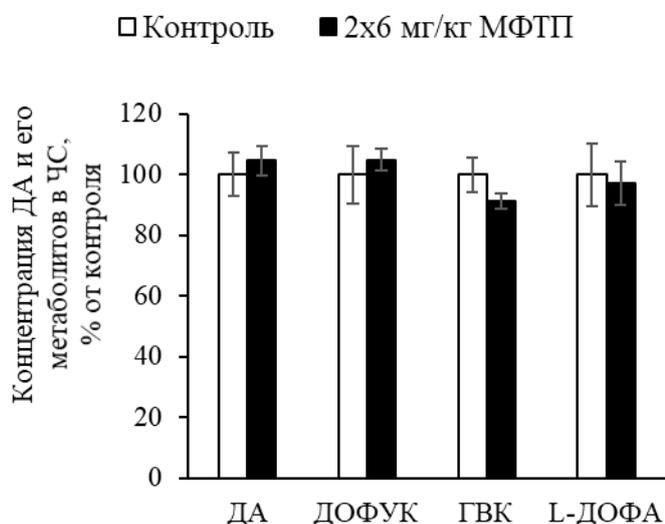


Рисунок 5 – Концентрация дофамина и его метаболитов в черной субстанции после двукратного введения МФТП в разовой дозе 6 мг/кг через 14 дней
 ГВК – гомованилиновая кислота, ДА – дофамин, L-ДОФА – L-диоксифенилаланин, ДОФУК – дигидроксифенилуксусная кислота.

Полученные данные по содержанию дофамина в нигростриатной системе согласуются с результатами, полученные при первоначальной разработке модели

доклинической стадии БП на мышах в 2011 году [11]. Таким образом, модель доклинической стадии БП была воспроизведена корректно.

3.2. Анализ экспрессии генов вовлеченных в нейродегенерацию и нейрокомпенсацию в черной субстанции при моделировании доклинической стадии болезни Паркинсона на мышах

Ключевой задачей при изучении нейродегенерации и нейропластичности мозга является изучение молекулярно-генетического профиля целевых популяций нейронов по мере прогрессирования заболевания. На разработанной модели доклинической стадии БП была проанализирована экспрессия более 100 генов, вовлеченных в нейродегенерацию и нейрокомпенсацию в черной субстанции, где локализуются дофаминергические нейроны nigrostriatной системы. На следующем этапе планируется провести аналогичный анализ на модели ранней клинической стадии БП [11, 17, 12], а сравнение профилей экспрессии генов между моделями, т.е. при прогрессировании патологии, позволит получить новые ценные данные о протекании и сопряженности механизмов нейродегенерации и нейропластичности в nigrostriatной системе.

В рамках исследования была проанализирована экспрессия больше 100 генов, относящихся к следующим группам:

1. Гены белков, вовлеченных в синтез, деградацию и транспорт катехоламинов, а также рецепторы дофамина:

- ферменты катаболизма катехоламинов: MAO (моноаминоксидаза)-А и MAO-Б, КОМТ (катехол-О-метилтрансфераза);
- ключевые ферменты синтеза катехоламинов: тирозингидроксилаза (скорость лимитирующий фермент в синтезе дофамина, превращает L-тирозин в L-ДОФА); декарбоксилаза ароматических L-аминокислот (превращает L-ДОФА в дофамин); дофамин бета-гидроксилаза (превращает дофамин в норадреналин); фенилэтанол-амин-N-метилтрансфераза (превращает норадреналин в адреналин);
- транспортеры дофамина: VMAT 1 и 2 (везикулярные транспортеры моноаминов 1-го и 2-го типа, DAT (мембранный транспортер дофамина), а также рецепторы 1–5 к дофамину (DRD1 – DRD5);

2. Гены белков, вовлеченных во внутриклеточный и везикулярный транспорт, – белки микротрубочек (тубулин 3 и 1a), белки, ассоциированные с микротрубочками: тау-белок, МАБ-2, кинезины 1В, 2С, 5А, тяжелая и легкие цепи динеина, динамин 1;

3. Гены белков, вовлеченных в синаптический и везикулярный транспорт: α -синуклеин, синапсин, синтаксин 1А, синаптотагмин 1 и 11, белки rab5a;

4. Гены оксидазных ферментов и генетических маркеров окислительного стресса;
5. Гены нейротрофических факторов и рецепторов к ним;
6. Гены белков, участвующих в протеасомной и лизосомной деградации;
7. Гены белков, участвующих в апоптозе, некрозе и аутофагии, включая гены белков основных сигнальных комплексов данных процессов.

3.2.1 Гены белков, вовлеченных в синтез, деградацию и транспорт катехоламинов, а также рецепторы дофамина

В черной субстанции экспрессия генов, вовлеченных в синтез (тирозингидроксилазы и декарбоксилазы ароматических L-аминокислот) и запасание дофамина (ДАТ и ВМАТ2) не изменялась по сравнению с контролем при моделировании доклинической стадии БП (рисунок 6). Данные по мРНК ТГ, ДАТ и ВМАТ2 согласуются с результатами, полученными ранее по оценке экспрессии соответствующих генов с помощью ПЦР РТ [17, 12].

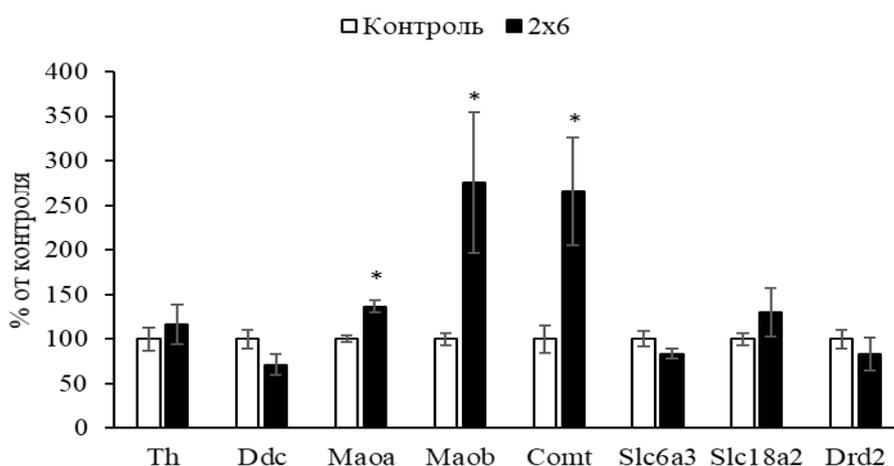


Рисунок 6 – Гены белков, вовлеченных в синтез, деградацию и транспорт дофамина, а также D2-рецептора дофамина в черной субстанции через 2 недели после двукратного введения МФТП в разовой дозе 6 мг/кг

Th – тирозингидроксилаза, Ddc – декарбоксилаза ароматических L-аминокислот, Маоа – моноаминоксидаза А, Маоб – моноаминоксидаза Б, Comt – катехол-о-метилтрансфераза, Slc6a3 – мембранный транспортер дофамина (ДАТ), Slc18a2 – везикулярный транспортер моноаминов 2-го типа (ВМАТ2), Drd2 – D2-рецептор к дофамину.

При этом обнаружено повышение экспрессии ферментов деградации нейротрансмиттера (МАО-А, МАО-Б, КОМТ), что вероятно связано с компенсаторным увеличением скорости освобождения межклеточной щели от дофамина на фоне «нормального» захвата нейротрансмиттера в дофаминергические нейроны (рисунок 6). При переходе на более продвинутой модели доклинической стадии, когда погибает 25% тел дофаминергических нейронов, экспрессия генов ДАТ, МАО-А и МАО-Б снижается

[12], т.е. происходит перестройка системы из состояния, когда дофамин является доступным и быстро синтезируемым ресурсом, в состояние его дефицита или невозможности быстрого его пополнения.

Рецепторов к дофамину существует 5 типов, которые объединяются в 2 группы: D1 (D1 и D5) и D2 (D2, D3 и D4). D1 класс обнаружен в подавляющем большинстве на постсинаптической мембране, в то время как D2 и на пост-, и на пресинаптической мембранах, где участвует в ауторегуляции DA-ергических нейронов. По результатам анализа Open Aагау стабильно в черной субстанции поднимался сигнал только от D2-рецепторов, однако, при моделировании болезни Паркинсона уровень экспрессии их не изменился (рисунок 6).

Гены ферментов синтеза норадреналина (дофамин бета-гидроксилаза) и адреналина (фенилэтаноламин-N-метилтрансфераза) в черной субстанции не экспрессируются.

3.2.2 Гены белков, вовлеченных во внутриклеточный и везикулярный транспорт

Ранее было отмечено, что аксональный транспорт при болезни Паркинсона изменяется, что связано со снижением экспрессии генов, белки которых отвечают, как за формирование микротрубочек (тубулин), так и за anterogradный (кинезины) и retrogradный (динеины) транспорт [18].

Анализ экспрессии генов в черной субстанции, вовлеченных во внутриклеточный и везикулярный транспорт при моделировании доклинической стадии болезни Паркинсона, не показал изменений в уровне мРНК α -тубулина и β 3-тубулина, кинезинов и тяжелой цепи динеина (рисунок 7). Однако, произошло снижение экспрессии легкой цепи динеина, динактина и повешение тау белка. Динактин является связующим звеном между грузом (везикул, эндосом, лизосом и т.д.) и динеином. Этот комплекс осуществляет как retrogradный аксональный транспорт, так и доставку грузов от эндоплазматического ретикулума к аппарату Гольджи. Согласно полученным данным на ранних этапах деградации nigrostriatной системы, вероятно, происходит замедление retrogradного транспорта, но не anterogradного. Это возможно связано со снижением энергетических резервов дофаминергических нейронов при введении МФТП, которое сохраняется в течение длительного времени после токсического эффекта [19, 20, 21]. В подтверждение такого предположения косвенно выступают данные по увеличению экспрессии тау белка, стабилизатора микротрубочек, разборка-сборка которых является динамичным и энергозатратным процессом.

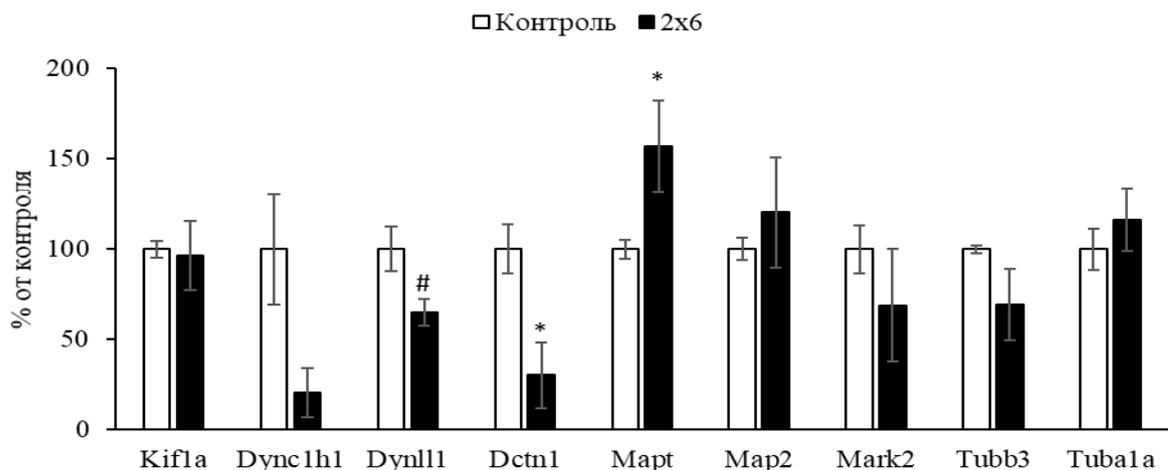


Рисунок 7 – Гены белков, вовлеченные во внутриклеточный и везикулярный транспорт в черной субстанции через 2 недели после двукратного введения МФТП в разовой дозе 6 мг/кг

Kif1a – кинезин 1А, Dync1h1 – тяжелая цепь динеина, Dynl1 – легкая цепь динеина, Dctn1 – динактин, Mart – тау белок, Map2 – белок связанный с микротрубочками 2 типа, Mark2 – киназа 2, регулирующая сродство с микротрубочками, Tubb3 – β 3-тубулин, Tuba1a – α -тубулин.

3.3.3. Гены белков, вовлеченных в синаптический и везикулярный транспорт

Исследованию роли α -синуклеина при болезни Паркинсона отведена огромная роль. Не только большое количество исследований посвящено изучению его агрегации в тельца Леви и возможные пути коррекции изоформ белка, но также и мутациям в гене, которые были обнаружены у пациентов. Однако до сих пор нет окончательного решения о возможной инициаторной роли α -синуклеина в дегенерации дофаминергических нейронов при болезни Паркинсона.

α -синуклеин участвует в регуляции транспортировки везикул и последующем высвобождении нейротрансмиттера. Согласно полученным данным экспрессия белка снижалась в черной субстанции на модели доклинической стадии болезни Паркинсона (рисунок 8), аналогичные изменения были получены у пациентов на клинической стадии [18]. Интересно, что уже на доклинической стадии обнаружено достоверное снижение уровня мРНК данного белка в черной субстанции, которое, вероятно, отражает компенсаторный процесс в ответ на нарушение метаболизма α -синуклеина. Интересным также будет сравнить уровень мРНК с содержанием белка и с концентрацией сфинголипидов на модели доклинической и клинической стадии болезни Паркинсона, учитывая, что появляются новые данные об участии последних в формировании телец Леви [22, 23].

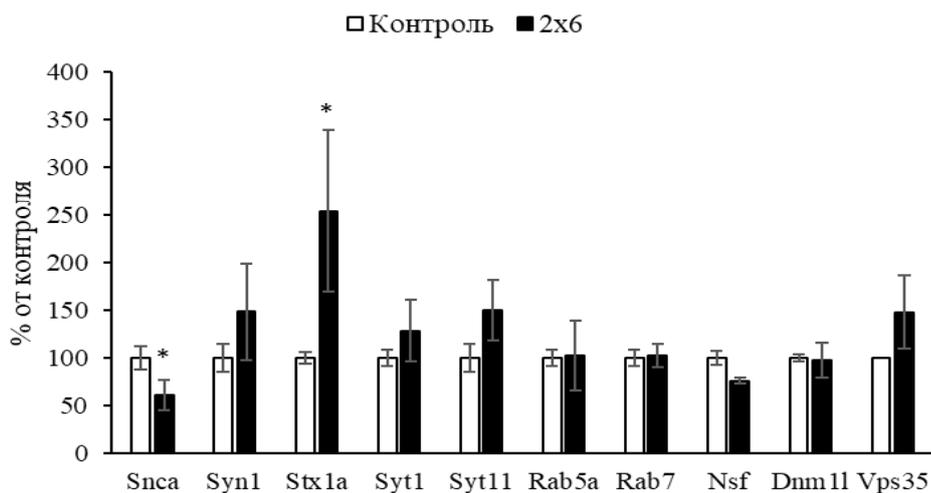


Рисунок 8 – Гены белков, вовлеченные во внутриклеточный и везикулярный транспорт в черной субстанции через 2 недели после двукратного введения МФТП в разовой дозе 6 мг/кг

Snca – α -синуклеин, Syn1 – синапсин 1, Stx1a – синтаксин 1A, Syt1 – синаптотагмин I, Syt11 – синаптотагмин XI, Rab5a – Rab5a, Rab7 – Rab7, Nsf – этилмалемид чувствительный белок слияния, Dnm11– динамин 1-подобный, Vsp35 – вакуолярный белок сортинга 35.

Нарушение везикулярного транспорта может быть одной из причин начала дегенерации аксонов, в том числе и при болезни Паркинсона. Экзоцитоз включает несколько шагов: докирование, прайминг и Ca^{2+} -опосредованное слияние везикул с пресинаптической мембраной. Центральным звеном экзоцитоза является SNARE комплекс, который состоит из трех мембранно-ассоциированных белков: синтаксина I, SNAP-25 и синаптобrevина. Также в стабилизации SNARE комплекса участвует небольшой цитозольный белок комплексин, а синаптотагмин I являясь кальциевым сенсором, обеспечивает синхронный и быстрый выброс нейротрансмиттера [24].

Экспрессия белков SNARE-комплекса не изменялась по сравнению с контролем на модели доклинической стадии болезни Паркинсона, кроме синтаксина, мРНК которого была увеличена в два раза (рисунок 8). При этом у пациентов на клинической стадии обнаружено снижение экспрессии как синтаксина, так и синаптотагмина в черной субстанции [18]. Это может свидетельствовать о компенсаторных процессах, направленных на увеличение выброса дофамина в стриатуме на доклинической стадии.

Экспрессия белка Nsf, который участвует в «распутывании» SNARE-комплекса не менялась на модели доклинической стадии болезни Паркинсона (рисунок 8). Отсутствие изменений также было обнаружено при оценке мРНК белков, участвующих в созревании эндсом, такие как Rab5, Rab7, Vsp35 и делении митохондрий – Dnm11 (рисунок 8).

3.3.4 Гены оксидазных ферментов и генетических маркеров окислительного стресса

Развитие окислительного стресса в нейроне обусловлено разбалансировкой образования активных форм кислорода (АФК), азота, металлов – формированием высоко реактивных форм веществ и снижением активности (эффективности) антиоксидантной системой, т.е. нарушением «редокс-статуса» клетки [25]. Посмертный анализ ткани ЧС пациентов с болезнью Паркинсона показал повышенный уровень окислительного стресса по сравнению с возрастным контролем. Также при БП показано снижение содержание глутатиона в ЧС на 40% у пациентов [26, 27]. При этом в других отделах мозга такого снижения не происходит, что свидетельствует о специфическом снижении активности антиоксидантной системы в ДА-ергических нейронах [27].

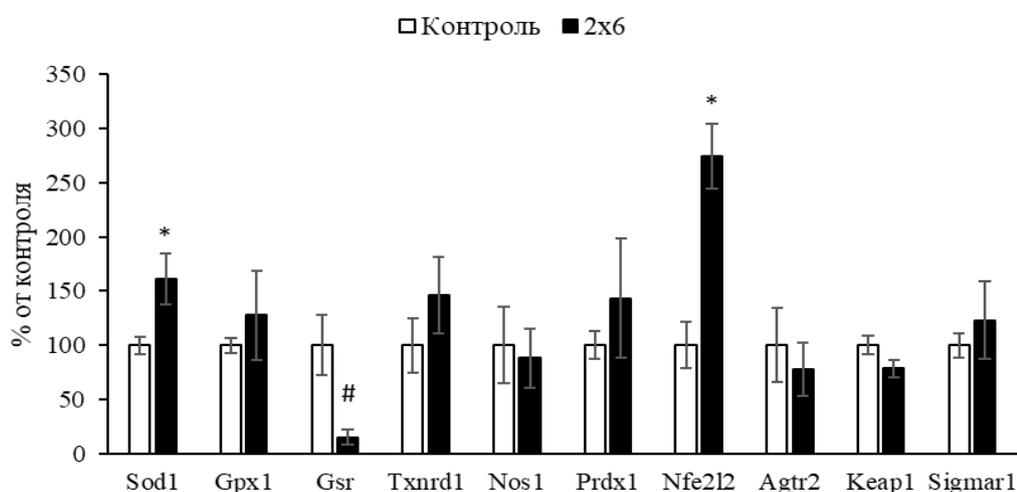


Рисунок 9 – Гены белков, вовлеченные в окислительный стресс, в черной субстанции через 2 недели после двукратного введения МФТП в разовой дозе 6 мг/кг Sod1 – супероксиддисмутаза-1, Gpx1 – глутатион пероксидаза 1, Gsr – глутатионредуктаза, Txnrd1 – тиоредоксин редуктаза, Nos1 – синтаза оксида азота 1, Prdx1– пероксиредоксин 1, Nfe2l2 – ядерный фактор, связанный с эритроидом 2 (Nrf2), Agtr2 – рецептор ангиотензина 2, Keap1– Kelch-подобный ECH-ассоциированный протеин 1, Sigmar1 – сигма-1 рецептор.

На модели доклинической стадии в черной субстанции было обнаружено увеличение экспрессии транскрипционного фактора Nrf2 (Nfe2l2), регулирующего транскрипцию генов антиоксидантных ферментов, супероксиддисмутазы, ключевого антиоксидантного фермента, но при этом показано снижение экспрессии глутатионредуктазы, фермента восстанавливающего глутатион (рисунок 9). Эти данные свидетельствуют, что несмотря на длительный период (2 недели) после активации окислительного стресса МФТП в дофаминергических нейронах и/или клетках их окружающих (глии) не происходит полного восстановления редокс статуса.

3.3.5 Гены нейротрофических факторов и рецепторов к ним

Нейротрофические факторы – большая группа полипептидов, участвующих регуляции жизнедеятельности нейронов от образования до поддержания нейронов нервной системы во взрослом состоянии, а также обеспечивающих выживание нейронов при действии стресса (токсины, ишемия и др.). Выделяют несколько классов нейротрофических факторов и рецепторов к ним.

На исследованных образцах черной субстанции стабильно экспрессируются фактор роста эндотелия сосудов A и Trk-рецептор 2го типа (TrkB), к которому имеет высокое сродство мозговой нейротрофический фактор (BDNF) (рисунок 10). При этом мРНК самого BDNF в черной субстанции была обнаружена только в контроле, но не в опытных образцах. Также отсутствовала экспрессия генов таких нейротрофических факторов, как глиальный нейротрофический фактор (GDNF), фактор роста нервов (NGF), мозговой нейротрофический фактор дофамина (CDNF) и рецепторов Trk1 и p75.

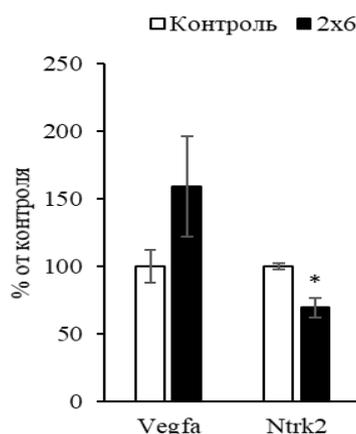


Рисунок 10 – Гены белков нейротрофических факторов и рецепторов к ним в черной субстанции через 2 недели после двукратного введения МФТП в разовой дозе 6 мг/кг
Vegfa – фактор роста эндотелия сосудов A, Ntrk2 – Trk-рецептор 2го типа.

При болезни Паркинсона с помощью метода *in situ* изменений в экспрессии рецепторов TrkB в выживших дофаминергических нейронах нигростриатной системы не обнаружено, но при этом общий сигнал от черной субстанции на материале от пациентов был ниже, чем у возрастного контроля [28]. Также в работе Simunovic [18] проводилась оценка порядка 20 мРНК нейротрофических факторов, рецепторов к ним и транскрипционных факторов, участвующих в активации соответствующих путей, в черной субстанции при болезни Паркинсона и только для 2х из исследованных веществ было показано снижение экспрессии генов, в время как большинство не менялось. Эти

данные свидетельствуют, что на клинической стадии заболевания, вероятно, происходит истощение компенсаторных процессов в нейротрофической системе в черной субстанции. Однако в таком случае не ясно, почему на модели доклинической стадии болезни Паркинсона было обнаружено снижение экспрессии гена TgkV (рисунок 10). Для интерпретации полученных данных необходимо оценить экспрессию рецептора на модели клинической стадии и может быть на более ранних сроках после введения МФТП.

3.3.6. Гены белков, участвующих в протеосомной и лизосомной деградации

Убиквитин-протеасомная система совместно с лизосомами участвуют в деградации неправильно свернувшихся, поврежденных и т.д. белков. Нарушение работы данной системы ведет к накоплению «плохих» белков, в том числе и α -синуклеина, агрегации которого образуют тельца Леви [29]. При болезни Паркинсона показано значительное снижение экспрессии белков, участвующих в убиквитин-протеасомной системе деградации белков [18]. Более, чем в 5 раз падает мРНК убиквитина, что также обнаружено на модели доклинической стадии болезни Паркинсона (рисунок 11). Вероятно, на модели клинической стадии изменения в мРНК будут происходить почти во всех или всех оцениваемых белках.

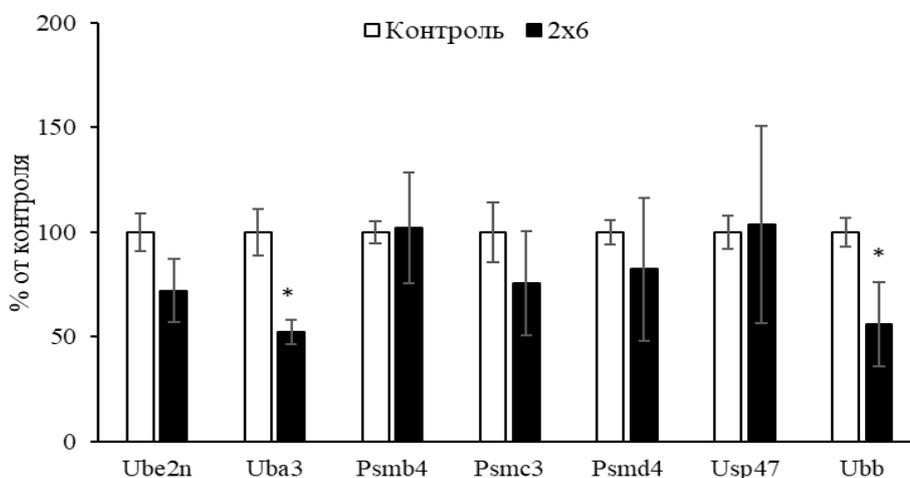


Рисунок 11 – Гены белков, вовлеченные в протеасомную деградацию белков, в черной субстанции через 2 недели после двукратного введения МФТП в разовой дозе 6 мг/кг

Ube2n – убиквитин-конъюгирующий белок, Uba3 – убиквитин-лигаза, Psmb4 – субъединица β протеасомы, Psmc3 – 26S субъединица протеасомы (АТФаза 3), Psm4 – 26S субъединица протеасомы (не АТФ-аза 4), Usp47 – убиквитиновая специфическая пептидаза 47, Ubb – убиквитин Б.

3.3.7. Гены белков, участвующих в апоптозе, некрозе и аутофагии

В настоящее время, несмотря на большой массив накопленных данных о процессах, которые приводят к гибели дофаминергических нейронов nigrostriатной системы при болезни Паркинсона, вопрос о механизме гибели клеток (апоптоз, некроз или аутофагия) остается открытым. Часть работ показывает наличие признаков апоптоза в nigrostriатной системе при болезни Паркинсона [30, 31, 32]. В то время как в других работах не показано наличия основного признака апоптоза в DA-ергических нейронах в черной субстанции, а именно фрагментации ДНК [33, 34, 35, 36]. Интересно, что на одном посмертном материале в области черной субстанции были обнаружены погибающие клетки по пути и апоптоза и аутофагии, в то время как некроз был обнаружен только в клетках глии, но не в дофаминергических нейронах. При этом погибающие нейроны не содержали тельца Леви, которые были показаны только в выживших нейронах черной субстанции [37]. В качестве доказательства того, что апоптоз является основным механизмом гибели дофаминергических нейронов в nigrostriатной системе при болезни Паркинсона, выступают данные о наличии активной каспазы 3, основного индуктора апоптоза [37, 38].

При моделировании болезни Паркинсона на мышах с помощью МФТП механизм гибели нейронов зависит от схемы введения нейротоксина. На острых моделях, когда МФТП вводится в течение одного дня, преобладает некроз в то время, как при субхронических или хронических схемах введения превалируют другие типы клеточной гибели. Однако при любой схеме период дегенерации дофаминергических нейронов занимает не более двух дней после введения нейротоксина. Поэтому при использованной в данном исследовании схеме эксперимента (сбор через 2 недели после введения МФТП) закономерно, что изменений экспрессии генов, участвующих в процессах гибели нейронов не обнаружено (рисунок 12 и 13).

Неожиданным результатом явилось увеличение экспрессии мРНК Fos, который является геном раннего ответа на стресс (рисунок 12). Также ему отводят роль инициатора апоптоза, однако, при использованной схеме эксперимента это маловероятно. Возможно, обнаруженное увеличение его экспрессии является показателем развития компенсаторных механизмов, направленных на восстановление стриатума, где дофамин даже спустя 2 недели остается ниже контрольного значения.

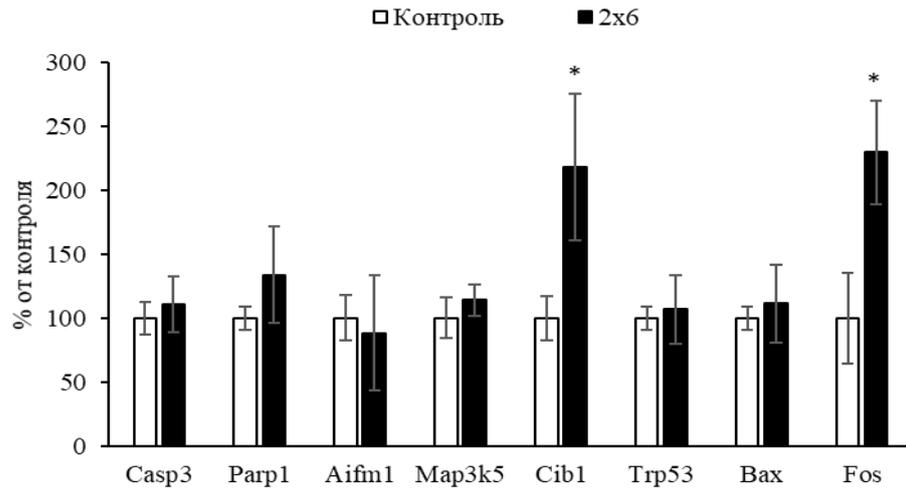


Рисунок 12 – Гены белков, вовлеченные в апоптоз, в черной субстанции через 2 недели после двукратного введения МФТП в разовой дозе 6 мг/кг
 Casp3 – каспаза 3, Parp1 – поли(АДФ-рибоза)полимераза 1 (PARP1), Aifm1 – апоптоз индуцирующий фактор, Map3k5 – митоген-активируемая протеинкиназа 5, Cib1 – калмирин, Trp53 – белок 53, Bax – Bcl-2-подобный белок 4, Fos – протоонкоген c-Fos.

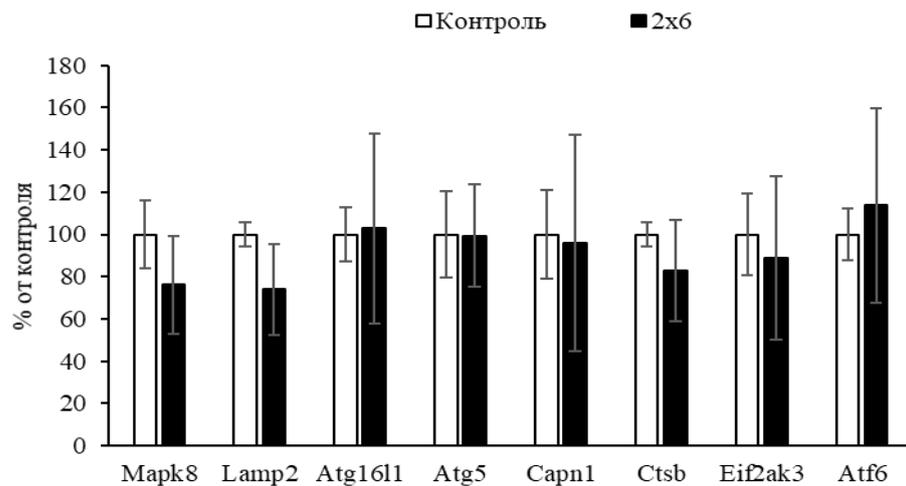


Рисунок 13 – Гены белков, вовлеченные в некроз и аутофагию, в черной субстанции через 2 недели после двукратного введения МФТП в разовой дозе 6 мг/кг
 Mapk8 – митоген-активируемая протеинкиназа 8, Lamp2 – лизосоמו-ассоциированный мембранный белок 2, Atg16l1 – белок, связанный с атофагией 16, Atg5 – белок, связанный с атофагией 16, Capn1 – калпаин 1, Ctsb – фактор некроза опухоли, Eif2ak3 – эукариотический фактор инициации трансляции 2-альфа-киназа 3, Atf6 – активирующий фактор транскрипции 6.

3.4 Оценка содержания физиологически активных веществ в плазме крови в норме и при моделировании болезни Паркинсона

Системный характер болезни Паркинсона, так же как и многих других заболеваний, отражается в изменении химического состава гуморальных сред – ликвора,

крови, мочи, слюны, слезы [39]. В ряде работ в крови и в ликворе у больных отмечены изменения в уровне эндогенных нейротоксинов, классических нейротрансмиттеров и их метаболитов, липидов, продуктов окислительного стресса, воспалительных цитокинов, микроРНК и специфических антител, которые рассматриваются как биомаркеры БП [40, 41, 42, 43, 44].

В рамках проекта был проведен анализ содержания моноаминов и их метаболитов [6] в плазме крови и слезах [45], а также α -синуклеина в плазме крови и лимфоцитов [46] на моделях болезни Паркинсона на мышах. Было показано, что в плазме крови содержание ДОФУК снижается, дофамин имеет тенденцию к увеличению, а другие катехоламины не меняются. По мере прогрессирования патологии меняются только дофамин и серотонин (достоверно растут) [6].

В слезах мышей концентрации норадреналина и дофамина на модели доклинической стадии достоверно увеличивались, в то время как ДОФУК не менялся [45]. Это свидетельствует о том, что потенциальные биомаркеры на доклинической стадии для крови могут выступать метаболиты дофамина, в то время как для слез – сами катехоламины.

Отношение мономерного α -синуклеина к олигомерному снижается практически вдвое в плазме крови при моделировании болезни Паркинсона и наблюдается тенденция к снижению отношения общего α -синуклеина к фосфорилированному по серину¹²⁹. По данным ряда исследований, такие изменения характерны для больных при болезни Паркинсона. В отличие от плазмы, в лимфоцитах не было обнаружено изменения соотношения указанных белков [46]. Другим перспективным источником биомаркер кров может выступать ликвор, учитывая, что он является самостоятельной эндокринной системой мозга, в котором содержатся в физиологических концентрациях моноамины, способные участвовать в регуляции развития и поддержания нейронов [47, 48].

Поиск биомаркеров специфичных для доклинической стадии болезни Паркинсона позволит разработать способы диагностики заболевания до нарушения двигательной функции (на досимптомной стадии), и своевременное начатое лечение продлит комфортную жизнь больного без симптоматики за счет замедления нейродегенерации. Поэтому уже сейчас необходимо вести исследования не только по поиску биомаркеров, которые являются только условно специфичными для болезни Паркинсона, но также разрабатывать альтернативные способы ранней диагностики, например провокационный тест, а также нейропротекторную терапию.

В качестве агента для провокационного теста может выступать эндогенный ингибитор тирозингидроксилазы – моноидротирозина (МИТ). Показано, что МИТ в дозе

100 мг/кг через 2 ч после подкожного введения снижает уровень дофамина в стриатуме интактных мышей на 34% [49]. Введение выбранной дозы МИТ вызвало симптомы моторных нарушений на нейротоксической модели доклинической стадии болезни Паркинсона у мышей, но не в контроле. Это связано с тем, что только на модели болезни Паркинсона у мышей воздействие МИТ привело к снижению уровня дофамина в стриатуме до порога проявления двигательных симптомов. Таким образом, на экспериментальной модели доклинической стадии болезни Паркинсона у мышей показана эффективность провокационного теста с МИТ для выявления скрытой функциональной недостаточности нигростриатной системы.

Для тестирования потенциальных нейропротекторов необходима модель болезни Паркинсона, которая учитывает период гибели дофаминергических нейронов, который длится 1 день после введения МФТП. Валидация такой модели была сделана с помощью нейропротекторов с известными механизмами действия: ингибитора мембранного переносчика дофамина – номифензина, и пептида СЕМАКС, который может стимулировать секрецию эндогенных нейротрофических факторов или действовать как антиоксидант [50]. Показано, что введение номифензина почти полностью защищает дофаминергические волокна и сохраняет концентрацию дофамина в стриатуме на контрольном уровне. При этом небольшое, но достоверное увеличение концентрации дофамина обнаружено при использовании СЕМАКС в качестве индуктора секреции эндогенных нейротрофических факторов, но не в качестве антиоксиданта.

Альтернативой поиска потенциальных нейропротекторов может выступать трансплантация дофаминергических нейронов, полученных из эмбрионов или, например, дифференцированные из плюрипотентных стволовых клеток. Однако первоначально для таких исследований используют животных, которым в зависимости от моделирующего заболевания пересаживают суспензию клеток. Для того, чтобы повысить эффективность такого лечения необходимо понимать влияние окружающих факторов на трансплантат. В случае болезни Паркинсона местом введения дофаминергических нейронов будет являться стриатум, место проекции нейронов нигростриатной системы. Помимо дофамина в стриатуме также есть серотониновая и норадреналиновая иннервация, поэтому была оценена роль гидрокситриптофана (предшественника серотонина) и серотонина на пролиферацию и гибель стволовых клеток и фибробластов мышей.

Показано, что только гидрокситриптофан, но не серотонин оказывал влияние на остановку пролиферации клеток, а также повышал уровень апоптоза и некроза в культуре [51]. При этом введение к культуре клеток гидрокситриптофана не приводило к

увеличению уровня серотонина, однако, происходило накопление самого гидрокситриптофана. Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что при последующей разработке метода трансплантации дофаминергических нейронов в стриатум при моделировании болезни Паркинсона следует оценивать концентрацию эндогенного гидрокситриптофана с возможным ее снижением для повышения выхода потенциальных клеток.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

При проведении исследований была воспроизведена модель доклинической стадии болезни Паркинсона на мышах. Показано, что в стриатуме концентрация дофамина была снижена на 40%, а в черной субстанции сохранялась на уровне контроля.

Также был проведен анализ экспрессии более 100 генов, участвующих в разных внутриклеточных процессах, в том числе нейродегенерации и нейрокомпенсации, на уровне черной субстанции при моделировании доклинической стадии болезни Паркинсона на мышах. Показано увеличение мРНК ферментов деградации дофамина на фоне неизменного уровня экспрессии ферментов синтеза дофамина или D2-рецепторов. Обнаружено компенсаторное увеличение мРНК тау-белка, участвующего в стабилизации микротрубочек, а также мРНК синтаксина, определяющего белка выброса дофамина из синаптических пузырьков.

Полученные данные по экспрессии генов белков антиоксидантной системы свидетельствуют о неполном восстановлении редокс статуса клеток спустя 2 недели после введения МФТП. Более того обнаружены первые изменения в убиквитин-протеасомной системе деградации белков, что вероятно будет усугубляться по мере прогрессирования патологии.

Показано, что в сохранившихся дофаминергических нейронах и клетках их окружающих не происходит активация клеточной гибели, однако, экспрессия рецепторов к нейротрофическим факторам снижена.

СПИСОК ЦИТИРОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Agid Y. Parkinson's disease: pathophysiology // *Lancet*. – 1991. – Vol. 337, No. 8753. P. 1321-4.
2. Paxinos G., Franklin K.B.J. The mouse brain in stereotaxic coordinates // Academic Press, San Diego. – 2001. – 350 P.
3. Alves G, Forsaa EB, Pedersen KF, Dreetz Gjerstad M, Larsen JP. Epidemiology of Parkinson's disease // *J Neurol*. – 2008. – Vol. 255, Suppl 5. P. 18-32.
4. Elbaz A, Carcaillon L, Kab S, Moisan F. Epidemiology of Parkinson's disease // *Rev Neurol (Paris)*. – 2016. – Vol. 172, No. 1. P. 14-26.
5. Kowal SL, Dall TM, Chakrabarti R, Storm MV, Jain A. The current and projected economic burden of Parkinson's disease in the United States // *Mov Disord*. – 2013. – Vol. 28, No. 3. P. 311-8.
6. Гусев Е.И., Блохин В.Е., Вартанов С.А., Мартынов М.Ю., Катунина Е.А., Алесенко А.В., Денисова И.А., Павлова Е.Н.1, Полтерович В.М., Кучеряну В.Г., Шупик М.А., Нодель М.Р., Калинин А.Л., Соколов С.А., Чубарова Т.В., Шаклеина М.В., Пронина Т.С., Угрюмов М.В. Разработка ранней диагностики болезни Паркинсона и комплексный экономический анализ эффекта от ее внедрения // *Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова*. – 2021. – Т. 121. Вып. 1. С. 9-20.
7. Mehta SH, Adler CH. Advances in Biomarker Research in Parkinson's Disease // *Curr Neurol Neurosci Rep*. – 2016. – Vol. 16, No. 1. P. 7.
8. Postuma RB, Berg D. Advances in markers of prodromal Parkinson disease // *Nat Rev Neurol*. – 2016. – Vol. 12, No. 11. P. 622-634.
9. Postuma R.B., Berg D. Prodromal Parkinson's disease: The decade past, the decade to come // *Mov Disord*. – 2019. – Vol. 34, No. 5. P. 665-675.
10. Blesa J, Trigo-Damas I, Dileone M, Del Rey NL, Hernandez LF, Obeso JA. Compensatory mechanisms in Parkinson's disease: Circuits adaptations and role in disease modification // *Exp Neurol*. – 2017. – Vol. 298. P. 148-161.
11. Ugrumov MV, Khaindrava VG, Kozina EA, Kucheryanu VG, Bocharov EV, Kryzhanovsky GN, Kudrin VS, Narkevich VB, Klodt PM, Rayevsky KS, Pronina TS. Modeling of presymptomatic and symptomatic stages of parkinsonism in mice // *Neuroscience*. – 2011. – Vol. 181. P. 175-88.
12. Mingazov ER, Khakimova GR, Kozina EA, Medvedev AE, Buneeva OA, Bazyan AS, Ugrumov MV. MPTP Mouse Model of Preclinical and Clinical Parkinson's Disease as an Instrument for Translational Medicine // *Mol Neurobiol*. – 2018. – Vol. 55, No. 4. P. 2991-3006.

13. Salari S, Bagheri M. In vivo, in vitro and pharmacologic models of Parkinson's disease // *Physiol Res.* – 2019. – Vol. 68, No. 1. P. 17-24.
14. Jackson-Lewis V, Przedborski S. Protocol for the MPTP mouse model of Parkinson's disease // *Nat Protoc.* – 2007. – Vol. 2, No. 1. P. 141-51.
15. Kim A, Nigmatullina R, Zalyalova Z, Soshnikova N, Krasnov A, Vorobyeva N, Georgieva S, Kudrin V, Narkevich V, Ugrumov M. Upgraded Methodology for the Development of Early Diagnosis of Parkinson's Disease Based on Searching Blood Markers in Patients and Experimental Models // *Mol Neurobiol.* – 2019. – Vol. 56, No. 5. P. 3437-3450.
16. Schendzielorz N, Oinas JP, Myöhänen TT, Reenilä I, Raasmaja A, Männistö PT. Catechol-O-methyltransferase (COMT) protein expression and activity after dopaminergic and noradrenergic lesions of the rat brain // *PLoS One.* – 2013. – Vol. 8, No. 4. P. e61392.
17. Kozina EA, Khakimova GR, Khaindrava VG, Kucheryanu VG, Vorobyeva NE, Krasnov AN, Georgieva SG, Kerkerian-Le Goff L, Ugrumov MV. Tyrosine hydroxylase expression and activity in nigrostriatal dopaminergic neurons of MPTP-treated mice at the presymptomatic and symptomatic stages of parkinsonism // *J Neurol Sci.* – 2014. – Vol. 340, No. 1-2. P. 198-207.
18. Simunovic F, Yi M, Wang Y, Macey L, Brown LT, Krichevsky AM, Andersen SL, Stephens RM, Benes FM, Sonntag KC. Gene expression profiling of substantia nigra dopamine neurons: further insights into Parkinson's disease pathology // *Brain.* – 2009. – Vol. 132, No. Pt 7. P. 1795-809.
19. Chan P, DeLanney LE, Irwin I, Langston JW, Di Monte D. Rapid ATP loss caused by 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine in mouse brain // *J Neurochem.* – 1991. – Vol. 57, No. 1. P. 348-51.
20. Alvarez-Fischer D, Noelker C, Grünewald A, Vulinović F, Guerreiro S, Fuchs J, Lu L, Lombès A, Hirsch EC, Oertel WH, Michel PP, Hartmann A. Probenecid potentiates MPTP/MPP+ toxicity by interference with cellular energy metabolism // *J Neurochem.* – 2013. – Vol. 127, No. 6. P. 782-92.
21. Mendes MO, Rosa AI, Carvalho AN, Nunes MJ, Dionísio P, Rodrigues E, Costa D, Duarte-Silva S, Maciel P, Rodrigues CMP, Gama MJ, Castro-Caldas M. Neurotoxic effects of MPTP on mouse cerebral cortex: Modulation of neuroinflammation as a neuroprotective strategy // *Mol Cell Neurosci.* – 2019. – Vol. 96. P. 1-9.
22. Алесенко А.В., Блохин В.Е.1, Шулик М.А., Гутнер У.А., Лебедев А.Т., Малошицкая О.А., Соколов С.А., Угрюмов М.В.1 Изменение содержания сфинголипидов в nigrostriатной дофаминергической системе мозга у мышей на нейротоксической модели болезни паркинсона// *Нейрохимия.* – 2021. – Т. 38. № 2. С. 161-167.

23. Rocha EM, Smith GA, Park E, Cao H, Graham AR, Brown E, McLean JR, Hayes MA, Beagan J, Izen SC, Perez-Torres E, Hallett PJ, Isacson O. Sustained Systemic Glucocerebrosidase Inhibition Induces Brain α -Synuclein Aggregation, Microglia and Complement C1q Activation in Mice // *Antioxid Redox Signal.* – 2015. – Vol. 23, No. 6. P. 550-64.
24. Südhof TC. Calcium control of neurotransmitter release // *Cold Spring Harb Perspect Biol.* – 2012. – Vol. 4, No. 1. P. a011353.
25. Dias V, Junn E, Mouradian MM. The role of oxidative stress in Parkinson's disease // *J Parkinsons Dis.* – 2013. – Vol. 3, No. 4. P. 461-91.
26. Perry TL, Yong VW. Idiopathic Parkinson's disease, progressive supranuclear palsy and glutathione metabolism in the substantia nigra of patients // *Neurosci Lett.* – 1986. – Vol. 67, No. 3. P. 269-74.
27. Sian J, Dexter DT, Lees AJ, Daniel S, Jenner P, Marsden CD. Glutathione-related enzymes in brain in Parkinson's disease // *Ann Neurol.* – 1994. – Vol. 36, No. 3. P. 356-61.
28. Benisty S, Boissiere F, Faucheux B, Agid Y, Hirsch EC. trkB messenger RNA expression in normal human brain and in the substantia nigra of parkinsonian patients: an in situ hybridization study // *Neuroscience.* – 1998. – Vol. 86, No. 3. P. 813-26.
29. Olanow CW, McNaught KS. Ubiquitin-proteasome system and Parkinson's disease // *Mov Disord.* – 2006. – Vol. 21, No. 11. P. 1806-23.
30. Mochizuki H, Goto K, Mori H, Mizuno Y. Histochemical detection of apoptosis in Parkinson's disease // *J Neurol Sci.* – 1996. – Vol. 137, No. 2. P. 120-3.
31. Tompkins MM, Basgall EJ, Zamrini E, Hill WD. Apoptotic-like changes in Lewy-body-associated disorders and normal aging in substantia nigral neurons // *Am J Pathol.* – 1997. – Vol. 150, No. 1. P. 119-31.
32. Kingsbury AE, Marsden CD, Foster OJ. DNA fragmentation in human substantia nigra: apoptosis or perimortem effect? // *Mov Disord.* – 1998. – Vol. 13, No. 6. P. 877-84.
33. Kösel S, Egensperger R, von Eitzen U, Mehraein P, Graeber MB. On the question of apoptosis in the parkinsonian substantia nigra // *Acta Neuropathol.* – 1997. – Vol. 93, No. 2. P. 105-8.
34. Banati RB, Daniel SE, Blunt SB. Glial pathology but absence of apoptotic nigral neurons in long-standing Parkinson's disease // *Mov Disord.* – 1998. – Vol. 13, No. 2. P. 221-7.
35. Jellinger KA. Cell death mechanisms in Parkinson's disease // *J Neural Transm (Vienna).* – 2000. – Vol. 107, No. 1. P. 1-29.

36. Graeber MB, Grasbon-Frodl E, Abell-Aleff P, Kösel S. Nigral neurons are likely to die of a mechanism other than classical apoptosis in Parkinson's disease // *Parkinsonism Relat Disord.* – 1999. – Vol. 5, No. 4. P. 187-92.
37. Anglade P, Vyas S, Hirsch EC, Agid Y. Apoptosis in dopaminergic neurons of the human substantia nigra during normal aging // *Histol Histopathol.* – 1997. – Vol. 12, No. 3. P. 603-10.
38. Hartmann A, Hunot S, Michel PP, Muriel MP, Vyas S, Faucheux BA, Mouatt-Prigent A, Turmel H, Srinivasan A, Ruberg M, Evan GI, Agid Y, Hirsch EC. Caspase-3: A vulnerability factor and final effector in apoptotic death of dopaminergic neurons in Parkinson's disease // *Proc Natl Acad Sci USA.* – 2000. – Vol. 97, No. 6. P. 2875-80.
39. Katargina L.A., Osipova N.A., Panova A.Y., Bondarenko N.S.1, Nikishina Y.O.1, Murtazina A.R.1, Ugrumov M.V.1 Prognostic Value Estimation of Monoamines Systemic Level in Retinopathy of Prematurity in Experiment // *Sovremennye Tehnologii v Medicine.* – 2021. – Vol. 13, No. 3. P 41-44.
40. Ahlskog J.E., Uitti R.J., Tyce G.M., O'Brien J.F., Petersen R.C., Kokmen E. Plasma catechols and monoamine oxidase metabolites in untreated Parkinson's and Alzheimer's diseases // *J Neurol Sci.* – 1996. – Vol. 136, No. 1-2. P. 162-168.
41. Delenclos M., Jones D.R., McLean P.J., Uitti R.J. Biomarkers in Parkinson's disease: advances and strategies // *Parkinsonism Relat. Disord.* – 2016. – Vol. 22, Suppl. 1. P. S106-S110.
42. Kori M., Aydın B., Unal S., Arga K.Y., Kazan D. Metabolic Biomarkers and Neurodegeneration: A Pathway Enrichment Analysis of Alzheimer's Disease, Parkinson's Disease, and Amyotrophic Lateral Sclerosis // *OMICS.* – 2016. – Vol. 20, No. 11. P. 645-661.
43. Htike T.T., Mishra S., Kumar S., Padmanabhan P., Gulyás B. Peripheral biomarkers for early detection of Alzheimer's and Parkinson's diseases // *Mol Neurobiol.* – 2019. – Vol. 56, No. 3. P. 2256-2277.
44. Sun Q, Wang S, Chen J, Cai H, Huang W, Zhang Y, Wang L, Xing Y. MicroRNA-190 alleviates neuronal damage and inhibits neuroinflammation via Nlrp3 in MPTP-induced Parkinson's disease mouse model // *J Cell Physiol.* – 2019. – Vol. 234, No. 12. P. 23379-23387.
45. Bogdanov V., Kim A., Nodel M., Pavlenko T., Pavlova E., Blokhin V., Chesnokova N., Ugrumov M. A Pilot Study of Changes in the Level of Catecholamines and the Activity of α -2-Macroglobulin in the Tear Fluid of Patients with Parkinson's Disease and Parkinsonian Mice // *International Journal of Molecular Sciences.* – 2021. – Vol. 22, No. 9. Art. no. 4736.

46. Блохин В.Е., Угрюмов М.В. Альфа-синуклеин в крови у мышей на нейротоксической модели болезни Паркинсона // Нейрохимия. 2021. Т. 38. № 1. С. 14-20. DOI: 10.31857/S1027813321010027. – R. - Blokhin V.E.1, Ugryumov M.V.1 Alpha-Synuclein in the Blood of Mice in a Neurotoxic Model of Parkinson's Disease//Neurochemical Journal. – 2021. – Vol. 15, No 1. P. 18-23.

47. Муртазина А.Р., Пронина Т.С., Чандрян К.И., Дильмухаметова Л.К., Бондаренко Н.С., Блохин В.Е., Богданов В.В., Угрюмов М.В. Гипотеза об эндокринной системе мозга: доказательства регулируемого поступления нейрогормонов из мозга в ликвор и обратно у крыс в неонатальном и препубертатном периодах онтогенеза // Онтогенез. – 2021. – Т. 52, № 6. С. 467-475.

48. Муртазина А. Р., Бондаренко Н. С., Пронина Т. С., Чандрян К. И., Богданов В. В., Дильмухаметова Л. К., Угрюмов М. В. Ликвор как гуморальная среда эндокринной системы мозга в онтогенезе // Acta Naturae. 2021. (принята в печать)

49. Kim A.R., Pavlova E.N., Blokhin V.E., Bogdanov V.V., Ugryumov M.V. A Monoiodotyrosine Challenge Test in a Parkinson's Disease Model // Acta Naturae. – 2021. 1 Vol. 13, No. 3. P. 106-109.

50. Kolacheva A.A., Ugryumov M.V. A Mouse Model of Nigrostriatal Dopaminergic Axonal Degeneration As a Tool for Testing Neuroprotectors // Acta Naturae. – 2021. –Vol 13. Is. 3. P. 110-113.

51. Gordeeva O.1, Safandeev V.1 15-Hydroxytryptophan (5-HTP)-induced intracellular syndrome in mouse non-neural embryonic cells is associated with inhibited proliferation and cell death // Neuropharmacology. – 2021. – Vol. 195. Art. No 107862.

ОТЧЕТНЫЕ ПУБЛИКАЦИИ

1. Гусев Е.И., **Блохин В.Е.**, Вартанов С.А., Мартынов М.Ю., Катунина Е.А., Алесенко А.В., Денисова И.А., **Павлова Е.Н.**, Полтерович В.М., Кучеряну В.Г., Шупик М.А., Нодель М.Р., Калинин А.Л., Соколов С.А., Чубарова Т.В., Шаклеина М.В., **Пронина Т.С.**, **Угрюмов М.В.** Разработка ранней диагностики болезни Паркинсона и комплексный экономический анализ эффекта от ее внедрения // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. – 2021. – Т. 121. Вып. 1. С. 9-20. DOI: 10.17116/jnevro20211210119. – Gusev E.I., **Blokhin V.E.**, Vartanov S.A., Martinov M.Y., Katunina E.A., Alesenko A.V., Denisova I.A., **Pavlova E.N.**, Polterovich, V.M.c Kucheryanu, V.G., Shupik M.A., Nodel M.R., h, Kalinkin A.L., Sokolov S.A., Chubarova T.V. Shakleina M.V., **Pronina T.S.**, **Ugrumov M.V.** Development of early diagnosis of Parkinson's disease and comprehensive economic analysis of the effect of its implementation // Zhurnal Nevrologii i Psihiatrii imeni S.S. Korsakova. – 2021. – Vol. 121. Is. 1. P. 9-20. DOI: 10.17116/jnevro20211210119. – S.

2. Алесенко А.В., **Блохин В.Е.**, Шупик М.А., Гутнер У.А., Лебедев А.Т., Малошицкая О.А., Соколов С.А., **Угрюмов М.В.** Изменение содержания сфинголипидов в nigrostriатной дофаминергической системе мозга у мышей на нейротоксической модели болезни паркинсона // Нейрохимия. – 2021. – Т. 38. № 2. С. 161-167. DOI: 10.31857/S1027813321020023. – R. - Alesenko A.V., **Blokhin V.E.**, Shupik M.A., Gutner U.A., Lebedev A.T., Maloshitskaya O.A., Sokolov S.A., **Ugrumov M.V.** Changes in the Content of Sphingolipids in the Nigrostriatal Dopaminergic System in the Brain of Mice with a Neurotoxic Model of Parkinson's Disease // Neurochemical Journal. – 2021. – Vol. 15. Is. 2. P. 175-180. DOI 10.1134/S1819712421020021. – Q4

3. Katargina L.A., Osipova N.A., Panova A.Y., **Bondarenko N.S.1**, **Nikishina Y.O.1**, **Murtazina A.R.1**, **Ugrumov M.V.1** Prognostic Value Estimation of Monoamines Systemic Level in Retinopathy of Prematurity in Experiment // Sovremennye Tehnologii v Medicine. – 2021. – Vol. 13, No. 3. P 41-44. – Q.

4. **Bogdanov V.**, **Kim A.1**, Nodel M., Pavlenko T., **Pavlova E.**, **Blokhin V.**, Chesnokova N., **Ugrumov M.** A Pilot Study of Changes in the Level of Catecholamines and the Activity of α -2-Macroglobulin in the Tear Fluid of Patients with Parkinson's Disease and Parkinsonian Mice // International Journal of Molecular Sciences. – 2021. – Vol. 22. Is. 9. Art. no. 4736. DOI: 10.3390/ijms22094736. – Q1.

5. **Блохин В.Е.**, **Угрюмов М.В.** Альфа-синуклеин в крови у мышей на нейротоксической модели болезни Паркинсона // Нейрохимия. – 2021. – Т. 38. № 1. С. 14-

20. DOI: 10.31857/S1027813321010027. – R. - **Blokhin V.E., Ugrumov M.V.** Alpha-Synuclein in the Blood of Mice in a Neurotoxic Model of Parkinson's Disease // *Neurochemical Journal*. – 2021. – Vol. 15. Is. 1. P. 18-23. DOI: 10.1134/S1819712421010025. – Q4

6. **Kim A.R., Pavlova E.N., Blokhin V.E., Bogdanov V.V., Ugrumov M.V.** A Monoiodotyrosine Challenge Test in a Parkinson's Disease Model // *Acta Naturae*. – 2021. – Vol. 13. Is. 3. P. 106-109. DOI: 10.32607/actanaturae.11399. – Q4.

7. **Kolacheva A.A., Ugrumov M.V.** A Mouse Model of Nigrostriatal Dopaminergic Axonal Degeneration As a Tool for Testing Neuroprotectors // *Acta Naturae*. – 2021. – Vol. 13. Is. 3. P. 110-113. DOI: 10.32607/actanaturae.11433. – Q4.

8. **Муртазина А.Р.1, Пронина Т.С.1, Чандран К.И.1, Дильмухаметова Л.К.1, Бондаренко Н.С.1, Блохин В.Е.1, Богданов В.В.1, Угрюмов М.В.1** Гипотеза об эндокринной системе мозга: доказательства регулируемого поступления нейрогормонов из мозга в ликвор и обратно у крыс в неонатальном и препубертатном периодах онтогенеза//*Онтогенез*. 2021. Т. 52. Т. 6. С. 467-475. DOI: 10.31857/S0475145021060094. – R. – **Murtazina A.R.1, Pronina T.S.1, Chandran K.I.1, Dilmukhametova L.K.1, Bondarenko N.S.1, Bogdanov V.V.1, Blohin V.V.1, Ugrumov M.V.1** Hypothesis on the Endocrine System of the Brain: Evidence for the Regulated Delivery of Neurohormones from the Brain to the Cerebrospinal Fluid and Vice Versa in Neonatal and Prepubertal Periods of Ontogenesis//*Russian Journal of Developmental Biology*. 2021. Vol. 52. No. 6. P. 424–431. DOI: 10.1134/S1062360421060096. – Q4

9. **Gordeeva O., Safandeev V.** 15-Hydroxytryptophan (5-HTP)-induced intracellular syndrome in mouse non-neural embryonic cells is associated with inhibited proliferation and cell death // *Neuropharmacology*. – 2021. – Vol. 195. Art. No 107862. DOI: 10.1016/j.neuropharm.2019.107862. – Q1

Отчет утвержден Ученым советом ИБР РАН 28 декабря 2021 г. протокол № 14.