

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В. ЛОМОНОСОВА
БИОЛОГИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ

На правах рукописи

Тимошина Юлия Анатольевна

РОЛЬ НА_A,К-АТФАЗЫ В ПОВЕДЕНЧЕСКИХ НАРУШЕНИЯХ У МЫШЕЙ,
ИНДУЦИРОВАННЫХ УАБАИНОМ, МАРГАНЦЕМ И МФП

Специальность 1.5.24. Нейробиология

ДИССЕРТАЦИЯ
на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
Латанов Александр Васильевич,
доктор биологических наук, профессор

Москва – 2025

ОГЛАВЛЕНИЕ

1. ВВЕДЕНИЕ.....	8
2. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	17
2.1. Общая характеристика Na,K-АТФазы.....	17
2.1.1. Молекулярная структура фермента. Дифференцировка субъединиц. Механизм реализации насосной функции	17
2.1.2. Кардиотонические стероиды	20
2.1.3. Способы регуляции функционирования Na,K-АТФазы	21
2.1.4. Роль Na,K-АТФазы в неврологических заболеваниях	23
2.1.5. Генетические модели животных с мутациями в гене ATP1A3	27
2.2. Марганец как модулятор работы Na,K-АТФазы в ЦНС	29
2.2.1. Функции марганца в норме	29
2.2.2. Марганцевая нейротоксичность	30
2.2.3. Способы проникновения и выведения марганца в ЦНС	32
2.2.4. Влияние марганца на Na,K-АТФазу	35
2.3. Этиология и патогенез болезни Паркинсона.....	35
2.4. Участие Na,K-АТФазы в патогенезе болезни Паркинсона	38
3. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	41
3.1. Изучение эффектов ингибиции Na,K-АТФазы уабаином в экспериментах in vitro и in vivo.....	41

<i>3.1.1. Изучение механизмов влияния ингибитора Na,K-АТФазы уабаина на жизнеспособность культуры клеток нейробластомы человека SH-SY5Y</i>	41
<i>3.1.2. Моделирование двигательных нарушений у мышьей линии C57Bl/6 путем внутрижелудочкового введения ингибитора Na,K-АТФазы уабаина</i>	44
3.2. Изучение механизмов влияния марганца на поведение животных.....	45
<i>3.2.1. Моделирование двигательных и когнитивных нарушений у мышьей линии C57Bl/6, вызванных потреблением хлорида марганца с питьевой водой</i>	45
3.3. Изучение функционирования Na,K-АТФазы на ранних этапах развития токсин-индуцированного паркинсонизма	47
<i>3.3.1. Моделирование досимптоматической стадии паркинсонизма у мышьей линии C57Bl/6 введением низких доз токсина МФТП.....</i>	47
3.4. Методы работы с клеточными культурами	48
<i>3.4.1. Ведение культуры и дифференцировка клеток по дофаминергическому типу</i>	48
<i>3.4.2. Оценка жизнеспособности клеток по MTT-тесту.....</i>	48
3.5. Инвазивные методы	49
<i>3.5.1. Стереотаксическая установка хронических канюль</i>	49
<i>3.5.2. Внутрижелудочковое введение веществ</i>	49
3.6. Методы поведенческого тестирования.....	50
<i>3.6.1. «Открытое поле»</i>	50
<i>3.6.2. «Сужающаяся дорожка»/ «Приподнятая планка»</i>	50

3.6.3. «Наклонная решетка»/ «Наклонная лесенка»	51
3.6.4. «Степпинг-тест»	51
3.6.5. «Y-образный лабиринт».....	51
3.6.6. «Пищедобывающее поведение в челночной камере».....	52
3.7. Аналитические методы.....	52
3.7.1 <i>Вестерн-блотт</i>	53
3.7.2. <i>Иммуногистохимия</i>	55
3.7.3. <i>Определение активности Na,K-АТФазы</i>	55
3.7.4. <i>Высокоэффективная жидкостная хроматография с электрохимическим детектированием (ВЭЖХ-ЭД)</i>	56
3.7.5. <i>Масс-спектрометрия с индуктивно связанный плазмой (МС-ИСП) и Атомно-эмиссионная спектрометрия с индуктивно связанный плазмой (АЭС- ИСП)</i>	57
3.8. Статистическая обработка данных	59
4. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	60
4.1. Механизмы влияния ингибиторной функции кардиотонического стероида убаина на функционирование Na,K-АТФазы в культуре клеток нейробластомы человека SH-SY5Y	60
4.1.1. <i>Дозозависимое влияние убаина на жизнеспособность недифференцированной и дифференцированной по дофаминергическому типу культуры нейробластомы человека SH-SY5Y</i>	60

<i>4.1.2. Исследование вклада дофаминовых D2-рецепторов и AMPA и кайнатных глутаматных рецепторов в реализацию токсического эффекта уабаина на недифференцированную и дифференцированную культуру нейробластомы человека SH-SY5Y</i>	62
<i>4.1.3. Исследование вклада протеинкиназы С и пути MEK/ERK в реализацию токсического эффекта уабаина на недифференцированную и дифференцированную культуру нейробластомы человека SH-SY5Y.....</i>	65
<i>4.1.4. Влияние уабаина на содержание дофамина в недифференцированной и дифференцированной культуре нейробластомы SH-SY5Y</i>	69
<i>4.1.5. Влияние уабаина на количество про- и анти-апоптотических белков в недифференцированной культуре нейробластомы SH-SY5Y.....</i>	72
4.2. Влияние уабаина на двигательные функции и нейрохимические характеристики в мозге мышей линии C57Bl/6	76
<i>4.2.1. Влияние однократного и четырехкратного введения уабаина на двигательные функции мышей линии C57Bl/6</i>	77
<i>4.2.2. Влияние уабаина на ферментативную активность Na,K-АТФазы в мозге мышей линии C57Bl/6</i>	82
<i>4.2.3. Влияние уабаина на активацию внутриклеточных сигнальных киназ и количество белков в стриатуме мышей линии C57Bl/6</i>	84
4.3. Влияние марганца на поведение, двигательные функции и нейрохимические характеристики в мозге мышей линии C57Bl/6	90
<i>4.3.1. Влияние хронического потребления хлорида марганца на массу тела животных, потребление пищи и воды.....</i>	91

<i>4.3.2. Оценка обучаемости животных в пищедобывающей задаче в «Челночной камере» при хроническом потреблении хлорида марганца</i>	93
<i>4.3.3. Оценка двигательных функций мышей при хроническом потреблении хлорида марганца</i>	94
<i>4.3.4. Накопление марганца, калия и натрия в структурах головного мозга мышей в результате его длительного приема с питьевой водой</i>	97
<i>4.3.5. Экспрессия изоформ Na,K-АТФазы в стриатуме и мозжечке мышей при хроническом потреблении хлорида марганца</i>	99
<i>4.3.6. Активность Na,K-АТФазы в мозжечке в мышь при хроническом потреблении хлорида марганца</i>	100
<i>4.3.7. Содержание катехоламинов в стриатуме мышей при хроническом потреблении хлорида марганца</i>	101
<i>4.3.8. Активацию внутриклеточных сигнальных каскадов и количество белков в стриатуме мышей при хроническом потреблении хлорида марганца</i>	102
<i>4.4. Оценка поведенческих и нейрохимических характеристик в модели премоторной стадии паркинсонизма у мышей линии C57Bl/6, вызванной хроническим введением низкой дозы токсина МФТП</i>	108
<i>4.4.1. Оценка наличия моторных и немоторных нарушений у мышей при хроническом введении МФТП</i>	109
<i>4.4.2. Содержание дофамина и его метаболитов в стриатуме и префронтальной коре головного мозга мышей, получавших МФТП</i>	112
<i>4.4.3. Активность Na, K-АТФазы в среднем мозге и мозжечке мышей, получавших МФТП</i>	113

<i>4.4.4. Оценка содержания тирозингидроксилазы в стриатуме и компактной части черной субстанции мозга мышей, получавших МФТП</i>	114
<i>4.4.5. Оценка содержания супероксиддисмутазы и цитохромоксидазы (изоформа 1) в компактной части черной субстанции мозга мышей, получавших МФТП.....</i>	116
5. ЗАКЛЮЧЕНИЕ	121
6. ВЫВОДЫ	133
7. СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	134
8. СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	138

1. ВВЕДЕНИЕ

Актуальность и степень разработанности темы

Рост распространенности нейродегенеративных заболеваний в мире, обусловленный демографическими изменениями (старением населения) и усложнением значимых патогенетических факторов, остро ставит задачу исследования их молекулярных основ и разработки эффективных стратегий профилактики и лечения.

В последние годы появляется большое количество исследований, свидетельствующих об участии Na,K -АТФазы в патогенезе нейродегенеративных заболеваний, в частности болезни Паркинсона (БП).

Na,K -АТФаза – фермент, экспрессирующийся во всех клетках организма и отвечающий за АТФ-зависимый трансмембранный ко-транспорт ионов Na^+ из клетки и ионов K^+ в клетку [Skou, 1992]. Na,K -АТФаза состоит из двух основных субъединиц, каждая из которых имеет несколько тканеспецифичных изоформ. Так, в головном мозге экспрессируется универсальная $\alpha 1$ -субъединица, характерная для астроцитов $\alpha 2$ -субъединица и нейронспецичная $\alpha 3$ -субъединица [Benarroch, 2011]. Кроме своей основной функции по поддержанию электрохимического градиента, Na,K -АТФаза участвует в регуляции работы мембранных рецепторов за счет белок-белковых взаимодействий. В настоящее время установлено взаимодействие этого фермента с глутаматными NMDA- [Akkuratov, 2015; Pivovarov, 2018] и AMPA-рецепторами [Zhang, 2009], дофаминовым D1-рецептором [Zhang, 2013], переносчиками глицина (GlyT2) [de Juan-Sanz, 2013] и глутамата (GLAST и GLT-1) [Rose, 2009] и аквапорином AQP4 [Illarionova, 2010].

Среди применяемых в клинике кардиотонических стероидов (КТС) большинство принадлежит к фармакологической группе специфических ингибиторов Na,K -АТФазы [Лопачева, 2018]. Известно, что в микромолярных концентрациях КТС ингибируют Na,K -АТФазу, обратимо связываясь с насосной α -субъединицей, а в наномолярных – повышают её активность [Тверской, 2016].

Связывание с КТС приводит к изменению конформации Na,K-АТФазы, что, в свою очередь, изменяет характер белковых взаимодействий и запускает активацию внутриклеточных каскадов. КТС уабаин при связывании с Na,K-АТФазой запускает систему митоген-активируемых протеинкиназ, вызывая активацию ERK1/2 киназы и апоптоз нейронов [Karpova, 2010]. Также известно, что уабаин может ингибировать окислительное фосфорилирование митохондрий, действуя через AMPK [Zhang, 2009]. Однако имеющиеся данные об участии КТС в работе Na,K-АТФазы в основном получены в экспериментах *in vitro*, в то время как о влиянии КТС на физиологические и патофизиологические процессы нервной системы целого организма известно мало.

Свойства Na,K-АТФазы определяют её значимость в поддержании нормального функционирования нервной ткани. Было показано, что фармакологическое ингибирование фермента [El-Mallakh, 2003; Kurauchi, 2019], а также мутации в $\alpha 3$ -субъединице приводят к возникновению у лабораторных животных мания-подобного поведения [Kirshenbaum, 2011; Clapcote, 2009], а у пациентов с биполярным расстройством, в свою очередь, снижается активность Na,K-АТФазы [El-Mallakh, 2021]. Кроме того, аутосомно-доминантные мутации в $\alpha 3$ -субъединице вызывают тяжелые неврологические расстройства, а именно быстроразвивающуюся дистонию-паркинсонизм (Rapid-onset dystonia parkinsonism, БРДП) и альтернирующую гемиплегию детства (Alternating Hemiplegia of Childhood, АГД) [Li, 2022; Zhang, 2022; Arystarkhova, 2019]. В свою очередь, при БП происходит образование внутриклеточных кластеров а-сингулеина с $\alpha 3$ -субъединицей, приводящее к инактивации последней и формированию мембранных областей с пониженным содержанием Na,K-АТФазы [Shrivastava, 2015]. Токсические аддукты хино-протеинов, образующиеся вследствие автоокисления цитоплазматического дофамина, дозозависимо инактивируют Na,K-АТФазу, что также может способствовать гибели дофаминергических нейронов при развитии БП [Khan, 2003]. У пациентов с диагнозом БП обнаруживается снижение активности $\alpha 3$ -субъединицы Na,K-

АТФазы в эритроцитах [Kumar, 2002]. Вместе с этим в моделях паркинсоноподобных состояний у животных сообщается о значительном снижении активности данного фермента. В свою очередь мутации в $\alpha 1$ -субъединице Na,K-АТФазы, вызывающие снижение её активности [Plesanmi, 2019; Anusha, 2017], усугубляют действие токсических агентов в моделях БП [Cao, 2021]. Более того, стабилизация данного фермента при помощи моноклонального антитела DR5-12D обладает нейропротекторным эффектом в модели α -синуклеин индуцированного паркинсонизма [Cao, 2021].

Известно, что Mn-индуцированное гиперметилирование промотора гена ATP1A3 и эпигенетическое выключение генов нарушают гиппокампальный нейрогенез у потомства мышей, подвергшихся воздействию Mn во время беременности [Wang, 2013]. Кроме этого, вызываемый марганцем окислительный стресс может быть причиной подавления активности $\alpha 3$ -субъединицы в мозге [Petrushanko, 2007]. Прогрессирование моторной дисфункции при манганизме, состоянии, вызванном повышением уровня Mn в тканях выше физиологических значений [Cawte, 1985], хорошо коррелирует с накоплением Mn и дегенерацией нейронов в центрах экстрапирамидного контроля движений. Интересно, что многие неврологические симптомы манганизма тесно перекликаются с симптомами, развивающимися у людей с гаплонедостаточностью по гену, кодирующему $\alpha 3$ -субъединицу Na,K-АТФазы [Arystarkhova, 2019; Böttger, 2016]. Для данных состояний характерна высокая распространенность непроизвольных агонистических/антагонистических мышечных сокращений, брадикинезия, атаксическая походка, гипомимия и дизартрия. Важным отличием данных состояний от БП является то, что симптомы паркинсонизма как при манганизме, так при БРДП и АГД, не корректируются применением леводопы и глубинной стимуляцией мозга (DBS) [Cersosimo, 2006]. Наконец, почти все центры мозга, вовлеченные в экстрапирамидный двигательный контроль, характеризуются высоким содержанием $\alpha 3$ -экспрессирующих нейронов [Dobretsov, 2005].

Все это позволяет предположить, что некоторые из двигательных симптомов манганизма могут быть следствием снижения экспрессии или активности а3-субъединицы Na,K-АТФазы в мозге людей, подвергшихся воздействию Mn, а пациенты с манганизмом, БРДП и АГД могут иметь сходные механизмы развития двигательной дисфункции. Однако систематические исследования функционирования а3-субъединицы Na,K-АТФазы в экспериментальных моделях манганизма до настоящего времени не проводились.

Изучение влияния прямого ингибиования Na,K-АТФазы уабаином позволит проанализировать связь дисфункции данного фермента с развитием двигательных нарушений у животных. В свою очередь в экспериментальных моделях манганизма и паркинсонизма возможно оценить корреляцию тяжести двигательных нарушений с активностью Na,K-АТФазы.

Таким образом, оценка негативных эффектов веществ, имеющих клиническое значение, может способствовать пониманию механизмов экстрапирамидных расстройств и выявлению новых мишеней их фармакологической коррекции.

Цель и задачи работы

Цель: охарактеризовать механизмы модуляции активности Na,K-АТФазы при действии уабаина, марганца и нейротоксина МФТП (1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридин) в культуре клеток и мозге мышей.

Задачи:

1. Изучить нейрохимические механизмы токсичности ингибитора Na,K-АТФазы уабаина на культуре клеток нейробластомы человека SH-SY5Y недифференцированной и дифференцированной по дофаминергическому типу.
2. Исследовать возможную связь между поведенческими эффектами однократного и многократного внутрижелудочкового введения уабаина мышам линии C57Bl/6 (локомоторную активность животных, стереотипию двигательной активности и координацию движений) и изменениями биохимических параметров структур мозга, вовлеченных в контроль локомоторной активности (экспрессию

изоформ α -субъединицы и активность Na,K-АТФазы и дофаминзависимых сигнальных каскадов).

3. Исследовать возможную связь между поведенческими эффектами хронического потребления марганца мышами линии C57Bl/6 (двигательные функции, способность к обучению в пищедобывающей задаче в челночной камере) и изменениями биохимических параметров структур мозга, вовлеченных в контроль локомоторной активности (экспрессию изоформ α -субъединицы и активность Na,K-АТФазы, активность дофаминзависимых сигнальных каскадов, содержание катехоламинов).

4. Описать поведенческие (двигательные функции и пространственную память) и биохимические (активность Na,K-АТФазы, содержание катехоламинов, тирозингидроксилазы, супероксиддисмутазы, цитохромоксидазы) характеристики модели премоторной стадии паркинсонизма у мышей линии C57Bl/6, вызванной хроническим введением низкой дозы токсина МФТП.

Научная новизна работы

В настоящей работе впервые было показано различие токсических концентраций уабаина при действии на недифференцированную и дифференцированную по дофаминергическому типу культуру нейробластомы человека SH-SY5Y. С использованием анализа ингибиторных эффектов было исследовано участие глутаматных ионотропных рецепторов, дофаминовых D2-рецепторов, протеинкиназы С и киназы ERK1/2, а также проапоптотических и антиапоптотических белков в реализации нейротоксичности уабаина.

Впервые было проведено многократное внутрижелудочковое введение уабаина в нетоксической концентрации мышам с последующей оценкой их двигательной активности и неврологической симптоматики, проведено сравнение эффектов однократного и многократного введения уабаина. Проанализировано влияние многократного введения уабаина на активацию киназ Akt и ERK1/2, соотношения про-(Bax, Bak) и антиапоптотических (Bcl-2, Bcl-xL) белков, а также количества $\alpha 1$ - и $\alpha 3$ -изоформ α -субъединицы Na,K-АТФазы.

В модели хронического потребления мышами хлорида марганца (II) с питьевой водой впервые проведена оценка динамики изменения активности и содержания субъединиц Na,K -АТФазы при накоплении ионов марганца. Также проанализирована динамика развития моторных нарушений и влияние ионов Mn на активацию киназ Akt и ERK1/2, содержание белков-регуляторов апоптоза (Bax, Bak, Bcl-2, Bcl-xL).

В новой разработанной модели премоторной стадии МФТП-индуцированного паркинсонизма при хроническом введении низкой дозы токсина было продемонстрировано отсутствие дисфункции Na,K -АТФазы на ранних этапах развития паркинсоноподобного состояния на фоне понижения содержания дофамина и дегенерации нейронов компактной части черной субстанции (кЧС).

Теоретическая и практическая значимость работы

Изучение особенностей функционирования Na,K -АТФазы в моделях паркинсоноподобных состояний, вызванных хроническим потреблением марганца или МФТП, а также разработка модели паркинсоноподобного состояния при длительном ингибировании нейрональной Na,K -АТФазы убацином, позволяет расширить наше понимание о роли данного фермента в патофизиологических процессах мозга. В настоящее время известно, что неврологические расстройства могут быть вызваны мутациями в гене ATP1A3, кодирующем $\alpha 3$ -субъединицу Na,K -АТФазы. На сегодняшний день ATP1A3 является единственным известным геном, мутации в котором обнаруживаются при БРДП и АГД. При этом данные заболевания тяжело поддаются фармакологической и хирургической коррекции, не восприимчивы к классической противопаркинсонической терапии. Вместе с этим имеется мало данных о влиянии функциональной недостаточности фермента на развитие паркинсоноподобных состояний. Дальнейшее изучение изменений в функционировании Na,K -АТФазы в целом, модуляции её работы экзогенными факторами и эндогенными КТС, а также механизмов взаимодействия Na,K -АТФазы с дофаминергической системой в различных моделях на

физиологическом и нейрохимическом уровнях может открыть потенциально новые фармакологические мишени в лечении паркинсонизма.

Методология и методы исследования

Для решения поставленных в работе задач использовалось несколько методических подходов. Исследования *in vitro* проводили на культуре клеток нейробластомы человека SH-SY5Y, дифференцированной по дофаминергическому типу. Жизнеспособность клеток культуры определяли по МТТ-тесту. При оценке наличия двигательных нарушений в экспериментах *in vivo* использовали стандартные методики поведенческого тестирования, направленные на оценку локомоции, координации, когнитивных задач. Уровень катехол-, индоламинов и их метаболитов в структурах мозга и лизатах клеток культуры определяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с электрохимической детекцией (ВЭЖХ/ЭД). Содержание ионов марганца, натрия и калия в гомогенатах мозга определяли методом масс-спектрометрии с индуктивно связанный плазмой (МС-ИПС) и атомно-эмиссионной спектрометрии с индуктивно связанный плазмой (АЭС-ИСП). Анализ содержания субъединиц Na,K-АТФазы, сигнальных молекул и белков-регуляторов апоптоза проводили методом Вестерн-блотт. Активность Na,K-АТФазы определяли по количеству выделяющегося в ходе реакции неорганического фосфата по методу Rathbun and Betlach.

Положения, выносимые на защиту

1. Ингибиование Na,K-АТФазы головного мозга кардиотоническим стероидом уабаином приводит к гиперлокомоции и нарушению координации у животных.
2. Двигательные нарушения, вызванные длительным введением марганца и МФТП, не связаны с ингибирированием насосной функции Na,K-АТФазы головного мозга.
3. Двигательные нарушения, вызванные длительным введением уабаина и марганца, опосредованы деактивацией киназы Akt и активацией киназы ERK1/2, соответственно.

Степень достоверности данных

Представленные в работе данные получены с использованием современных общепринятых экспериментальных методик, результаты, представленные в работе, статистически достоверны и воспроизводимы. Обзор литературы и обсуждение подготовлены с использованием актуальной тематической литературы.

Публикации

По результатам работы опубликовано 7 статей в журналах, индексируемых в аналитических базах SCOPUS, Web of Science, RSCI и входящих в Ядро РИНЦ.

Апробация результатов

Результаты данной диссертационной работы были представлены на следующих всероссийских и международных конференциях: Студенческий биохимический форум–2020: II межвузовская студенческая конференция (Москва, Россия, 09-10 февраля 2020 г.); 33rd ECNP Congress – Vienna 2020 (Вена, Австрия, ноябрь 2020г.); VI ежегодная конференция ИТБМ СПбГУ «Актуальные проблемы трансляционной биомедицины – 2022» (Санкт-Петербург, Россия, 25-26 июля 2022 г.); XXIV съезд Физиологического Общества им. И.П. Павлова (Санкт-Петербург, Россия, 11-15 сентября 2023 г.); 3rd Congress of International Society for Clinical Physiology&Pathology (ISCPP2025) (Москва, Россия, 12-14 мая 2025 г.).

Апробация диссертации прошла на заседании кафедры высшей нервной деятельности МГУ имени М.В. Ломоносова 21 октября 2025 г.

Личный вклад автора

Соискатель лично принимал участие в разработке направления исследования, формулировании гипотез и концепции исследования. Соискатель лично осуществлял все этапы диссертационной работы: планирование экспериментов, адаптацию методик, работу с культурой клеток, выполнение стереотаксических манипуляций и проведение поведенческого тестирования, изготовление тканевых образцов, проведение биохимических, молекулярно-биологических и иммуногистохимических анализов, анализ данных, статистическую обработку и обобщение результатов, написание статей и тезисов,

представление результатов работы на российских и международных конференциях.

Структура работы

Материалы диссертации изложены на 172 страницах. Работа состоит из обзора литературы по теме, описания материалов и методов, использованных при выполнении данной работы, описания результатов и их обсуждения, заключения и выводов. Диссертационная работа проиллюстрирована 41 рисунком и 1 таблицей. Список использованной литературы включает 281 источник.

2. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

2.1. Общая характеристика Na,K-АТФазы

2.1.1. Молекулярная структура фермента. Дифференцировка субъединиц. Механизм реализации насосной функции

Na,K-АТФаза – представляет собой белковый комплекс, обеспечивающий активный транспорт ионов Na^+ и K^+ через плазматическую мембрану за счет гидролиза концевой фосфатной связи АТФ [Skou, 1992; Kaplan, 2002].

Функциональный комплекс Na,K-АТФазы состоит из трех субъединиц: α -субъединицы, β -субъединицы и субъединицы FXYD.

α -субъединица состоит примерно из 1000 аминокислотных остатков с молекулярной массой около 110 кДа. Собственно насос образован 10 трансмембранными спиралами (TM1-TM10), в которых локализованы участки связывания Na^+ , K^+ и АТФ. α -субъединица имеет три цитоплазматических домена: домен, связывающий нуклеотиды (N-домен), домен фосфорилирования (P-домен) и домен активации или актуаторный домен (A-домен) [Tidow, 2010].

β -субъединица состоит примерно из 370 аминокислотных остатков с молекулярной массой около 55 кДа. β -субъединица состоит из 1 трансмембранной спирали, небольшого N-концевого цитозольного хвоста (30 остатков) и большого C-концевого внеклеточного домена (около 240 остатков), имеющего 3 консенсусные последовательности N-гликозилирования (NXS или NXT) [Kaplan, 2002; Toyoshima, 2011]. Сильно гликозилированная β -субъединица облегчает зажоревание α -субъединицы в мембране, а также модулирует работу транспортера за счет повышения сродства к ионам калия [Toyoshima, 2011].

Белки FXYD состоят из единственной трансмембранной спирали с внеклеточной N-концевой областью, содержащей мотив FXYD(Y), и цитоплазматической C-концевой частью. FXYD-субъединица регулирует активность фермента, регулируя кажущееся сродство Na^+ , K^+ и АТФ специфичным для ткани и изоформы образом [Garty, 2006]. Структурные

исследования показывают, что мотив FXYD(Y), стабилизирует взаимодействие $\alpha/\beta/FXYD$ [Toyoshima, 2011; Shinoda, 2009].

У высших позвоночных присутствуют 4-изоформы α -субъединицы ($\alpha 1-4$), 3-изоформы β -субъединицы ($\beta 1-3$) и 7-изоформы субъединицы FXYD. $\alpha 1$ -субъединица является основной формой и экспрессируется в большинстве тканей, включая клетки головного мозга (как нейроны, так и глиальные клетки). В нервной системе помимо $\alpha 1$ экспрессируются $\alpha 3$ -субъединица в нейронах и $\alpha 2$ -субъединица в астроцитах и олигодендроцитах [Peng, 1998]. Все три изоформы регуляторной β -субъединицы обнаружены в головном мозге, наиболее распространены $\beta 1$ - и $\beta 2$ -субъединицы [Li, 2015]. Среди субъединиц FXYD в головном мозге присутствуют белки FXYD1, FXYD6 и FXYD7 [Garty, 2006].

Согласно оценке кинетики связывания ионов натрия α -субъединица обладает сродством к Na^+ в порядке $\alpha 1 > \alpha 2 > \alpha 3$ [Crambert, 2000; Munzer, 1994]. Нейрональная $\alpha 3$ -субъединица обеспечивает значительное кратковременное увеличение внутриклеточного содержания Na^+ при высокой активности нейронов и быстрое восстановление мембранныго потенциала покоя [Azarias, 2013]. Высокое сродство к АТФ позволяет $\alpha 3$ -субъединице использовать низкие концентрации вблизи клеточной мембраны после интенсивной нейрональной активности [Blanco, 1998]. Напротив, нейрональная $\alpha 1$ -субъединица играет важную роль в поддержании базального внутриклеточного уровня Na^+ [Azarias, 2013].

В головном мозге отмечается неоднородное распределение $\alpha 3$ -субъединицы Na,K -АТФазы. В целом, клетки, обладающие высокой метаболической активностью, требуют повышенного содержания $\alpha 3$ -субъединицы. Так, высокая экспрессия наблюдается в стриатуме, бледном шаре, субталамическом ядре, ретикулярной части черной субстанции [Lowry, 2020], в ГАМК-ergicических интернейронах и глутаматергических пирамидных нейронах гиппокампа [Kann, 2014]. Вместе с этим экспрессия $\alpha 3$ -изоформы в дофаминергических нейронах черной субстанции понижена. На основании обнаруженного распределения

считается, что $\alpha 3$ -субъединица не играет прямой роли в функционировании дофаминергических нейронов среднего мозга, а скорее косвенно регулирует их ГАМК-ergicический вход [Böttger, 2011]. Другими областями с высоким содержанием $\alpha 3$ -субъединицы являются красное ядро, ретикулотегментальное ядро моста, таламические ядра и клетки Пуркинье мозжечка [Peng, 1997].

При помощи Na,K-АТФазы реализуется трансмембранный перенос Na^+ и K^+ против их градиента концентрации за счет гидролиза связи АТФ. Для осуществления такого типа переноса поочередно меняется конформация Na,K-АТФазы: E1-конформация фермента с высоким сродством к Na^+ и E2-конформация с высоким сродством к K^+ . Вместе с этим необходимо, чтобы сайт связывания с ионами имел возможность попаременного открытия относительно клеточной мембраны, причем одна из сторон должна быть закрыта для невозможности тока ионов в соответствии с градиентом концентрации [Kaplan, 2002; Clarke, 2011].

В состоянии, когда Na,K-АТФаза открыта во внутриклеточное пространство, TM1 поднимается и обеспечивает доступ Na^+ к высокоаффинным связывающим сайтам, содержащим отрицательный заряд на остатках аспартата и глутамата, в середине мембраны. При связывании с Na^+ Р-домен фосфорилируется АТФ и насос становится стабилизирован в конформации E1Р. Переход от E1Р состояния к E2Р связан с высвобождением АДФ и переносом трех ионов Na^+ во внеклеточное пространство. В конформационном состоянии E2 Na,K-АТФаза обладает высоким сродством к ионам K^+ . В таком состоянии фермент связывает два иона K^+ с внеклеточной стороны и происходит дефосфорилирование Р-домена. После связывания АТФ и перехода Na,K-АТФазы обратно в форму E1 происходит высвобождение ионов K^+ во внутриклеточное пространство [Kaplan, 2002; Clarke, 2011].

Ускорение перехода E1 в E2 происходит при наличии в реакционной среде ионов Mg^{2+} . В свою очередь переход из E2 в E1 ускоряется при увеличении pH среды до щелочных значений и в содержании АТФ больше 0,5 mM [Kaplan, 2002].

2.1.2. Кардиотонические стероиды

Кардиотонические стероиды (КТС) – группа соединений способных обратимо ингибировать Na,K-АТФазу в состоянии Е2Р [Лопачева, 2018]. По своей структуре КТС являются производными циклопентанпергидрофенантрена и содержат в 17 положении насыщенное лактоновое кольцо. По структуре лактонового кольца КТС подразделяются на кардиенолиды (убаин и дигоксин) и буфадиенолиды (буфалин, маринобуфагенин), для первых характерно наличие 5-членного кольца, для вторых – 6-членного. Кроме этого, КТС могут быть гликозилированы по 3-му положению [Laursen, 2015]. На основании изучения кристаллических структур Na,K-АТФазы и КТС известно, что лактоновое кольцо обеспечивает связывание с ферментом [Schonfeld, 1985], а гликозилирование по третьему положению влияет на глубину погружения КТС в сайт связывания [Laursen, 2015]. Специфический сайт связывания КТС формируется внеклеточной областью между доменами ТМ1-ТМ2, ТМ5-ТМ6, ТМ7-ТМ8 [Ogawa, 2009; Laursen, 2013].

На сегодняшний день, благодаря использованию масс-спектрометрического анализа, накоплено достаточно данных, которые позволяют рассматривать КТС как эндогенные гормоноподобные соединения у млекопитающих, включая человека. В плазме крови человека был обнаружен эндогенный убаин [Hamlyn, 1991], и была показана его роль в развитии различных заболеваний, включая артериальную гипертензию [Hamlyn, 1991; Hamlyn, 1982]. Было выявлено присутствие маринобуфагенина в крови человека [Komiyama, 2005]. Кроме того, эндогенные КТС были выделены из надпочечников [Schneider, 1998] и гипоталамуса крупного рогатого скота [Tumiak, 1993]. Предполагается, что эндогенный убаин может вырабатываться в головном мозге и надпочечниках млекопитающих. Таким образом, в дополнение к своей роли в поддержании мембранных потенциала покоя, Na,K-АТФаза рассматривается как рецептор КТС, которые могут индуцировать изменения во внутриклеточной передаче сигналов при связывании с ферментом.

Однако в настоящее время нет полного понимания физиологической роли КТС в работе центральной нервной системы (ЦНС). Также практически отсутствуют знания о путях их биосинтеза в головном мозге и их регуляции.

На ЦНС также могут влиять и поступающие в организм КТС: использование дигоксина для лечения пациентов с сердечной недостаточностью может привести к широкому спектру психиатрических побочных эффектов, таких как депрессия и психоз [Keller, 2003]. В различных экспериментальных моделях было показано, что ингибирование $\alpha 3$ -субъединицы в нейронах приводит к неспособности быстро восстановить градиент Na^+ и обеспечить генерацию потенциала действия [Azarias, 2013]. Также известно, что убацин вызывает повышенное высвобождение и снижение скорости обратного захвата ГАМК [Santos, 1990]. Кроме этого, связываясь с Na,K -АТФазой, КТС могут влиять на работу мембранных и цитоплазматических белков, с которыми она взаимодействует, и активировать внутриклеточные сигнальные каскады [Cui, 2017]. Однако в настоящее время нет полной картины участия КТС в физиологических и патофизиологических процессах в ЦНС.

2.1.3. Способы регуляции функционирования Na,K -АТФазы

Факторы, влияющие на работу Na,K -АТФазы могут быть разделены на неспецифические и специфические.

К неспецифическим факторам, повышающим активность фермента, относятся фосфорилирование проинкиназой С (ПК С) [Cortes, 2011] и протеинкиназой А (ПК А) [Vinciguerra, 2005], повышенные внутриклеточные концентрации Na^+ или внеклеточного K^+ [Webb, 1995; Berret, 2014]. В свою очередь окислительный стресс (ОС) [Zhang, 2008], гипоксия [Helenius, 2010], низкий уровень АТФ [Sweadner, 1985], воздействие окисленного глутатиона [Petrushanko, 2012] и взаимодействие с неправильно свернутыми белковыми агрегатами (тау-белок [Shrivastava, 2019], α -синуклеин [Shrivastava, 2015], β -амилоид [Petrushanko, 2016]) снижают активность Na,K -АТФазы.

Специфический способ регуляции осуществляется посредством связывания КТС с Na,K-АТФазой. КТС могут оказывать разнонаправленное действие: концентрации ниже 10 нМ могут индуцировать повышение активности фермента, в то время как концентрации выше 10 нМ ингибируют его [Therien, 2000; Holthouser, 2010].

Кроме этого, посредством связывания с E2Р-конформацией [Kanai, 2021] различные КТС могут приводить к активации различных внутриклеточных сигнальных путей, основным из которых является активация Src киназы с последующим запуском пути митоген-активируемых протеинкиназ (МАРК) с участием Raf (MAP3K), МЕК (MAP2K), и p42/p44 MAPK (ERK1/2). Src также может активировать передачу сигнала через фосфолипазу С γ (PLC γ). PLC γ гидролизует фосфатидилинозитол-4,5-дифосфат (PIP2) с образованием 1,2-диацилглицерида (ДАГ) и инозитол-1,4,5-трифосфата (IP3), который активирует собственные рецепторы (IP3R) на эндоплазматическом ретикулуме и обеспечивает выход Ca $^{2+}$ во внутриклеточное пространство [Pierre, 2006; Reinhard, 2013; Пенниайнен, 2016]. Было показано, что колебания Ca $^{2+}$, вызванные низкой концентрацией уабаина, способствуют росту дендритов в эмбриональной культуре первичных кортикальных нейронов [Desfrere, 2009] и улучшают долговременную пространственную память у крыс при введении в гиппокамп [Orellana, 2018]. В свою очередь в концентрациях, которые ингибируют Na,K-АТФазу, КТС замедляют или инвертируют работу Na $^+$ /Ca $^{2+}$ -обменника, который локализуется совместно с Na,K-АТФазой, тем самым увеличивая локальный цитоплазматический Ca $^{2+}$ и приводя к эксайтотоксичности, опосредованной глутаматом [Veldhuis, 2003].

Исходя из данных литературы, многими авторами высказывается мнение, что в низких концентрациях уабаин оказывает нейропротекторное действие на нейроны посредством активации CREB (белок, связывающий ответные элементы цАМФ), пути Wnt/β-катенина и NF-κВ (ядерный фактор κВ)[de Sá Lima, 2013].

2.1.4. Роль Na,K-АТФазы в неврологических заболеваниях

На сегодняшний день имеется множество фактических данных, свидетельствующих о связи дисфункции Na,K-АТФазы с возникновением нервно-психиатрических и нейродегенеративных заболеваний. Выявленные клинические фенотипы неврологических расстройств, обусловленных мутациями в ATP1A3 — гене, кодирующем $\alpha 3$ -субъединицу, — частично пересекаются, но не являются полностью согласованными. Сообщения о случаях смешанных или промежуточных фенотипов среди этих расстройств показали, что дисфункция нервной системы, вызванная мутациями в ATP1A3, проявляется в виде набора взаимосвязанных генотипо-фенотипических спектров заболеваний с разнообразными клиническими проявлениями [Li, 2022].

Мутации ATP1A3 могут приводить к следующим неврологическим расстройствам: альтернирующая гемиплегия детства (АГД); быстроразвивающаяся дистония-паркинсонизм (БРДП); синдром CAPOS (мозжечковая атаксию, арефлексия, полая стопа, атрофия зрительного нерва и нейросенсорная туготкань); эпилепсия; рецидивирующая энцефалопатия с мозжечковой атаксией (RECA); пароксизмальная слабость и энцефалопатия, вызванные лихорадкой (FIPWE); ранняя детская эпилептическая энцефалопатия (EIEE) и детская шизофрения (COS) [Vezyroglou, 2022].

Генетическая гетерогенность и широкий спектр фенотипов и тяжести заболевания, наблюдаемых при вариантах ATP1A3, в полной мере еще не изучены. На сегодняшний день почти все патологические варианты ATP1A3, вызывающие заболевание, являются гетерозиготными и обычно обнаруживают потерю функции или измененные кинетические свойства фермента. Клинические различия не могут быть объяснены исключительно анатомическим распределением $\alpha 3$ -субъединицы Na,K-АТФазы, поскольку этот белок широко экспрессируется в нейронах ЦНС [Jiao, 2022].

Большинство патологических мутаций в ATP1A3 выявлены в сайтах связывания ионов, что отражается на эффективности их транспортировки или

fosфорилировании фермента. Некоторые мутации затрагивают цитоплазматическую область трансмембранный спирали ТМ3–ТМ5 и внеклеточную область между ТМ7 и ТМ8. Вместе с этим, не было зарегистрировано мутаций в областях, удаленных от места связывания ионов. Чаще всего мутации затрагивают область ТМ6, далее по распространенности следуют участки ТМ9, ТМ8 и ТМ5 [Li, 2022]. Обнаружено, что более мягкие клинические фенотипы наблюдаются при мутациях в местах, удаленных от сайта связывания ионов; напротив, тяжелая симптоматика вызвана мутациями в области сайта связывания ионов. Парадоксально, но тяжесть симптомов у человека не коррелирует с тем, достаточно ли остаточной активности Na,K-АТФазы для поддержания выживаемости клеток [Roubergue, 2013].

До настоящего времени ATP1A3 является единственным обнаруженным патогенным геном для БРДП, АГД, промежуточного АГД/БРДП и САПОС [Brashear, 2008; Heinzen, 2014]. Эффективных методов лечения БРДП и АГД не существует, и пациенты практически не реагируют на леводопу. Однако методы лечения с применением тригексифенидила, лоразепама, баклофена, флунаризина, инъекций ботулотоксина и реабилитационной терапии другие могут быть минимально эффективными [Yu, 2022; Заялова, 2013].

Альтернирующая гемиплегия детства. Для пациентов с данным заболеванием характерны аномальные движения глаз, двусторонняя альтернирующая гемиплегия, дистония, судороги, а также симптомы со стороны вегетативной нервной системы, одышка, задержка психомоторного развития, хореоатетоз и дистония. Начало заболевания обычно наступает в возрасте до 6 месяцев. Как правило, АГД встречается у носителей мутаций в аминокислотах в положениях до 400 или выше 800. Наиболее частыми патологическими вариантами ATP1A3, вызывающими АГД, являются D801N, E815K и G947R, причем подавляющее большинство мутаций возникает *de novo*. На долю первого варианта приходится до 43% всех случаев АГД, связанных с ATP1A3 [Salles, 2021]. По сравнению с фенотипами этих трех распространенных типов мутаций фенотип

E815K был самым тяжелым, за ним следовали D801N и G947R. Пациенты с мутацией гена E815K имели более ранний возраст начала заболевания, более раннее развитие гемиплегии, более частые приступы, более серьезные интеллектуальные и двигательные нарушения и были более склонны к осложнениям в виде эпилепсии и эпилептического статуса. Важно отметить, что мутации в ATP1A3, наблюдающиеся при АГД, вызывают снижение активности Na₊К-АТФазы, не влияя на уровень экспрессии белка. Нейродегенеративных процессов в базальных ганглиях при данном заболевании не обнаружено, однако отмечаются случаи атрофии червя мозжечка [Heinzen, 2014].

Быстро развивающаяся дистония-паркинсонизм (DYT12). Аутосомно-доминантное расстройство с переменной пенетрантностью, проявляющееся внезапным развитием дистонии и паркинсонизма в подростковом возрасте до двадцати лет и часто возникающее после физиологического стресса [Шишкина, 2020; Краснов, 2013]. У большинства пациентов наблюдается дистония конечностей и головы с дизартрией и дисфагией, сопровождающаяся брадикинезией, замедленной походкой и неустойчивостью осанки [de Carvalho Aguiar, 2004; Brashear, 2007]. Эпизоды БРДП обычно возникают в течение нескольких часов после провоцирующего события, такого как лихорадка, употребление алкоголя, физические нагрузки, эмоциональный стресс, роды или инфекции, и прогрессируют от нескольких часов до недели [Barbano, 2012]. Впоследствии клинические симптомы у большинства пациентов остаются относительно стабильными, а терапия леводопой не приносит никакой пользы или дает лишь минимальный эффект [Yu, 2022]. Это первое расстройство, которое, как было установлено, вызванное мутациями в ATP1A3. Патологические варианты мутаций, обуславливающие возникновение БРДП, равномерно распределены по всему гену ATP1A3 [Li, 2022]. В настоящее время известно, что I758S и T613M являются наиболее распространенными вариантами мутаций при БРДП. Существенных клинических фенотипических различий между различными типами мутаций в гене ATP1A3 не обнаруживается [Li, 2022]. Примерно половина

патогенных вариантов возникла *de novo* [Naq, 2019]. В клинической картине данного заболевания часто встречаются психические симптомы, что свидетельствует об участии Na,K-АТФазы в развитии психиатрических заболеваний [Salles, 2021]. Дофаминовая пресинаптическая визуализация при помощи однофотонной эмиссионной компьютерной томографии (ОФЭКТ) была нормальной во всех случаях, что подтверждает анатомо-патологические данные о интактных нигростриарных нейронах при БРДП [Zanotti-Fregonara, 2008]. Гистопатологические исследования свидетельствуют об отсутствии нейродегенеративных процессов в базальных ганглиях, сообщается об умеренной потере клеток Пуркинье мозжечка [Sampson, 2016].

CAPOS. Общими клиническим проявлением является ранняя рецидивирующая мозжечковая атаксия, прогрессирующая атрофия зрительного нерва и сенсорные нарушения слуха с различной степенью арефлексии и недостаточности чувствительности стоп, таким образом, заболевание названо по инициалам этих характерных симптомов [Heimer, 2015]. Возраст начала заболевания варьирует от 6 месяцев до 5 лет. У некоторых пациентов может наблюдаться пессимистическая пневмония (23-25 лет). Также в период приступа могут появляться проявления энцефалопатии, такие как миастения, нарушение сознания, аномальные движения глаз, дисфагия, офтальмоплегия, судороги, аритмии. Некоторые симптомы острых эпизодов, такие как мозжечковая атаксия, миастения, офтальмоплегия и нарушение сознания, могут спонтанно проходить в течение нескольких дней или месяцев, но потеря рефлексов, ухудшение слуха и атрофия зрительного нерва сохраняются. Другие отмеченные нарушения со стороны нервной системы включают нарушение походки, замедление развития микромоторных навыков, нарушение функции мелкой моторики, нистагм и гиподистонию. Большинство пациентов когнитивно нормальны [Duat Rodriguez, 2017]. Исследования генотипической и фенотипической корреляции синдрома CAPOS показали, что подавляющее большинство мутаций обнаружено E818K (50 случаев, 92,6%). Клинический фенотип, вызванный этой мутацией, заключался в

том, что CAPOS редко приводил к другим клиническим фенотипам, был обнаружено в одном случае БРДП, двух случаях E831K, одном случае E819 и одном случае E820K. Необходимы дальнейшие исследования того, как E.818K приводит к уникальному синдрому CAPOS, а не к другим заболеваниям спектра гена ATP1A3. Существует только одна мутация c.2452G > A / p.Glu818Lys, и о других местах мутации не сообщалось. О бессимптомном носительстве или синдроме CAPOS без мутации гена ATP1A3 не сообщалось [Vezyroglou, 2022].

2.1.5. Генетические модели животных с мутациями в гене ATP1A3

Для более четкого понимания участия Na,K-АТФазы в патогенезе неврологических расстройств было создано несколько генетических животных моделей с мутациями в $\alpha 3$ -субъединице Na,K-АТФазы.

На сегодняшний день описано четыре модели на мышах, использующиеся для изучения *in vivo* последствий мутаций в гене ATP1A3. Мутации в гене ATP1A3 наследуются по аутосомно-домinantному типу. Гомозиготные мутанты умирают вскоре после рождения. Поэтому для изучения всех четырех моделей *in vivo* используются жизнеспособные и фертильные гетерозиготы. Эти модели демонстрируют симптомы и эндофенотипы, сходные с теми, которые наблюдаются при маниакальной и депрессивной фазах биполярного расстройства, БРДП, эпилепсии, АГД и синдроме CAPOS в различной степени [Holm, 2016].

Гетерозиготные мутанты *Myshkin* (*NKA13AMyk/+*; *Myk/+*) несут миссенс-мутацию с аминокислотной заменой в положении 810 (I810N). Такие $\alpha 3$ -субъединицы экспрессируются в норме, но функционально не активны [Clapcote, 2009]. В поведенческих тестах мутанты *Myk/+* демонстрируют гиперактивность, нарушения циркадного ритма и сна, склонность к риску и повышенную чувствительность к D-амфетамину [Harvey, 2008; Kirshenbaum, 2011; Anand, 2000] - эти симптомы наблюдаются у пациентов на маниакальной стадии биполярного расстройства, что позволяет рассматривать данную линию мышей как достоверную модель мании. В возрасте 4 недель у *Myk/+* наблюдается неустойчивая походка, короткий шаг и трепет [Kirshenbaum, 2013], что позволяет

рассматривать гетерозигот Myshkin в качестве модели болезни Паркинсона [Calderon, 2015].

Гетерозиготные мутанты *Mashllool* ($\alpha+/D801N$; *Mashl+/-*) содержат миссенс-мутацию с аминокислотной заменой в положении 810. У мышей этой линии выявлены гиперактивность, снижение способности к обучению, проблемы с памятью, трепет и более короткая длина шага по сравнению с мышами дикого типа, а также дистония, гемиплегия и повышенная возбудимость, что позволяет рассматривать данную линию как модель АГД [Hunanyan, 2015].

Гетерозиготные мутанты с точечной мутацией в четвертом инtronе (*NKA1A3tm1Ling*, *NKA1A3+/-*, $\alpha+/KOI4$) демонстрируют снижение экспрессии $\alpha 3$ -субъединицы в гиппокампе приблизительно на 60% из-за aberrантного сплайсинга [Moseley, 2007]. В то же время общая активность Na,K-АТФазы снижается на 15% по сравнению с диким типом. Нестрессированные гетерозиготы проявляют гиперактивность, снижение тревожности и чувствительность к амфетамину. Вместе с этим, мыши $\alpha+/KOI4$, подвергшиеся хроническому переменному стрессу, демонстрируют поведение, сходное с депрессивным состоянием при биполярном расстройстве: ангедония, поведение, похожее на отчаяние, изменение веса, повышенная тревожность, нарушение памяти и социализации [DeAndrade, 2011]. Таким образом, мутанты $\alpha+/KOI4$, пережившие хроническое стрессовое воздействие, могут служить моделью депрессивной фазы биполярного расстройства.

Гетерозиготные мутанты *Atp1a3tm2Kwk/+* имеют направленную делецию экзонов 2-6. У них выявлена гиперактивность как в домашней клетке, так и в тестовых установках, но их уровень тревожности существенно не отличается от такового у животных дикого типа. Гетерозиготы обладают более высоким уровнем координации и двигательного равновесия по сравнению с диким типом [Ikeda, 2013]. Гетерозиготы в возрасте 4 недель демонстрируют меньшую длину шага по сравнению с диким типом. У гетерозигот старшего возраста (6-12 недель) при отсутствии стрессовых факторов не наблюдается нарушений походки. Однако при

воздействии стрессовых факторов они начинают делать более короткие шаги при передвижении по сравнению с контрольной группой, что похоже на проявление БРДП, симптомы которого у человека могут быть спровоцированы стрессом [Sugimoto, 2014].

2.2. Марганец как модулятор работы Na,K-АТФазы в ЦНС

2.2.1. Функции марганца в норме

Марганец (Mn) является важным микроэлементом, необходимым для выполнения различных клеточных функций организма, выступая в качестве кофактора нескольких ферментов, таких как аргиназа [Diez, 1992], пируват декарбоксилаза [Bentle, 1976], супероксиддисмутаза [Stallings, 1991], глутамин синтетаза [Wedler, 1984].

Суточная норма потребления Mn (2,3 мг/сут для мужчин и 1,8 мг/сут для женщин) необходима для поддержания физиологических функций организма и усваивается с помощью обычного рациона питания [Aschner, 2005]. Являясь компонентом фосфоенолпириваткарбоксикиназы, Mn способствует превращению оксалоацетата в фосфоенолпириват в процессе глюконеогенеза. Супероксиддисмутаза Mn является основным ферментом для устранения активных форм кислорода (АФК) в митохондриях [Bentle, 1976]. Mn играет ключевую роль в поддержании уровня аммиака в организме благодаря активности аргиназы [Aschner, 2005]. Считается, что на долю глутаминсинтетазы, фермента, содержащего Mn, ответственного за превращение глутамата в глутамин, приходится 80 % Mn в головном мозге, и она играет важную роль в обработке аммиака в головном мозге (Diez, 1992).

Несмотря на то, что Mn играет разнообразную роль в организме человека, диетические потребности в этом микроэлементе были установлены на уровне 1,8 мг и 2,3 мг в день для здоровых взрослых женщин и мужчин соответственно. Эта рекомендация учитывает относительно низкие показатели поглощения Mn ($\leq 5\%$), но все же удовлетворяет биологическим потребностям [Cooper, 1984]. Адекватное потребление было установлено на основе биодоступности и типичных пищевых

источников для каждого конкретного возрастного диапазона и пола. В целом, женщины усваивают больше Mn из пищи, чем мужчины, из-за различий в содержании Fe, в частности, Fe и Mn находятся в обратной зависимости из-за общего транспортера в кишечнике, поэтому при низком содержании Fe всасывание Mn выше. Таким образом, у женщин адекватное потребление составляет 1,8 мг/сут (женщины в возрасте 19 лет и старше) против 2,3 мг/сут (мужчины в возрасте 19 лет и старше), чем у мужчин; у младенцев оно составляет от 0,003 мг/сут (0-6 месяцев) до 0,6 мг/сут (6-12 месяцев) и 1,2 мг/сут до 1,6 мг/сут для мальчиков и девочек в возрасте 1-8 лет в зависимости от типичных источников питания (очень низкое адекватное потребление для младенцев в возрасте 0-6 месяцев основано на грудном молоке, содержащем следовые количества Mn) [Aschner, 2005].

2.2.2. Марганцевая нейротоксичность

В настоящее время токсичность Mn чаще всего ассоциируется с профессиональным воздействием на сварщиков, шахтеров и сталелитейщиков хронически высоких уровней взвешенных частиц Mn в воздухе [Mergler, 1994]. При вдыхании Mn может привести к воспалению легких и респираторным симптомам, включая кашель, бронхит, пневмонию и другие нарушения функции легких [Roels, 1999]. В ряде стран также сообщалось о случаях нарушения когнитивных функций у людей, пьющих родниковую воду с повышенным содержанием Mn [Sahni, 2007]. Другим потенциальным источником воздействия Mn на окружающую среду, представляющим интерес в настоящее время, является недавно одобренная присадка к бензину метилцикlopентадиенилтрикарбонил марганца, которая при сгорании выделяет в атмосферу соединения Mn в виде фосфатов, сульфатов и оксидов, причем более 90% этих частиц имеют размер, пригодный для вдыхания [Lynam, 1999; Pfeifer, 2004].

Хроническое воздействие повышенного уровня Mn на производстве или в окружающей среде вызывает неврологическое расстройство, известное как манганизм, симптоматически напоминающее БП, включая нарушение походки,

дистонию и постуральный трепет [Olanow, 2004]. Кроме того, избыточное воздействие Mn было связано с когнитивным дефицитом, потерей внимания и нейропсихологическими отклонениями [Zhang, 2021].

В свою очередь, повышенные уровни Mn наблюдаются у пациентов с БП и боковым амиотрофическим склерозом (БАС). У пациентов, подвергшихся избыточному воздействию марганца отмечается нигростриарная дофаминергическая дисфункция [Meyer-Baron, 2009]. Было обнаружено, что воздействие Mn на субтоксичных уровнях усиливает нейротоксические эффекты МФТП, что также способствует развитию паркинсоноподобного синдрома за счет индукции образования АФК [Pajarillo, 2022].

К основным механизмам реализации марганцевой нейротоксичности относят митохондриальную дисфункцию, ОС, эксайтотоксичность, аутофагию, стресс эндоплазматического ретикулума и апоптоз [Nyarko-Danquah, 2020].

При попадании в клетки Mn преимущественно накапливается в митохондриях, где нарушает митохондриальный гомеостаз и вызывает высвобождение активных форм кислорода [He, 2024]. Более того, Mn способствует дисбалансу в динамике деления митохондрий, нарушая регуляцию связанных с ним белков (Drp-1, Opa-1, Mfn2), что приводит к фрагментации митохондрий и их дисфункции [Holley, 2010]. Вызванное Mn нарушение работы митохондрий в значительной степени способствует повышению уровня АФК и запуску ОС в различных областях мозга, особенно в бледном шаре, стриатуме и черной субстанции [Yan, 2020]. В дополнение к прямому производству АФК, Mn также нарушает регуляцию систем антиоксидантной защиты, снижая синтез глутатиона-поглотителя окисления (GSH), тем самым снижая его уровень и еще больше усугубляя свое окислительное действие [Stephenson, 2013].

В работах на культуре нейробластомы человека показано, что Mn может как активировать аутофагию (при коротком времени действия), так и нарушать (при действии более 24 часов). Аналогичные результаты получены в работах *in vivo*. Показано, что Mn усиливает активацию аутофагии в стриатуме крыс в течение 4-

12 ч после воздействия и подавляет аутофагию на более поздних стадиях, через 1-28 дней после воздействия. Вызванное Mn нарушение регуляции аутофагии нарушает работу других клеточных органелл и активирует воспалительный путь NLRP3-CASP1 в гиппокампе мышей и клетках BV-2, что приводит к нарушениям в обучении и памяти [Liu, 2018; Liu, 2023].

В исследованиях *in vitro* и *in vivo* показано, что Mn нарушает функцию переноса глутамата астроцитами и его усвоение, что приводит к нарушению гомеостаза глутамата и эксайтотоксическому повреждению нейронов путем снижения уровня EAAT2 (GLT-1) и EAAT1 (GLAST) у приматов и на культуре астроцитов [Erikson, 2003; Sidoryk-Wegrzynowcz, 2013].

Являясь важным кофактором многих киназ и фосфатаз, Mn играет ключевую роль в клеточных сигнальных путях. Mn может активировать митоген-активируемую протеинкиназу (MAPK), протеинкиназу В (ПК В/Akt), мутантную телеангидразию атаксии (ATM) и мишень рапамицина у млекопитающих (mTOR). Поскольку эти киназы регулируют факторы транскрипции, такие как циклический аденоzinмонофосфат (цАМФ), CREB, p53, NF-κB и FOXO (раздвоенный блок О), Mn также могут регулировать клеточную функцию на уровне транскрипции [Peres, 2016].

2.2.3. Способы проникновения и выведения марганца в ЦНС

В связи с тем, что марганец участвует во многих клеточных процессах, но в высоких концентрациях обладает токсическим действием, его внутриклеточное содержание строго контролируется. В настоящее время специфических транспортеров Mn не найдено, и описано два способа его проникновения в клетки: посредством неспецифических транспортеров, переносящих Mn²⁺, и при участии трансферрина, который обеспечивает транспорт Mn³⁺ [Tuschl, 2013].

Основной путь поступления ионов марганца в ЦНС реализуется несколькими транспортерами, которые располагаются на мембране клеток и формируют поры для прохода Mn²⁺. Наиболее изученным является транспортер двухвалентных металлов 1 (divalent metal transporter 1, DMT1), также известный

как ассоциированный с естественной резистентностью макрофагальный белок 2 (natural resistance-associated macrophage protein 2, NRAMP 2) или переносчик двухвалентных катионов 1 (divalent cation transporter 1, DCT1), кодируемый геном SLC11A2 (семейство переносчиков растворенных веществ 11, член 2, solute carrier family 11, member 2) [Mims, 2005; Chen, 2015]. В головном мозге DMT 1 высоко экспрессируется в хвостатом ядре, путамене, ретикулярной части черной субстанции [Huang, 2004], мозжечке, таламусе, эпендимальных клетках, выстилающих третий желудочек [Williams, 2000; Burdo, 2001], что делает эти структуры наиболее чувствительными к высоким концентрациям металлов. Кроме того, известно, что экспрессия DMT 1 активируется поступлением Mn, что может поддерживать развитие патологических процессов за счет положительной обратной связи [Sriram, 2010].

В регуляции гомеостаза марганца в ЦНС также принимают участие ZIP-8 (SLC39A8) и ZIP-14 (SLC39A4), члены семейства Zrt- и Irt-подобных белков (ZIP), контролирующие поступление металлов из внеклеточного матрикса или внутриклеточных везикул в цитоплазму клетки. Данные белки располагаются на апикальной поверхности капилляров мозга и используют трансмембранный градиент HCO_3^- для котранспорта Mn^{2+} [Tuschl, 2013; Chen, 2015; Winslow, 2020; He, 2006]. Преимущественно ZIP-8 экспрессируется в легких, семенниках и почках, в то время как экспрессия ZIP-14 наиболее высока в печени, двенадцатиперстной кишке, почках, семенниках, поджелудочной железе и сердце, уровень экспрессии обоих белков в головном мозге относительно низок, в связи с чем предполагается, что ZIP-8 и ZIP-14 главным образом регулируют общее поступление марганца в организм [Girijashanker, 2008]. Кроме этого, ZIP-8 и ZIP-14 обнаруживаются в дендритах нейронов обонятельных рецепторов и нервных пучках слизистой оболочки носовой полости, а также в реснитчатых клетках респираторного эпителия, что обеспечивает проникновение марганца в мозг из вдыхаемого воздуха [Genter, 2009].

Основная часть поступающего в организм марганца находится в двухвалентной степени окисления (Mn^{2+}) и транспортируется трансмембранными переносчиками, для усвоения трехвалентного марганца (Mn^{3+}), составляющего до 20% данного металла в кровотоке, функционирует отдельный механизм. Mn^{3+} обладает высоким сродством к трансферрину (Tf), белку плазмы крови. Связывание комплекса Tf– Mn^{3+} со своим рецептором (TfR) на плазматической мембране вызывает интернализацию комплекса Mn^{3+} –Tf–TfR в эндосомальные везикулы, внутри которых Mn^{3+} высвобождается и восстанавливается до Mn^{2+} ферриредуктазой [Gunter, 2013; Gruenheid, 1999]. TfR экспрессируется в большинстве клеток, включая нейроны, микроглию, астроциты и эндотелиальные клетки гематоэнцефалического барьера (ГЭБ), что позволяет доставлять Mn^{3+} в головной мозг [Moos, 2000].

В настоящее время считается, что за удаление ионов марганца из клетки отвечают четыре переносчика: АТФаза 13A2 (ATP13A2), SLC30A10, ферропортин (Fpn) и секреторный путь Ca²⁺-АТФаза 1 (secretory pathway Ca²⁺-ATPase 1, SPCA1) [Chen, 2015].

Критическую роль в регуляции Mn гомеостаза играет SLC30A10, связанный с единственной известной наследственной формой Mn-индексированного паркинсонизма. У людей, несущих мутации в SLC30A10, уровень Mn в крови повышается примерно в 10 раз, а исследования магнитно-резонансной томографии (МРТ) показывают высокие уровни Mn, накопленные в базальных ганглиях, без наличия в анамнезе повышенного воздействия Mn из источников окружающей среды или профессиональной деятельности, что проявляется в гиперманганеземией с дистонией, полицitemией и циррозом печени [Tuschl, 2008; Stamelou, 2012]. Было обнаружено, что SLC30A10 дикого типа (WT) локализован на клеточной мембране, в то время как мутантные формы транспортера находятся в эндоплазматическом ретикулуме или в цитоплазме. В то время как белок дикого типа способен защищать от индуцированной Mn дофаминергической нейродегенерации и клеточной токсичности, неправильная локализация не

позволяет мутантам выполнять свои функции, что приводит к высоким концентрациям Mn в клетке [Leyva-Illades, 2014].

2.2.4. Влияние марганца на Na,K-АТФазу

В различных исследованиях обнаружаются противоречивые данные о характере действия Mn на функционирование Na,K-АТФазы. Так, при длительном введении MnCl₂ крысам [Shukla, 1983; Liapi, 2008] и инкубации с синаптосомами мозга крысы [Chandra, 1984] не происходит изменения общей активности Na,K-АТФазы. В то же время, при воздействии в более высоких концентрациях (более 1 мМ) Mn способен ингибировать Na,K-АТФазу [Atkinson, 1968; Qi, 2020; Xu, 2010; Carfagna, 1996], а при действии наномолярных концентраций, наоборот, активировать [Lai, 1991]. Также сообщается о повышении активности Na,K-АТФазы в различных регионах мозга (средний мозг, кора) крыс при потреблении низких концентраций Mn во время раннего постнатального периода [Tran, 2002].

2.3. Этиология и патогенез болезни Паркинсона

Болезнь Паркинсона – прогрессирующее нейродегенеративное заболевание, характеризующееся потерей дофаминергических нейронов в кЧС, истощением дофамина (ДА) в стриатуме, и, как следствие, двигательным дефицитом. Диагностические признаки БП подразделяются на моторные нарушения и немоторные дисфункции. К основным моторным симптомам БП относят тремор покоя, брадикинезию, ригидность и постуральную нестабильность. Среди немоторных симптомов выделяют вегетативные дисфункции, когнитивные и нейроповеденческие нарушения, расстройства сна и сенсорный дефицит [Иллариошкин, 2015; Leite, 2023].

Патологическим признаком болезни Паркинсона является депигментация черной субстанции и голубого пятна с потерей нейронов в кЧС. В этот процесс вовлечены как апоптоз, так и аутофагия [Anglade, 1997]. В пораженных областях отмечается накопление телец Леви, которые представляют собой эозинофильные цитоплазматические включения, содержащие а-синуклеин. Первоначальная причина БП остается неясной. Как именно тельца Леви связаны с прогрессированием

заболевания, неизвестно. На данный момент считается, что в развитии нейродегенерации принимают участие дисфункция митохондрий, нейровоспаление, аномальная агрегация белков и ОС [Shapira, 2011].

Основные признаки заболевания становятся клинически диагностируемы, когда гибель нейронов в кЧС составляет 50-60% и сопровождается снижением уровня ДА до 70%. При этом отсутствие выраженной симптоматики на премоторной стадии заболевания свидетельствует о наличии мощных компенсаторных механизмов, позволяющих нивелировать столь значительное истощение дофаминергической системы [Golden, 2013; Ledonne, 2023; Колачева, 2014]. Кроме того, известно, что денервация стриатума и гибель нейронов в кЧС происходит по экспоненциальной схеме и продолжается еще в течение примерно 5 лет с момента постановки диагноза [Kordower, 2013].

Современные экспериментальные модели БП подразделяются на две основные группы: фармакологические, путем введения нейротоксинов, и генетические [Chia, 2020]. Введение нейротоксинов (6-гидроксидафамин (6-ОН-ДА), МФТП, ротенон, паракват) лабораторным животным приводит к развитию ОС и гибели клеток в популяции дофаминергических нейронов, что имитирует спорадическую БП [Taguchi, 2020]. Однако в данных моделях не происходит образования телец Леви – основного патологического признака БП. Генетические модели основаны на воспроизведении генетических мутаций в α-синуклеине, паркине, LRRK2, PINK1 или DJ-1, связанных с развитием БП (Dawson, 2010).

Использование внутримозгового введения 6-ОН-ДА исторически было первым для моделирования паркинсоноподобного состояния у лабораторных животных. Попадая внутрь клетки, 6-ОН-ДА быстро окисляется до активных форм кислорода (перекись водорода, супероксид-радикал, гидроксильные радикалы), что приводит к ОС и гибели нейронов [Simola, 2009].

МФТП (1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридин) является одним из наиболее используемых нейротоксинов для моделирования БП. После системного введения молекула МФТП окисляется до токсичного метаболита 1-метил-4-

фенилпиридиниевый ион (MPP^+) под действием моноаминооксидазы В в астроцитах, после чего поглощается дофаминергическими нейронами через дофаминовый транспортер (ДАТ). Внутри клеток MPP^+ ингибирует работу комплекса I электрон-транспортную цепь (ЭТЦ) митохондрий, что приводит к быстрому снижению АТФ в стриатуме и ЧС с последующим апоптозом и некрозом дофаминергических нейронов, сопровождающуюся снижением уровня дофамина [Meredith, 2011].

Паракват ингибирует ЭТЦ митохондрий (комплекс 3), активирует индуцильную синтазу оксида азота и нарушает работу окислительно-восстановительного цикла глутатиона и тиоредоксина, что в совокупности приводит к увеличению содержания активных форм кислорода и активных форм азота. Для формирования хронической нейродегенерации дофаминергических нейронов совместно со снижением содержания катехоламинов используются модели хронического введения параквата лабораторным животным [Bastías-Candia, 2019].

Ротенон также как и МФТП является ингибитором комплекса I митохондриальной ЭТЦ, однако не обладает специфичностью к дофаминергическим нейронам, вследствие чего обладает системным воздействием. Хроническое введение ротенона в низких дозах вызывает селективную дегенерацию клеток в нигростриарной области, двигательный дефицит, истощение катехоламинов, а также приводит к формированию включений а-синуклеина в выживших дофаминергических нейронах [Radad, 2019].

В настоящий момент актуальной задачей является разработка моделей ранней досимптоматической стадии экспериментального паркинсонизма для изучения динамики развития патологии и компенсаторных механизмов [Козина, 2016]. Почти все известные модели ранней стадии паркинсонизма основаны на хроническом введении низких доз МФТП вследствие отсутствия его общетоксического эффекта и избирательном действии на дофаминергические нейроны [Berezhnaya, 2021; Хайндрава, 2010; Украинцева, 2010].

2.4. Участие Na,K-АТФазы в патогенезе болезни Паркинсона

В качестве одного из механизмов токсической дисфункции Na,K-АТФазы на нейроны рассматривается тот факт, что при снижении выработки АТФ вследствие митохондриальной недостаточности снижается эффективность работы Na,K-АТФазы по поддержанию Na^+ гомеостаза, что, в свою очередь, приводит к изменению мембранного потенциала, открытию Са-потенциал-зависимых каналов и эксайтотоксичности [Deri, 1993; Keane, 2011]. Особую опасность такое течение событий имеет в нейронах кЧС, где снижено содержание связывающего Ca^{2+} белка кальбинина, по сравнению с соседними дофаминергическими областями [Surmeier, 2013], вследствие чего кЧС наиболее уязвима к свободному внутриклеточному кальцию.

Известно, что токсические аддукты хино-протеинов, образующиеся вследствии автоокисления цитоплазменного дофамина, дозозависимо инактивируют Na,K-АТФазу, что также может способствовать гибели дофаминергических нейронов при развитии БП [Bagh, 2008].

Еще одним фактором, способствующим развитию дисфункции Na,K-АТФазы при БП является образование внутриклеточных кластеров а-синуклеина с α_3 -субъединицей Na,K-АТФазы. Вследствие кластеризации происходит инактивация α_3 -субъединицы, образование мембранных областей с пониженным содержанием Na,K-АТФазы и снижение эффективности в работе фермента по поддержанию натриевого градиента [Shrivastava, 2015]. Кроме того, в работе на *Drosophila* недавно было показано связывание а-синуклеина с β -спектрин-анкериновым комплексом, который необходим для правильной локализации и функционирования трансмембранных белков, и, в частности, Na,K-АТФазы [Maor, 2023].

Ключевыми элементами в развитии нейродегенерации при БП являются митохондриальная дисфункция и ОС, на основании чего разработаны основные животные модели для изучения данного расстройства. Особое внимание стоит уделить влиянию митохондриальных токсинов на функционирование Na,K-

АТФазы в моделях БП. В модели МФТП-индуцированного паркинсонизма на мышах было показано снижение общей активности Na,K -АТФазы на $\approx 40\%$, сопровождающееся 60%-снижением количества дофамина стриатума [Lv, 2012]. Также происходит значительное снижение активности данного фермента (до 60%) в условиях окислительного стресса при воздействии MPP^+ на NGF (nerve growth factor)-дифференцированные клетки PC12 [Lin, 2019]. В работах по исследованию антиоксидантных свойств различных молекул в моделях ротенон-индуцированного паркинсонизма также отмечают снижение работы Na,K -АТФазы на $\approx 25\% - 40\%$ в цельном мозге [Plesanmi, 2019; Anusha, 2017], на 22% и 28% в среднем мозге и стриатуме соответственно [Khadrawy, 2017]. Анализ механизмов токсичности ротенона на переживающих срезах стриатума крысы показал, что ранними эффектами воздействия токсина являются внутриклеточное накопление ионов натрия, сопровождающееся развитием ранней гиперполяризацией, и кальция с последующей деполяризацией, что совпадает с профилем активации ионных изменений после ингибирования Na,K -АТФазы убацином [Bonsi, 2004]. Введение экспериментальным животным 6-ОН-ДА приводит к $\approx 28\% - 43\%$ снижению активности Na,K -АТФазы, сопровождающейся развитием значительной дисфункции всех четырех комплексов ЭТЦ митохондрий, снижением содержания дофамина и его метаболитов [Antunes, 2021; Del Fabbro, 2019]. Таким образом, нарушение энергетического обмена нейронов вследствие дисфункции митохондрий приводит к нарушению работы Na,K -АТФазы, что, в свою очередь, в дальнейшем приводит к дегенерации нейронов кЧС и развитию двигательного дефицита.

Однако интересные результаты были получены при оценке функционирования Na,K -АТФазы в мозжечке экспериментальных животных при моделировании БП митохондриальными токсинами. Так, введение ротенона в стриатум крыс приводит к 41% повышению активности фермента на фоне развития гибели клеток Пуркинье, снижении содержания дофамина в стриатуме и среднем мозге и снижении функционирования антиоксидантной системы мозга

[Khadrawy, 2017; Khadrawy, 2016]. В модели МФТП-индуцированного паркинсонизма у Macaca Fascicularis обнаружено увеличение активности Na,K-АТФазы на 45% в синаптосомах коры мозжечка, а также ферментов, участвующих в цикле Кребса [Villa, 1994]. Интраназальное введение МФТП приводит к повышению экспрессии $\alpha 3$ -субъединицы Na,K-АТФазы в обонятельных луковицах, коре и мозжечке на фоне отсутствия двигательных нарушений [Королев, 2020; Королев, 2024]. Недавно было показано, что для пациентов с БП характерна гиперактивация мозжечково-таламо-кортикалного контура и повышенная активность мозжечка, усиливающаяся при выполнении срочных спонтанных движений [Lewis, 2013]. Таким образом, наблюдаемое повышение функционирования систем энергетического и ионного обмена мозжечка в животных моделях БП может быть объяснено компенсаторным влиянием данной структуры в условиях дисфункции базальных ганглий.

3. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В рамках настоящего исследования было проведено три серии экспериментов, в каждой из которых оценивали влияние уабаина, марганца или МФТП на поведение мышей линии C57Bl/6, активность Na,K-АТФазы и некоторые другие биохимические параметры головного мозга, а также эксперимент по изучению механизмов влияния уабаина на жизнеспособность клеток нейробластомы человека SH-SY5Y.

Все эксперименты на животных проводили в соответствии с Руководством Национального института здоровья по уходу и использованию лабораторных животных (NIH Publications No. 80-23), пересмотренным в 1996 г. Протоколы исследований были одобрены этическим комитетом по экспериментам на животных СПбГУ (протокол № 131-03-1 от 25.03.2019) и Комиссией по биомедицинской этике ФГБНУ «Научного центра неврологии» (протокол №2-9/24 от 18.03.2024).

3.1. Изучение эффектов ингибирования Na,K-АТФазы уабаином в экспериментах *in vitro* и *in vivo*

3.1.1. Изучение механизмов влияния ингибитора Na,K-АТФазы уабаина на жизнеспособность культуры клеток нейробластомы человека SH-SY5Y

Работа была проведена на быстрорастущей пересеваемой клеточной культуре нейробластомы человека SH-SY5Y (ATCC®, США), недифференцированной и дифференцированной по дофаминергическому типу.

На первом этапе проводили оценку жизнеспособности культуры недифференцированной и дифференцированной нейробластомы SH-SY5Y с использованием МТТ-теста после инкубации клеток с уабаином. Клетки рассаживали в 96-луночные планшеты из расчета 40 тысяч клеток на лунку, часть клеток дифференцировали по дофаминергическому типу в течение 6 дней, другую часть клеток оставляли недифференцированными. На 7 день к клеткам добавляли уабаин, растворенный в культуральной среде, в концентрациях 1 нМ, 10 нМ, 100 нМ, 1 мкМ в объеме 200 мкл и инкубировали в течение 24 часов. На основании

данного эксперимента была выбрана минимальная токсическая доза уабаина, используемая в дальнейшем.

Для изучения механизмов токсического действия уабаина на культуру клеток нейробластомы человека SH-SY5Y был проведен ингибиторный анализ. Проводили оценку влияния совместной инкубации уабаина с ингибитором протеинкиназы С хелеритрином, блокатором AMPA/каинатных рецепторов 6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione (CNQX), ингибитором дофаминовых D2-рецепторов галоперидолом, ингибитором пути MEK/ERK PD0325901 на жизнеспособность клеток культуры нейробластомы с использованием МТТ-теста. Клетки рассаживали в 96-луночные планшеты из расчета 40 тысяч клеток на лунку, часть клеток дифференцировали по дофаминергическому типу, часть оставляли недифференцированной. На 7 день к клеткам добавляли уабайн в минимальной токсической концентрации, хелеритрин в концентрации 100 нМ, CNQX в концентрации 100 нМ, PD0325901 в концентрации 1 мкМ, галоперидол в концентрации 100 мкМ, растворенные в культуральной среде, в объеме 200 мкл по отдельности или совместно с уабаином, после чего инкубировали в течение 24 часов. Таким образом, для дифференцированной и недифференцированной культуры клеток были сформированы следующие группы:

- 1) Контроль: интактные клетки, которым добавляли культуральную среду (N=10 лунок);
- 2) Уабайн в минимальной токсичной концентрации (N=12 лунок);
- 3) Галоперидол в концентрации 100 мкМ (N=12 лунок);
- 4) CNQX в концентрации 100 нМ (N=12 лунок);
- 5) Хелеритрин в концентрации 100 нМ (N=12 лунок);
- 6) PD0325901 в концентрации 1 мкМ (N=12 лунок);
- 7) Уабайн в минимальной токсичной концентрации + галоперидол 100 мкМ (N=12 лунок)
- 8) Уабайн в минимальной токсичной концентрации + CNQX 100 нМ (N=12 лунок);

9) Уабаин в минимальной токсичной концентрации + хелеритрин 2 мкМ (N=12 лунок);

10) Уабаин в минимальной токсичной концентрации + PD0325901 1 мкМ (N=12 лунок).

После определения минимальной токсической дозы уабаина проводили оценку его влияния на содержание дофамина в культуре клеток недифференцированной и дифференцированной нейробластомы методом ВЭЖХ-ЭД. Для этого клетки рассаживали в чашки Петри размером 6 см с плотностью 800 тыс клеток на чашку, на одну экспериментальную группу приходилось 4 чашки. Часть клеток дифференцировали по дофаминергическому типу в течение 6 дней, другую часть клеток оставляли недифференцированными. На 7 день к клеткам добавляли уабаин, растворенный в культуральной среде, в минимальной токсичной концентрации в объеме 2 мл и инкубировали в течение 1 часа. После завершения инкубации культуральную среду отбирали для последующего измерения в ней содержания дофамина. Оставшуюся клеточную культуру дважды промывали холодным раствором Хенкса (ПанЭко, Россия), после чего добавляли 100 мкл 0,1Н HClO4 с диоксибензиламином (ДБА) и на холода лизировали клетки. В полученной суспензии клеток определяли содержание дофамина.

Оценку влияния уабаина на содержание белков регуляторов апоптоза проводили методом Вестерн-блотт. Для этого культуру рассаживали в чашки Петри размером 6 см с плотностью 800 тыс клеток на чашку, на одну экспериментальную группу приходилось 4 чашки. Часть клеток дифференцировали по дофаминергическому типу в течение 6 дней, другую часть клеток оставляли недифференцированными. На 7 день к клеткам добавляли уабаин, растворенный в культуральной среде, в минимальной токсичной концентрации в объеме 2 мл и инкубировали в течение 3 часов. После завершения инкубации отбирали культуральную среду, а оставшуюся клеточную культуру дважды промывали холодным раствором Хенкса (ПанЭко, Россия). К клеткам добавляли 100 мкл RIPA-буфера, содержащего ингибиторы протеаз и фосфатаз

(Sigma, США), и на холоде лизировали для последующего анализа содержания про- и антиапоптотических белков.

3.1.2. Моделирование двигательных нарушений у мышей линии C57Bl/6 путем внутрижелудочкового введения ингибитора Na,K-АТФазы уабаина

Для оценки влияния уабаина на двигательную активность животных и изучения механизмов этого влияния проводили его внутрижелудочковое (ICV) введение однократно или четырехкратно.

Эксперименты проводили на 4–6-месячных самцах мышей линии C57Bl/6 ($n = 40$), полученных из вивария Санкт-Петербургского государственного университета. При помощи стереотаксической установки животным были установлены хронические канюли для введения веществ. Эксперименты проводили через 3 дня после постановки канюль. Формирование экспериментальных группы осуществляли после определения фоновой двигательной активности животных в teste «Открытое поле».

Контрольным животным вводили искусственную цереброспинальную жидкость (иЦСЖ) в объеме 0,5 мкл для однократного введения или 1,5 мкл для четырехкратного введения.

Состав иЦСЖ: 125 мМ NaCl, 26 мМ NaHCO₃, 4 мМ KCl, 1,25 мМ NaH₂PO₄, 2 мМ CaCl₂, 2 мМ MgCl₂, 25 мМ глюкозы.

Были сформированы следующие экспериментальные группы:

1) группа «Контроль»: ложнооперированные животные, получали введение иЦСЖ в объеме 0,5 мкл ($n=10$) или 1,5 мкл ($n=10$);

2) группа «Уабайн» однократно: получали однократное билатеральное ICV-введение 0,5 мкл 50 мкМ (25 пмоль, 14,6 нг) уабаина, растворенного в иЦСЖ ($n=10$);

3) группа «Уабайн» четырехкратно: получали ежедневные унилатеральные ICV-введения 1,5 мкл 50 мкМ (75 пмоль, 43,8 нг) уабаина, растворенного в иЦСЖ, в течение четырех дней ($n=10$).

При однократном введении уабаина у животных тестировали локомоторную активность в teste «Открытое поле» сразу после введения, наличие двигательных нарушений у животных оценивали в тестах «Наклонная лесенка», «Приподнятая планка», степпинг-тест сразу после введения.

При четырехкратном введении уабаина у животных тестировали локомоторную активность в teste «Открытое поле» и наличие двигательных нарушений в тестах «Наклонная решетка», «Приподнятая планка», степпинг-через 24 часа после последнего введения.

Эвтаназию животных и извлечение структур мозга осуществляли через 10 или 30 минут после введения в зависимости от последующих биохимических исследований после однократно введения и через 24 часа после последнего четырехкратного введения. В образцах мозга была определена активность Na,K-АТФазы, методом Вестерн-блотт было определено содержание субъединиц $\alpha 1$ и $\alpha 3$ Na,K-АТФазы, киназ ERK1/2 и pERK1/2, Akt и pAkt, субъединицы NR2B NMDA-рецептора.

3.2. Изучение механизмов влияния марганца на поведение животных

3.2.1. Моделирование двигательных и когнитивных нарушений у мышей линии C57Bl/6, вызванных потреблением хлорида марганца с питьевой водой

Для оценки влияния длительного воздействия Mn на двигательную активность животных был проведен эксперимент, в котором экспериментальные животные потребляли питьевую воду с растворенным в ней $MnCl_2$ в концентрации 0,5 г/л в течение 8 недель.

Исследование выполнено на самцах мышей линии C57Bl/6 ($n = 43$; возраст 6-8 недель, масса в начале эксперимента в пределах 18-27 г.), приобретенных в Научном центре биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства (Москва, Россия).

В начале эксперимента случайным образом были сформированы следующие экспериментальные группы:

- 1) Группа «Контроль» ($n=9$): потребляли питьевую воду;

2) Группа «Mn»: потребляли питьевую воду с добавлением 0,5 г/л MnCl₂ (ОАО "Ленреактив", Санкт-Петербург, Россия) в течение 2 недель (n=8), 4 недель (n=8), 6 недель (n=9) или 8 недель (n=9).

Все животные имели свободный доступ к корму (содержание Mn не более 57 мг на 1 кг комбикорма; Аркон, Москва) и питьевой воде. Каждые три дня эксперимента воду и растворы MnCl₂ обновляли и оценивали их потребление. Еженедельно оценивали вес животных и потребление пищи. На основании этих данных рассчитывали средний вес мыши в группе и среднесуточное потребление воды или пищи на грамм массы тела мыши для каждой недели эксперимента.

Двигательные и когнитивные функции у мышей оценивали в комплексе различных поведенческих тестов. До начала эксперимента ежедневно в течение 6 дней животных приучали к рукам и условиям тестирования.

В ходе эксперимента каждый из поведенческих тестов проводили еженедельно в следующей последовательности:

первый день тестирования: степпинг-тест, тест «Сужающаяся дорожка» и тест «Наклонная решетка»;

третий день тестирования: пищедобывающее поведение в «Челночной камере»;

пятый день тестирования: тест «Открытое поле».

Для оценки динамики изменения биохимических параметров животных, потреблявших Mn, подвергали эвтаназии через 2, 4, 6 и 8 недель эксперимента. Животные контрольной группы были подвергнуты эвтаназии через 8 недель после начала эксперимента. В образцах мозга было определено содержание ионов натрия и калия методом Атомно-эмиссионной спектрометрии с индуктивно связанной плазмой, ионов марганца методом Масс-спектрометрии с индуктивно связанной плазмой, активность Na,K-АТФазы, методом Вестерн-блотт было оценено содержание α1, α2, α3 субъединиц Na,K-АТФазы, содержание киназ ERK1/2 и pERK1/2, Akt и pAkt, белков-регуляторов апоптоза Bak, Bcl-xL, Bax, содержание дофамина и серотонина было определено методом ВЭЖХ-ЭД.

3.3. Изучение функционирования Na,K-АТФазы на ранних этапах развития токсин-индуцированного паркинсонизма

3.3.1. Моделирование досимптоматической стадии паркинсонизма у мышей линии C57Bl/6 введением низких доз токсина МФТП

Участие Na,K-АТФазы в формировании токсин-индуцированного паркинсоноподобного поведения оценивали в новой разработанной модели с длительным ежедневным введением 3 мг/кг МФТП.

Эксперимент был проведен на самцах мышей линии C57Bl/6 ($n=23$, возраста 6-8 недель, масса на момент начала исследования в пределах 20-25 г.), полученных из Научного центра биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства (Москва, Россия).

Моделирование ранней стадии паркинсонизма осуществляли путем ежедневного введения МФТП в дозе 3 мг/кг по схеме 6 дней введения+1 перерыв (6/1), суммарно каждое животное получало 35 введений. Были сформированы следующие экспериментальные группы:

- 1) группа «Контроль»: животные получали ежедневно подкожные введения 0,2 мл физиологического раствора ($n=12$);
- 2) группа «МФТП»: животные получали ежедневно подкожные введения МФТП в дозе 3 мг/кг массы животного в том же объеме ($n=11$).

До начала эксперимента ежедневно в течение 6 дней животных приучали к рукам и условиям тестирования. После 35-го введения МФТП была проведена оценка наличия двигательных нарушений у животных в тестах «Открытое поле», «Сужающаяся дорожка» и «Наклонная решетка», а также оценка рабочей пространственной памяти в teste «Y-образный лабиринт» в парадигме спонтанного чередования. Через 24 часа после последнего введения МФТП животные были подвергнуты эвтаназии.

В образцах мозга было определено содержание дофамина и его метаболита дигидроксиуксусной кислоты методом ВЭЖХ-ЭД, активность Na,K-АТФазы,

имmunогистохимическим методом определено содержание тирозингидроксилазы (ТГ), цитохромоксидазы (ЦО) и супероксиддисмутазы (СОД).

3.4. Методы работы с клеточными культурами

3.4.1. Ведение культуры и дифференцировка клеток по дофаминергическому типу

Клетки культивировали в чашках Петри на смеси сред Игла МЕМ с солями Эрла с глутамином и F-12 без глутамина в пропорции 1:1, с добавлением 100 ед.мл раствора пенициллина-стрептомицина (ПанЭко, Россия) и 10% эмбриональной телячьей сыворотки (PAA Laboratories, Австрия). Культуру содержали в клеточном инкубаторе (ShelLab) при 37° С, 90% влажности, 5% CO₂. Каждые 3 суток производили замену среды.

Дифференцировку клеток по дофаминергическому типу индуцировали культивированием в течение 7 дней в присутствии ретиноевой кислоты (MP Biomedicals, США) в конечной концентрации 10 мкМ, 75 нМ 12-О-тетрадеканоилфорбол-13-ацетата (ТФА) (Sigma, США) и снижением концентрации сыворотки в среде до 1%.

3.4.2. Оценка жизнеспособности клеток по МТТ-тесту

После инкубации клеток с исследуемыми веществами согласно протоколу эксперимента культуральную среду полностью отбирали. К клеткам добавляли раствор реагента МТТ (3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолийбромид) (Диаэм, Россия), приготовленный на культуральной среде, в конечной концентрации 0,5 мг/мл. Превращение желтой соли тетразолия в его продукт формазан фиолетового цвета является показателем митохондриальной активности жизнеспособных клеток. После инкубации клеток с МТТ реагентом в течение 3 часов, из лунок осторожно удаляли среду, не затрагивая кристаллы формазана. В каждой лунке сухой остаток формазана растворяли в 100 мл диметилсульфоксида (ДМСО) (Диа-м) с получением раствора фиолетового цвета. Планшеты помещали в спектрофотометр для микропланшетов Synergy H1 (BioTek, Winooski, VT, USA), в котором раствор в лунках перемешивался в течение 6 мин и проводилось

измерение оптической плотности при длинных волнах $\lambda = 570$ нм и $\lambda = 660$ нм. Из показаний оптической плотности при $\lambda = 570$ нм вычитали показания при $\lambda = 660$ нм. Данные представлены в процентах от величины оптической плотности раствора в контрольных лунках, принятых за 100%.

3.5. Инвазивные методы

3.5.1. Стереотаксическая установка хронических канюль

Животных анестезировали газовым наркозом изофлуран (Karizoo, Испания) в установке с постоянной подачей (IsoFlo, США). Мыши помещали в стереотаксический трехосный манипулятор, где тщательно очищали череп от поверхностных тканей и отмечали координаты AP = -0,5; L = 1,0 по атласу головного мозга мыши (Paxinos et al., 2001). В отмеченном месте делали отверстие диаметром 1 мм для постановки канюли. Направляющую канюлю изготавливали из игл 26g («KDF») с закреплённым пластиковым держателем размером 1 × 2 мм. При помощи стереотаксической установки вводили направляющую канюлю в подготовленное отверстие в черепе на глубину 2 мм таким образом, что кончик канюли находился над латеральным желудочком, но не проникал внутрь, и фиксировали при помощи пломбировочного материала на основе акрилоксида. Для предотвращения закупоривания направляющей канюли в послеоперационные период в нее вставляли мандрен, изготовленный из иглы размером 33g («Mesoram»), длиной 3,9–4,0 мм. Эксперименты начинали через 3 дня после постановки канюли.

3.5.2. Внутрижелудочковое введение веществ

Внутрижелудочковое (intracerebroventricular, ICV) введение уабаина или иЦСЖ осуществляли при помощи инъекционной канюли, изготовленной из 33g игл («Mesoram»), соединенной инъекционной системой с Гамильтоновым шприцем. Равномерность введения обеспечивали шприцевой помпой, подающей растворы со скоростью 0,75 мкл/мин

3.6. Методы поведенческого тестирования

3.6.1. «Открытое поле»

Двигательную активность и стереотипию движений оценивали в teste «Открытое поле» (ОП). Поведенческая установка представляет собой арену размером 40*40*40 см, подключенную к системе видеослежения («EthoVision XT», «Noldus»). Животное помещали в центр поля и фиксировали пройденное расстояние в течение 5 или 20 минут. В программном пакете «EthoVision» изображение квадратного поля визуально разделяли на зоны: 4 угла, 4 края и центральную. Центральная зона представляла собой квадрат, расположенный по центру поля с диагональю, равной 1/2 диагонали всего поля. Двигательную стереотипию животных оценивали с использованием алгоритма анализа программы «EthoVision XT». Данный алгоритм рассчитывает индекс спонтанных чередований следующим способом: количество чередований (Alt) соответствует количеству отрезков траектории, где животное последовательно проходило соседние зоны «открытого поля» (за исключением центральной); максимально возможное число чередований (mAlt) рассчитывается как разность между общим числом зон, в которые животные заходили нерегулярно, и количества выбранных для анализа зон без одной зоны; индекс чередований (индекс стереотипии, Ialt) рассчитывается как процентное отношение количества чередований к максимально возможному числу чередований: $IAlt = Alt/mAlt \times 100\%$ [Paulus, 1999].

3.6.2. «Сужающаяся дорожка»/ «Приподнятая планка»

Для оценки акинезии и координации животных использовали тест «Сужающаяся дорожка» или его упрощенную модификацию – тест «Приподнятая планка». Установка представляет собой узкую деревянную перекладину с равномерным сужением ширины от 4 см до 0,5 см (в случае «Сужающейся дорожки», OpenScience, Россия) или равную на всем протяжении шириной 1 см (в случае «Приподнятой планки»), длиной 100 см, поднятой над поверхностью пола на 50-80 см. В конце перекладины установлен затемненный домик с домашним

подстилом в качестве положительного подкрепления. В качестве аверсивного стимула для начала движения использовали яркое освещение в начале дорожки. Перед тестированием животных обучали хождению по перекладине в течение 2-3 дней. Во время эксперимента фиксировали время прохождения от начала дорожки до домика, количество соскальзываний лап (ошибок) и падений при выполнении теста.

3.6.3. «Наклонная решетка»/ «Наклонная лесенка»

Для оценки мелкой моторики и координации животных использовали тест «Наклонная решетка» или его вариацию «Наклонная лесенка». Установка представляет собой металлическую решетку размером 20*20 см с расстоянием между прутьями 1,5 см, расположенную на горизонтальной поверхности под углом 45° (в случае «Наклонной решетки») или металлическую лестницу с расстоянием между прутьями 1,5 см, расположенную на горизонтальной плоскости под углом 15° (в случае «Наклонной лесенки», OpenScience, Россия). В конце установки располагалась домашняя клетка в качестве положительного подкрепления. В начале теста мышь помещали на нижние прутья, после чего животное взбиралось по решетке/лесенке в домашнюю клетку. Продолжительность тестовой сессии составляла не более 90 с. Перед экспериментом животных обучали выполнению теста в течение 2-3 дней. Во время тестовой сессии фиксировали общее время подъема и количество ошибок (соскальзываний лап с перекладин).

3.6.4. «Степпинг-тест»

Для проведения «Степпинг-теста» мышей помещали передними лапами на решетку домашней клетки, удерживая вертикально за задние, и оценивали количество шагов, совершенных животным за 10 с.

3.6.5. «Y-образный лабиринт»

Тест «Y-образный лабиринт» использовали для оценки дисфункции пространственной рабочей памяти. Экспериментальная установка представляет собой лабиринт из трех рукавов, размерами 30*5*12 см, соединенных под углом

120° (OpenScience, Россия). Животное помещали в конец произвольного рукава и давали возможность свободно исследовать лабиринт в течение 5 минут. Регистрировали количество и последовательность заходов мыши в рукава лабиринта и вычисляли коэффициент чередований (K_s) по формуле: $K_s = R/A \times 100\%$, где “R” – количество правильных чередований (три последовательных входа в рукава лабиринта без повторов), “A” – максимально возможное количество чередований (общее количество заходов в рукава).

3.6.6. «Пищедобывательное поведение в челночной камере»

Формирование пищедобывательного поведения проводили в челночной камере. Пищевое поведение мышей оценивали с помощью камеры, состоящей из двух одинаковых отсеков размером $25 \times 25 \times 30$ см, между которыми животные могли свободно перемещаться. Оба отсека были оборудованы автоматическими кормушками для нормированной выдачи пищи (по одной на отсек). В качестве подкрепления использовались мелкие сырные шарики, к которым животные приучались заранее до начала эксперимента ($d = 1$ мм). В начале теста мышей после 12-ч пищевой депривации помещали в правый отсек бокса. После первого подхода животного к любой из кормушек оно получало пищевое вознаграждение. Второе вознаграждение, а также все последующие вознаграждения животные получали после перемещения в противоположный отсек и взаимодействия с кормушкой. Повторный подход к кормушке в том же отсеке не подкреплялся. Регистрировалось количество переходов между отсеками и количество пищевых подкреплений, полученных животным в течение 5-мин тестовой сессии (Патент №143683 от 08.11.2013).

3.7. Аналитические методы

В экспериментах *in vitro* для последующего проведения биохимического анализа из чашек отбирали культуральную среду, оставшуюся клеточную культуру дважды промывали холодным раствором Хенкса (ПанЭко, Россия). К части чашек с клетками добавляли 100 мкл 0,1Н HClO₄ с внутренним стандартом диоксибензиламином (ДБА) и на холоде лизировали клетки для последующего

анализа содержания дофамина методом ВЭЖХ-ЭД. К части чашек с клетками добавляли 100 мкл RIPA-буфера, содержащего ингибиторы протеаз и фосфатаз (Sigma, США), и на холоде лизировали для последующего анализа содержания про- и антиапоптотических белков методом Вестерн-блотт.

В экспериментах *in vivo* животные были подвергнуты эвтаназии в сроки в соответствии со структурой эксперимента путем дислокации шейных позвонков с последующей декапитацией. На холоде был извлечен мозг и произведена диссекция мозга на следующие отделы: префронтальная кора, стриатум, кора, средний мозг, мозжечок. Образцы мозга замораживали в жидкому азоте и хранили при температуре -80. В исследовании по моделированию ранней стадии паркинсонизма для валидации модели половину мозга отсекали и фиксировали погружением в нейтральный 4% формалин для последующего имmunогистохимического анализа, из второй половины выделяли вышеупомянутые структуры.

3.7.1 Вестерн-блотт

Содержание субъединиц Na,K-АТФазы и активацию сигнальных каскадов анализировали методом Вестерн-блотт. Образцы тканей лизировали в RIPA-буфере («Sigma») с добавлением ингибиторов протеаз и фосфатаз (1:1000, «Sigma»). Полученный лизат центрифугировали при 14 000g в течение 20 мин при 4°C, затем отбирали супернатант, в котором измеряли концентрацию белка с помощью набора реактивов «DC Protein Assay Kit» («Bio-Rad»). Разделение белков осуществляли электрофорезом в поликарбидном геле по Леммли, после чего белки переносили на PVDF-мембрану («Whatman») и инкубировали с антителами согласно рекомендациям производителей. Для анализа использовали первичные антитела к p-Akt (Ser473), Akt, p-ERK1/2 (Thr202/Tyr204), ERK1/2, Bak, Bax, Bcl-2, Bcl-xL («Cell Signaling Technology»), NR2B, GAPDH и β-актину («Santa Cruz Biotechnology»), NKA α1 a6F («DSHB»), NKA α2, NKA α3 («ThermoScientific») и вторичные антикроличьи и антимышечные антитела («Cell Signaling Technology»), конъюгированные с пероксидазой хрина (таблица 1).

Мембранны проявляли при помощи хемилюминесцентного субстрата «SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate» («Thermo Scientific»), люминесценцию детектировали при помощи системы гельдокументирования «ChemiDoc MP» («Bio-Rad»), интенсивность люминесценции рассчитывали с помощью программы «Image Lab 6.0.1» («Bio-Rad»). Активацию киназ оценивали по отношению интенсивности полос фосфорилированной формы киназы к интенсивности полос её общей формы (уровень фосфорилирования).

Таблица 1. Использованные в исследовании антитела.

Название антител	Метод	Производитель
p-Akt (Ser473)	Вестерн-блот	«Cell Signaling Technology»
Akt	Вестерн-блот	«Cell Signaling Technology»
p-ERK1/2 (Thr202/Tyr204)	Вестерн-блот	«Cell Signaling Technology»
ERK1/2	Вестерн-блот	«Cell Signaling Technology»
Bak	Вестерн-блот	«Cell Signaling Technology»
Bax	Вестерн-блот	«Cell Signaling Technology»
Bcl-2	Вестерн-блот	«Cell Signaling Technology»
Bcl-xL	Вестерн-блот	«Cell Signaling Technology»
NR2B	Вестерн-блот	Santa CruzBiotechnology»
GAPDH	Вестерн-блот	Santa CruzBiotechnology»
β-актин	Вестерн-блот	Santa CruzBiotechnology»
NKA α1	Вестерн-блот	«DSHB»
NKA α2	Вестерн-блот	«ThermoScientific»
NKA α3	Вестерн-блот	«ThermoScientific»
ТГ	иммуногистохими я	Abcam

Anti-MT-CO1 Ms	иммуногистохимия	Invitrogen
AntiSOD	иммуногистохимия	Invitrogen

3.7.2. Иммуногистохимия

Иммуногистологическую оценку содержания ТГ-положительных нейронов черной субстанции и их аксонов в стриатуме определяли на базе Лаборатории функциональной нейрохимии Отдела исследований мозга ФГБНУ «Научного центра неврологии» под руководством старшего научного сотрудника, к.б.н. Воронкова Д.Н.

Образцы мозга фиксировали в формалине на фосфатном солевом буфере и проводили через этанол и хлороформ для заливки в парафин. Серии фронтальных срезов толщиной 10 мкм получали с использованием криотома Leica SR2000. Для выявления тирозингидроксилазы (ТГ) (1:250, T8700 Anti-TH Rb(Sigma), ab 112 Anti-TH Rb(Abcam))) использовали моноклональные кроличьи антитела, цитохромоксидазы (ЦО) - моноклональные мышиные антитела (1:200, Lot 459600-Anti-MT-CO1 Ms(Invitrogen)), и супероксиддисмутазы (СОД) (1:200, PA1-30195, AntiSOD(Invitrogen)) (таблица 1). От каждого животного отбирали 12-18 срезов, взятых на уровне 0,48-1,80 медиолатерально (Paxinos, 2001). Препараты изучали и фотографировали на микроскопе Nikon Eclipse Ni-U, оснащенного фотокамерой Nikon DS-Qi. Подсчет нейронов и интенсивность иммуноокрашивания выполняли в программе ImageJ.

3.7.3. Определение активности Na,K-АТФазы

Активность Na,K-АТФазы определяли по количеству выделяющегося в ходе реакции неорганического фосфата по методу, разработанному Rathbun and Betlach с модификациями [Rathbun, 1969]. Все операции проводили на льду. Образцы мозжечка и среднего мозга взвешивали, после чего гомогенизировали с помощью стеклянно/тефлонового пестикового гомогенизатора Schuett Homgen Plus

(SchuettBiotec GmbH, Германия) в 10-кратном объеме буфера для выделения (0,25 М сахароза, 1 мМ ЭДТА, 20 мМ Трис, pH 7,45), содержащего коктейли ингибиторов протеаз и фосфатаз (Sigma, США), добавляемых непосредственно перед использованием. Гомогенат центрифугировали в течение 5 минут при 2000 g при 4° С. Супернатант переносили в отдельную емкость и центрифугировали в течение 15 минут при 14000 g 4° С. Синаптосомальную фракцию повторно сuspendировали в буфере для выделения и хранили при -70° С. Для определения концентрации белка часть препарата лизировали в RIPA-буфере, содержащем коктейли ингибиторов протеаз и фосфатаз (Sigma, США), и определяли концентрацию белка с помощью набора DC Protein Assay Kit (Bio-Rad, США). Синаптосомальную фракцию с концентрацией белка 1 мг/мл инкубировали в присутствии 0,065% дезоксихолата натрия на холодной водяной бане в течение 30 мин. Полученный препарат Na, K-АТФазы (4 мкг белка на образец) добавляли в реакционную среду (130 мМ NaCl, 20 мМ KCl, 3 мМ MgCl₂, 30 мМ имидазола, pH 7,5). Реакцию запускали добавлением АТФ в конечной концентрации 3 мМ. Реакционную смесь инкубировали при 37° С в течение 15 мин. Реакцию останавливали добавлением 0,1 мл охлажденного 3 М ацетатного буфера (pH 4,3), содержащего 3,7% формальдегида. Для определения количества выделившегося неорганического фосфата к образцу добавляли 0,02 мл 2%-ного гептамолибдата аммония и 0,02 мл свежеприготовленного 0,3%-ного раствора хлорида Sn (II). Образцы тщательно перемешивали и выдерживали в течение 10 мин при комнатной температуре. Оптическую плотность раствора измерялась при 735 нм с помощью планшетного ридера Synergy H1 (BioTek, Winooski, VT, USA). Активность Na,K-АТФазы рассчитывали как разницу между оптической плотностью в исследуемом образце и в образце, содержащем 4 мМ уабаина.

3.7.4. Высокоэффективная жидкостная хроматография с электрохимическим детектированием (ВЭЖХ-ЭД)

Оценку содержанияmonoаминов в гомогенатах головного мозга проводили на базе Лаборатории гемореологии, гемостаза и фармакокинетики ФГБНУ

«Научного центра неврологии» под руководством старшего научного сотрудника, к.б.н. Абаймова Д.А.

Содержание моноаминов дофамина, метаболита дигидроксифенилуксусной кислоты (ДОФУК) и серотонина определяли методом ВЭЖХ-ЭД в образцах коры и стриатума мозга экспериментальных животных. Образцы стриатума и коры гомогенизировали в 20- и 10-кратных объемах, соответственных 0,1 N HClO₄ с добавлением в качестве внутреннего стандарта 3,4-дигидроксибензиламина гидробромида в концентрации 0,25 нмоль/мл. Для гомогенизации использовали стеклянно/тэфлоновый пестиковый гомогенизатор Shuett Homgen Plus (0,2 мм) (Schuet Biotec GmbH, Германия). Образцы центрифугировали при 10 000 g в течение 15 мин при 4° С. Разделение исследуемых веществ проводили на обращенно-фазовой колонке Nucleodur C18 Gravity, 4,6 × 250 мм, диаметр пор 5 мкм (Mashery-Nagel GmbH & Co. KG, Германия). Измерения проводили с помощью электрохимического детектора EC3000 (RECIPE Chemicals + Instruments GmbH, Германия), оснащенного ячейкой ClinLab ECD, модель Sputnik, с рабочим электродом из стеклоуглерода (+0,85 В) и электродом сравнения Ag/AgCl. Для регистрации проб и обработки хроматограмм использовали программное обеспечение MULTICHROM 1.5 (AMPERSAND, Россия). Все реактивы, используемые для анализа, были аналитического класса. Единицы измерения выражены в нмоль/г массы влажной ткани.

3.7.5. Масс-спектрометрия с индуктивно связанный плазмой (МС-ИСП) и Атомно-эмиссионная спектрометрия с индуктивно связанный плазмой (АЭС-ИСП)

Оценку содержания ионов марганца, натрий и калия проводили на кафедре аналитической химии Химического факультета МГУ им. М. В. Ломоносова под руководством к.х.н. Серегиной И.Ф.

Содержание Mn в образцах мозга определяли методом масс-спектрометрии с индуктивно связанный плазмой (МС-ИСП) на квадрупольном ICP-MS Agilent 7500c (Agilent Technologies, Япония). Образцы стриатума и мозжечка взвешивали

и инкубировали в 100 мкл 65%-ной азотной кислоты в течение 2 ч при 950° С, после чего инкубировали в 50 мкл 30%-ной перекиси водорода в течение 15 мин при 80° С. Для комплексообразования с металлом образцы мозга инкубировали с 50 мкл соляной кислоты в течение 15 мин при 80 °С. Затем образцы разбавляли до объема 1 мл водой Milli-Q и использовали для анализа содержания Mn²⁺. Данные получали и обрабатывали с помощью программного пакета ICP-MS ChemStation (версия G1834B; Agilent Technologies). Для учета влияния матрицы применялся метод внутреннего стандарта. Для приготовления калибровочных растворов и растворов внутреннего стандарта (Rh) использовались одноэлементные стандартные растворы Mn и Rh объемом 1000 мкг/мл (High-Purity Standards, США). В работе использовались изотопы 55Mn и 103Rh. Для приготовления всех растворов использовалась высокочистая вода для ИСП-МС анализа (18,2 МΩ/см), полученная на установке очистки Milli-Q (Millipore Simplicity, Франция). Пустые пробирки подвергались тем же процедурам инкубирования, что и образцы. Концентрация Mn в образцах мозга выражена в частях на миллион, в расчете на влажный вес ткани.

Для определения содержания Na⁺ и K⁺ в тканях использовали атомно-эмиссионный спектрометр ICP-AES 720-ES (Agilent Technologies, США) с аксиальной конфигурацией обзора плазмы. Спектрометр ICP-AES был оснащен осевой кварцевой горелкой (инжекторная трубка с внутренним диаметром 1,8 мм, Glass Expansion, Австралия), двухпроходной стеклянной циклонической камерой атомизации (Agilent Technologies) и концентрическим стеклянным атомизатором Seaspray для ввода пробы. Для ввода всех образцов использовался автодозатор SPS3 (Aim Lab, Австралия), причем каждый образец вводился в двух повторах. Результаты усреднялись, относительное стандартное отклонение результатов не превышало 3,5%. Для повышения воспроизводимости результатов внутренний стандарт (скандий, 20 ppm, стабилизированный 5 мас. % азотной кислоты) добавлялся в режиме онлайн во все пробы, при этом разбавление анализируемой пробы составляло менее 5 об%. Калибровочные стандарты Na, K (10 000 ppm) и

Sc (1000 ppm) были приобретены в компании Inorganic Ventures, США. Диапазон измеряемых содержаний элементов составлял от 10 до 10 000 ppb. Эмиссионные линии и режимы измерений элементов совпадали с рекомендациями стандарта ISO 11885:2007. Работали эмиссионные линии натрия (568.821 (I), 588.995 (I), 589.592 (I)) и калия (766.491 (I), 769.897 (I)). Контроль точности (правильности и прецизионности) измерений проводился с учетом требований стандарта ISO 5725-2:2019.

3.8. Статистическая обработка данных

Анализ данных проводили с помощью программного обеспечения GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, Inc., США). Для проверки выборки на нормальное распределение использовали критерий Шапиро-Уилка. Для оценки различий между двумя группами использовали непарный t-test, в случае более двух групп использовали односторонний (one-way ANOVA) или двусторонний анализа дисперсии (two-way ANOVA) с тестом множественного сравнения Сидак или Тьюки. Различия считали значимыми при $p < 0,05$. Данные представлены в виде среднее значение \pm стандартная ошибка среднего (MEAN \pm SEM).

4. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

4.1. Механизмы влияния ингибиторной функции кардиотонического стероида уабаина на функционирование Na,K -АТФазы в культуре клеток нейробластомы человека SH-SY5Y

Результаты настоящего исследования опубликованы в работе Lopachev et al., 2021. Схема исследования представлена на рисунке 1.

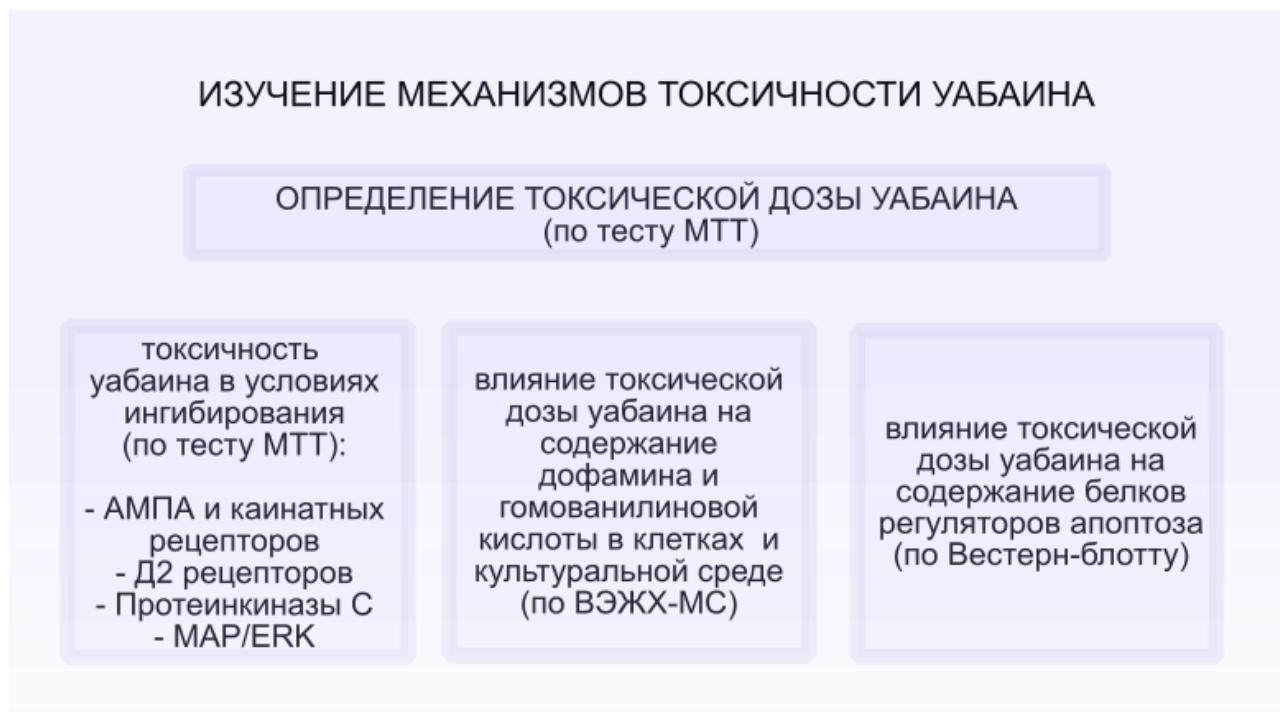


Рисунок 1. Структура эксперимента.

4.1.1. Дозозависимое влияние уабаина на жизнеспособность недифференцированной и дифференцированной по дофаминергическому типу культуры нейробластомы человека SH-SY5Y

На культуре клеток нейробластомы человека SH-SY5Y, недифференцированной и дифференцированной по дофаминергическому типу, оценивали влияние уабаина в концентрациях 1 нМ, 10 нМ, 100 нМ и 1 мкм на жизнеспособность клеток по МТТ-тесту после 24 ч инкубации.

Инкубация с 1 нМ уабаина не влияла на жизнеспособность недифференцированной культуры SH-SY5Y ($100,1 \pm 1,606\%$) относительно контроля ($100 \pm 1,474\%$). Инкубация клеток с 10 нМ уабаином приводила к

снижению жизнеспособности недифференцированной культуры на 10% ($89,69 \pm 1,371\%$, $F(4, 55) = 745,9$, $p < 0,001$), а при 100 нМ и 1 мкМ уабаина - на 49% ($51,32 \pm 1,666\%$, $F(4, 55) = 745,9$, $p < 0,001$) и 70% ($29,68 \pm 0,6883\%$, $F(4, 55) = 745,9$, $p < 0,001$) соответственно (рисунок 2А) относительно интактной культуры, жизнеспособность которой была принята за 100%.

Уабайн в концентрации 1 нМ и 10 нМ не оказывал влияния на жизнеспособность дифференцированной по дофаминергическому типу культуры нейробластомы SH-SY5Y ($96,55 \pm 3,493\%$ и $102,5 \pm 1,551\%$ соответственно относительно $100 \pm 1,171\%$ в контроле). Инкубация клеток с 100 нМ уабаином вызывала снижение жизнеспособности культуры на 27% ($72,71 \pm 3,754\%$, $F(4, 55) = 225,8$, $p < 0,001$), а при 1 мкМ уабаина — на 41% ($58,88 \pm 1,187\%$, $F(4, 55) = 225,8$, $p < 0,001$) после 24 часов инкубации по данным МТТ-теста по сравнению с интактной культурой (рисунок 2Б).

Следовательно, уабайн проявил более выраженную (в 10 раз выше) токсичность для недифференцированной культуры, чем для дифференцированной, поскольку минимальная токсичная концентрация уабаина для недифференцированной культуры SH-SY5Y составила 10 нМ, а для дифференцированной культуры - 100 нМ.

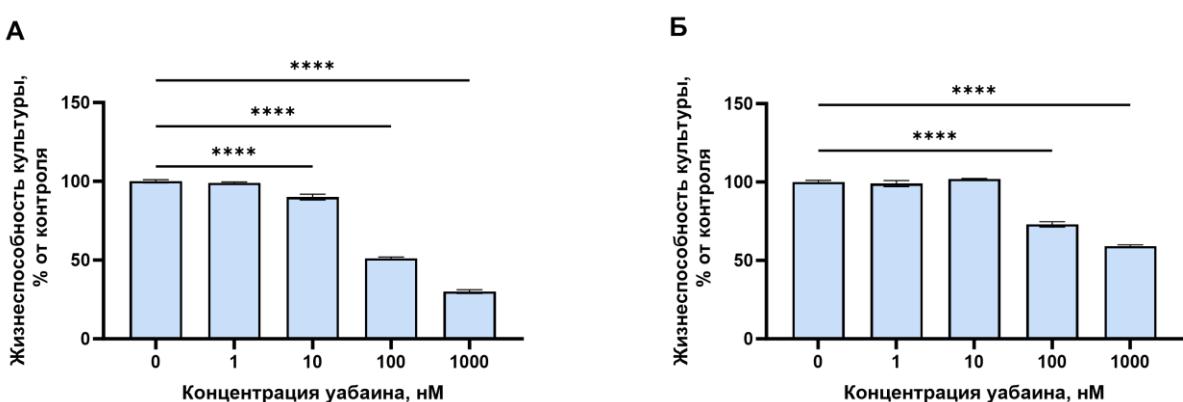


Рисунок 2. Влияние 24-часовой инкубации уабаина в концентрациях 1 нМ, 10 нМ, 100 нМ и 1 мкМ на жизнеспособность недифференцированной (А) и дифференцированной (Б) культуры нейробластомы SH-SY5Y по данным МТТ-теста. Данные представлены в виде среднего значения \pm SEM, $N = 12$, сравнение групп проведено анализом one-way ANOVA с тестом множественного сравнения Сидак, *— $p < 0,01$, **— $p < 0,001$

Было показано, что разница в минимальной токсической концентрации уабаина для недифференцированной и дифференцированной по дофаминергическому типу нейробластомы составляет 1 порядок. Данное различие может быть обусловлено запуском дофамин-зависимых внутриклеточных сигнальных каскадов, активирующихся в дифференцированной культуре клеток нейробластомы. Вместе с этим известно, что использование ретиноевой кислоты в качестве агента дифференцировки способствует лучшей выживаемости клеток при действии токсинов, таким образом наблюдаемое различие в токсической концентрации может быть обусловлено свойствами дифференцировщика [Cheung, 2009].

4.1.2. Исследование вклада дофаминовых D2-рецепторов и AMPA и кайнатных глутаматных рецепторов в реализацию токсического эффекта уабаина на недифференцированную и дифференцированную культуру нейробластомы человека SH-SY5Y

Для исследования участия дофаминовых D2-рецепторов в реализацию токсического действия уабаина провели инкубирование культуры в течение 24 часов с 10 нМ или 100 нМ уабаина, 100 мкМ галоперидола — селективного ингибитора D2-рецепторов, и со смесью обоих соединений. Было обнаружено, что инкубация как недифференцированной, так и дифференцированной культуры клеток с галоперидолом в концентрации 100 мкМ не снижает жизнеспособность клеток ($96,58 \pm 1,13\%$ по сравнению с $100 \pm 1,64\%$ в контроле и $103,8 \pm 5,24\%$ по сравнению с $100 \pm 4,89\%$ в контроле соответственно). При совместной инкубации с ингибитором уабаин не снизил свою токсичность. Так, в недифференцированной культуре при инкубации с 10 нМ уабаина жизнеспособность снизилась на 9% ($90,98 \pm 1,37\%$, $p < 0,001$, уабаин: $F(2, 44) = 176,2$, ингибитор: $F(1, 44) = 0,085$, уабаин \times ингибитор: $F(2, 44) = 2,399$), а при инкубации с 10 нМ уабаина и 100 мкМ галоперидола — на 8% ($91,86 \pm 0,89\%$, $p = 0,05$, уабаин: $F(2, 44) = 176,2$, ингибитор: $F(1, 44) = 0,085$, уабаин \times ингибитор: $F(2, 44) = 2,399$). Аналогично, при инкубации недифференцированной культуры клеток с 100 нМ уабаина

жизнеспособность снизилась на 33% ($66,95 \pm 2,4\%$, $p < 0,0001$, уабаин: $F(2, 44) = 176,2$, ингибитор: $F(1, 44) = 0,085$, уабаин \times ингибитор: $F(2, 44) = 2,399$), а при совместной инкубации с ингибитором — на 29,3% ($70,67 \pm 1,7\%$, $F(5, 44) = 72,61$, $p < 0,0001$, уабаин: $F(2, 44) = 176,2$, ингибитор: $F(1, 44) = 0,085$, уабаин \times ингибитор: $F(2, 44) = 2,399$, рис. 3А). В дифференцированной культуре клеток жизнеспособность статистически значимо снижалась при инкубации с 100 нМ уабаина на 40,7% ($59,3 \pm 3,24\%$, $p < 0,0001$, уабаин: $F(2, 43) = 39,59$, ингибитор: $F(1, 43) = 0,286$, уабаин \times ингибитор: $F(2, 43) = 0,2129$), что согласуется с предыдущим экспериментом, а при совместной инкубации уабаина с галопериодолом — на 42,4% ($57,56 \pm 5,9\%$, $F(5, 49) = 5,629$, $p < 0,0001$, уабаин: $F(2, 43) = 39,59$, ингибитор: $F(1, 43) = 0,286$, уабаин \times ингибитор: $F(2, 43) = 0,2129$, рисунок 3Б).

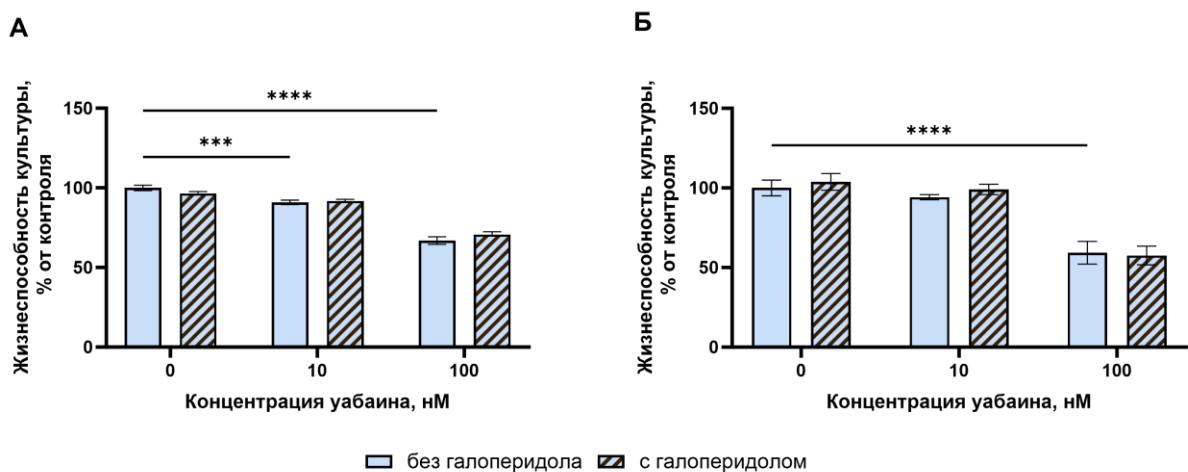


Рисунок 3. Влияние 10 нМ уабаина, 100 нМ уабаина и 100 мкМ галопериодола на жизнеспособность недифференцированной (А) и дифференцированной по дофаминергическому типу (Б) нейробластомы SH-SY5Y после 24 ч инкубации по данным МТТ-теста. Данные представлены в виде среднего значения \pm SEM, N = 12, сравнение групп проведено анализом two-way ANOVA с тестом множественного сравнения Сидак, ***— $p < 0,001$, ****— $p < 0,0001$

Для исследования вклада АМРА и кайнатных рецепторов в токсичность уабаина провели инкубирование культуры в течение 24 часов с 10 нМ или 100 нМ

убаина, 100 нМ CNQX – ингибитора AMPA и кайнатных рецепторов, и со смесью обоих соединений. Инкубация в течение 24 ч с 100 нМ CNQX не вызывала изменений жизнеспособности недифференцированной ($93,96\pm1,0\%$ относительно контроля $100\pm2,1\%$) и дифференцированной ($91,94\pm1,57\%$ относительно контроля $100\pm4,8\%$) культуры. 100 нМ CNQX не оказал влияния на токсичность убаина в обеих культурах. В недифференцированной культуре жизнеспособность клеток снизилась на 11 % ($88,63\pm1,08\%$, $p<0,01$, убаин: $F(2, 49) = 145,1$, ингибитор: $F(1, 49) = 0,2126$, убаин×ингибитор: $F(2, 49) = 3,236$) при инкубации с 10 нМ убаина и на 31% ($68,76\pm10,81\%$, $p<0,0001$, убаин: $F(2, 49) = 145,1$, ингибитор: $F(1, 49) = 0,2126$, убаин×ингибитор: $F(2, 49) = 3,236$) при инкубации с 100 нМ убаином, а при совместном введении с 100 нМ CNQX – на 9 % ($91,5\pm2,27\%$, $p=0,05$, убаин: $F(2, 49) = 145,1$, ингибитор: $F(1, 49) = 0,2126$, убаин×ингибитор: $F(2, 49) = 3,236$) и на 34% ($65,71\pm11,06\%$, $p<0,0001$, убаин: $F(2, 49) = 145,1$, ингибитор: $F(1, 49) = 0,2126$, убаин×ингибитор: $F(2, 49) = 3,236$) соответственно (рисунок 4А). В дифференцированной культуре жизнеспособность клеток снизилась на 35% ($64,94\pm2,83\%$, $p<0,0001$, убаин: $F(2, 50) = 78,94$, ингибитор: $F(1, 50) = 0,1230$, убаин×ингибитор: $F(2, 50) = 2,375$) при инкубации с 100 нМ убаина, а при совместном введении с 100 нМ CNQX – на 31 % ($69,23\pm4,69\%$, $p<0,0001$, убаин: $F(2, 50) = 78,94$, ингибитор: $F(1, 50) = 0,1230$, убаин×ингибитор: $F(2, 50) = 2,375$, рисунок 4Б).

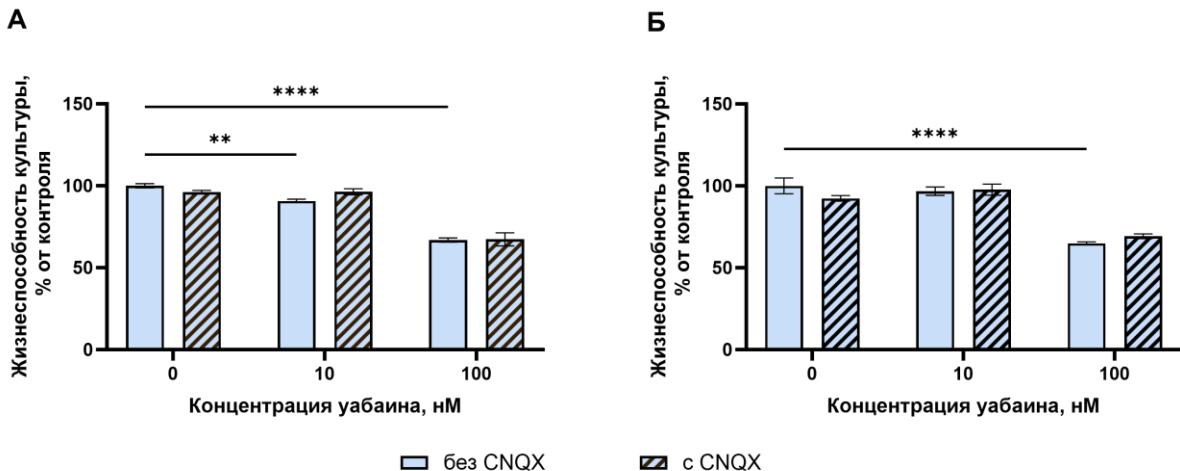


Рисунок 4. Влияние 10 нМ уабаина, 100 нМ уабаина и 100 нМ CNQX на жизнеспособность недифференцированной (А) и дифференцированной по дофаминергическому типу (Б) нейробластомы SH-SY5Y после 24 ч инкубации по данным МТТ-теста. Данные представлены в виде среднего значения \pm SEM, N = 12, сравнение групп проведено анализом two-way ANOVA с тестом множественного сравнения Сидак ***—p<0,001, ****—p<0,0001

Таким образом, в настоящем эксперименте показано, что токсичность уабаина для культуры недифференцированной и дифференцированной по дофаминергическому типу нейробластомы SH-SY5Y не зависит от активации дофаминовых D2-рецепторов, а также AMPA и кайнатных ионотропных глутаматных рецепторов.

4.1.3. Исследование вклада протеинкиназы С и путей MEK/ERK в реализацию токсического эффекта уабаина на недифференцированную и дифференцированную культуру нейробластомы человека SH-SY5Y

Для оценки участия протеинкиназы С (ПК С) в токсичности уабаина культуру нейробластомы инкубировали в течение 24 часов с 10 нМ или 100 нМ уабаина, 100 нМ хелеритрина – ингибитора ПК С, и со смесью обоих соединений. Инкубация в течение 24 ч с 100 нМ хелеритрина не вызывала изменений жизнеспособности недифференцированной (95,48 \pm 7,58% относительно контроля

$100 \pm 5,02\%$) и дифференцированной ($99,49 \pm 8,34\%$ относительно контроля $100 \pm 6,07\%$) культуры. 10 нМ уабаина и 100 нМ уабаина снижали жизнеспособность недифференцированной культуры на 8% ($92,19 \pm 2,82\%$, $p < 0,05$, *уабайн*: $F(2, 57) = 10,22$, *ингибитор*: $F(1, 57) = 9,428$, *уабайн* \times *ингибитор*: $F(2, 57) = 4,092$) и на 28% ($71,95 \pm 4,91\%$, $p < 0,0001$, *уабайн*: $F(2, 57) = 10,22$, *ингибитор*: $F(1, 57) = 9,428$, *уабайн* \times *ингибитор*: $F(2, 57) = 4,092$) соответственно. В свою очередь добавление 100 нМ хелеритрина достоверно снижало токсичность уабаина в обеих концентрациях ($99,47 \pm 4,65\%$, $p < 0,01$ по сравнению с 10 нМ уабаином и $79,57 \pm 6,1\%$, $p < 0,01$ по сравнению с 100 нМ уабаином, *уабайн*: $F(2, 57) = 10,22$, *ингибитор*: $F(1, 57) = 9,428$, *уабайн* \times *ингибитор*: $F(2, 57) = 4,092$, рисунок 5А). Жизнеспособность дифференцированной культуры в присутствии 100 нМ уабаина снижалась на 28% ($71,97 \pm 4,234\%$, $p < 0,0001$, *уабайн*: $F(2, 49) = 39,91$, *ингибитор*: $F(1, 49) = 7,84$, *уабайн* \times *ингибитор*: $F(2, 49) = 2,038$), в то время как при совместной инкубации 100 нМ уабаина и 100 нМ хелеритрина – на 8% ($92,05 \pm 8,24\%$, $p < 0,01$ по сравнению с 100 нМ уабаином, *уабайн*: $F(2, 49) = 39,91$, *ингибитор*: $F(1, 49) = 7,84$, *уабайн* \times *ингибитор*: $F(2, 49) = 2,038$, рисунок 5Б).

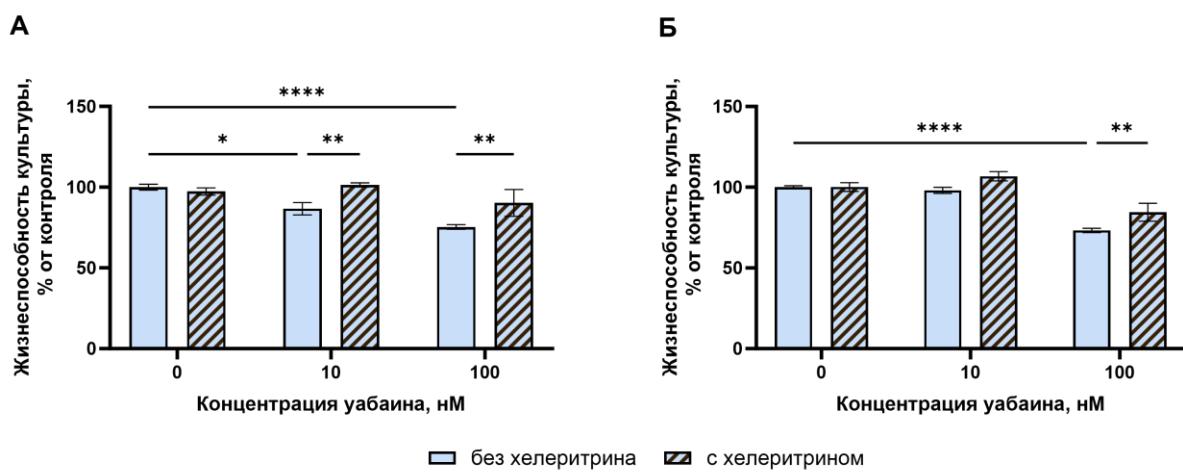


Рисунок 5. Влияние 10 нМ уабаина, 100 нМ уабаина и 100 нМ хелеритрина на жизнеспособность недифференцированной (А) и дифференцированной по дофаминергическому типу (Б) нейробластомы SH-SY5Y после 24 ч инкубации по

данным МТТ-теста. Данные представлены в виде среднего значения \pm SEM, N = 12, сравнение групп проведено анализом two-way ANOVA с тестом множественного сравнения Сидак, *—p<0,05, **—p<0,01, ***—p<0,0001

В эксперименте с ингибиторным анализом с использованием ингибитора пути MEK/ERR PD0325901 в концентрации 1 мкМ было обнаружено, что 10 нМ уабаина при 24-часовой инкубации вызвали снижение жизнеспособности культуры на 6% ($93,7 \pm 1,49\%$, p<0,01, уабаин: $F(2, 59) = 46,09$, ингибитор: $F(1, 59) = 1,818$, уабаин×ингибитор: $F(2, 59) = 3,17$), а 100 нМ уабаина - на 37% ($63,11 \pm 0,9\%$, p<0,0001, уабаин: $F(2, 59) = 46,09$, ингибитор: $F(1, 59) = 1,818$, уабаин×ингибитор: $F(2, 59) = 3,17$). PD0325901 не влиял на токсический эффект 100 нМ уабаина ($65 \pm 1,21\%$), однако снизил токсичность уабаина в концентрации 10 нМ ($99 \pm 1,76\%$, p< 0,01 по сравнению с 10 нМ уабаина, уабаин: $F(2, 59) = 46,09$, ингибитор: $F(1, 59) = 1,818$, уабаин×ингибитор: $F(2, 59) = 3,17$). Жизнеспособность дифференцированной культуры в присутствии 100 нМ уабаина снижалась на 26% ($74,01 \pm 4,77\%$, p<0,0001, уабаин: $F(2, 63) = 101,6$, ингибитор: $F(1, 63) = 3,035$, уабаин×ингибитор: $F(2, 63) = 0,6708$), в то время как при совместной инкубации 100 нМ уабаина и 100 нМ хелеретрина – на 31,1% ($68,9 \pm 4,98\%$, p<0,0001, уабаин: $F(2, 63) = 101,6$, ингибитор: $F(1, 63) = 3,035$, уабаин×ингибитор: $F(2, 63) = 0,6708$). В то же время сам 1 мкМ PD0325901 не влиял на жизнеспособность обеих культур (рисунок 6).

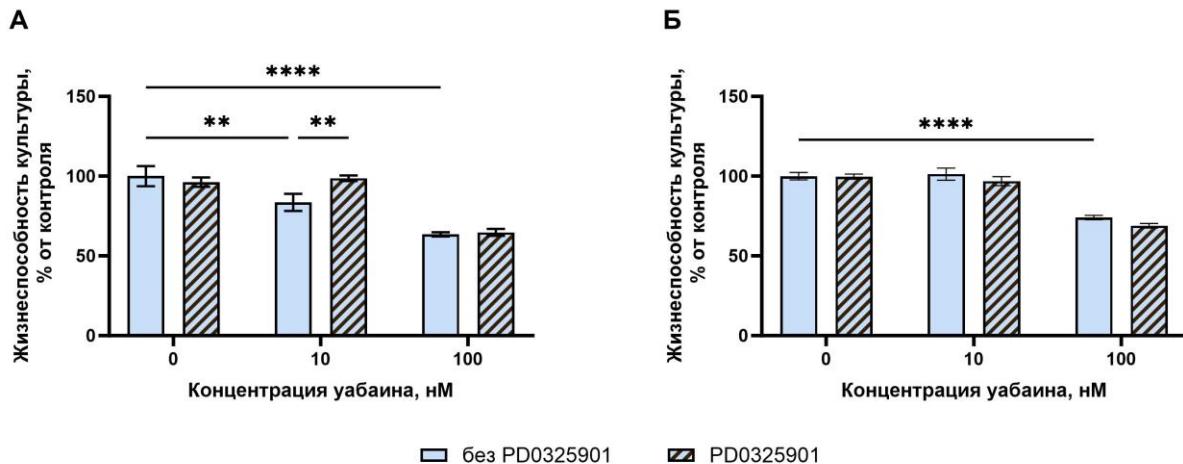


Рисунок 6. Влияние 10 нМ уабаина, 100 нМ уабаина и 1 мкМ PD032590 на жизнеспособность недифференцированной (А) и дифференцированной по дофаминергическому типу (Б) нейробластомы SH-SY5Y после 24 ч инкубации по данным МТТ-теста. Данные представлены в виде среднего значения \pm SEM, N = 12, сравнение групп проведено анализом two-way ANOVA с тестом множественного сравнения Сидак, **—p<0,01, ****—p<0,0001

Таким образом, было показано, что в реализации токсического эффекта уабаина на недифференцированной и дифференцированной культуре нейробластомы SH-SY5Y принимает участие ПК С. Примечательно, что в то время как жизнеспособность клеток дифференцированной культуры восстанавливается практически до контрольных значений при инкубации с хелеритрином, в недифференцированной культуре ингибирование ПК С не приводит к значительному увеличению выживаемости клеток. Также было обнаружено, что токсичность уабаина в невысоких концентрациях связана с МАР-киназным путем, так как применение ингибитора PD032590 препятствует гибели нейронов при инкубации с 10 нМ уабаином, но не препятствует при инкубации с 100 нМ уабаином.

4.1.4. Влияние убацина на содержание дофамина в недифференцированной и дифференцированной культуре нейробластомы SH-SY5Y

Для оценки влияния убацина на количество дофамина, содержащегося в клетках культуры и выделяемого в культуральную среду, а также метаболита дофамина гомованилиновой кислоты (ГВК) в клетках культуру инкубировали с 10 нМ или 100 нМ убацином в течение 1 часа.

В недифференцированной культуре инкубация с 10 нМ убацином вызвала снижение уровня дофамина в 6,1 раза в культуральной среде ($0,7145\pm0,054$ пг/мг по сравнению с $4,335\pm1,424$ пг/мг в контроле, $p<0,05$, $F(2, 9) = 10,90$) и в 3,2 раза в лизатах клеток ($0,18\pm0,01$ пг/мг по сравнению с $0,58\pm0,08$ пг/мг в контроле, $p<0,05$, $F(2, 9) = 27,63$). Инкубация с 100 нМ привела к снижению дофамина в культуральной среде в 3,4 раза ($1,292\pm0,456$ пг/мг по сравнению с $4,335\pm1,424$ пг/мг в контроле, $p<0,05$, $F(2, 9) = 10,90$) и в лизатах в 2,6 раза ($0,22\pm0,072$ пг/мг по сравнению с $0,58\pm0,08$ пг/мг в контроле, $p<0,05$, $F(2, 9) = 27,63$, рисунок 7).

Дифференцировка культуры нейробластомы при помощи РК и ТФА привела к увеличению содержания дофамина в культуральной среде в 6,7 раза ($29,11\pm1,117$ пг/мг по сравнению с $4,335\pm1,424$ пг/мг в недифференцированной культуре, $p<0,001$, $t=26,55$, $df=6$), что свидетельствует о дифференцировке клеток по дофаминергическому типу. Инкубация с 10 нМ убацином привела к снижению содержания дофамина в культуральной среде в 3,2 раза ($8,99\pm2,76$ пг/мг по сравнению с $29,11\pm1,117$ пг/мг в контроле, $p<0,05$, $F(2, 9) = 39,25$), а инкубация с 100 нМ убацином – в 1,8 раз ($16,2\pm5,32$ пг/мг по сравнению с $29,11\pm1,117$ пг/мг в контроле, $p<0,05$, $F(2, 9) = 39,25$). Вместе с этим инкубация с 10 нМ и 100 нМ убацина не вызывала изменения содержания дофамина в лизатах ($0,2\pm0,004$ пг/мг и $0,19\pm0,011$ пг/мг соответственно против $0,15\pm0,015$ пг/мг в контроле, $F(2, 9) = 4,189$, рисунок 7).

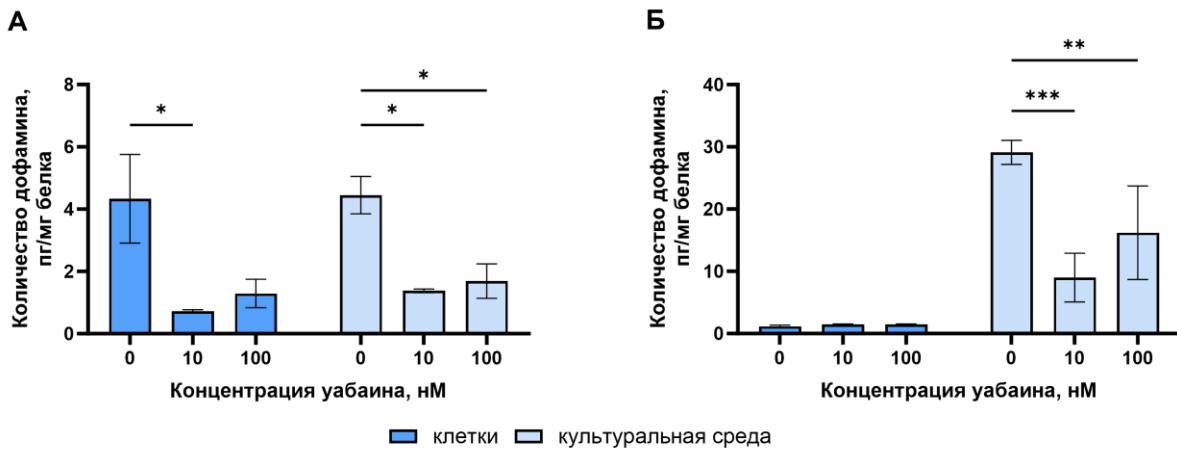


Рисунок 7. Влияние 10 нМ и 100 нМ уабаина на содержание дофамина в культуральной среде и лизатах клеток недифференцированной (А) и дифференцированной по дофаминергическому типу (Б) нейробластомы SH-SY5Y после 1 ч инкубации. N=4, Данные представлены в виде среднего (пг моноамина / мг белка) ±SEM, сравнение групп проведено анализом one-way ANOVA с тестом множественного сравнения Сидак, * - p<0,05, ** - p<0,01, *** - p<0,001

Количество ГВК в лизатах культуры, дифференцированной ретиноевой кислотой и ТФА ($6,43 \pm 0,66$ пг/мг) не изменялось по сравнению с недифференцированной культурой нейробластомы ($7,05 \pm 0,63$ пг/мг). Инкубация в течение 1 ч с 10 нМ уабаином приводила к уменьшению количества ГВК в лизатах для недифференцированной ($2,22 \pm 0,07$ пг/мг, $p < 0,01$, $F(2, 9) = 28,69$) и дифференцированной ($2,82 \pm 0,066$ пг/мг, $p < 0,05$, $F(2, 9) = 18,34$) нейробластомы. В свою очередь, инкубация в течение 1 ч с 100 нМ уабаином приводила к уменьшению количества ГВК в лизатах для недифференцированной ($2,46 \pm 0,36$ пг/мг, $p < 0,01$, $F(2, 9) = 28,69$) и дифференцированной ($2,484 \pm 0,159$ пг/мг, $p < 0,05$, $F(2, 9) = 18,34$) нейробластомы (рисунок 8). Вместе с этим, в дифференцированной культуре при инкубации с уабаином в концентрации 10 нМ ($0,07 \pm 0,0002$, $p < 0,0001$, $F(2, 9) = 417,5$) и 100 нМ ($0,08 \pm 0,002$, $p < 0,0001$, $F(2, 4) = 417,5$) происходит увеличение соотношения ГВК/ДА в 2,9 раз и 3,2 раз

соответственно относительно контроля ($0,002 \pm 0,0018$, рисунок 8), что свидетельствует об ускорении метаболизма дофамина.

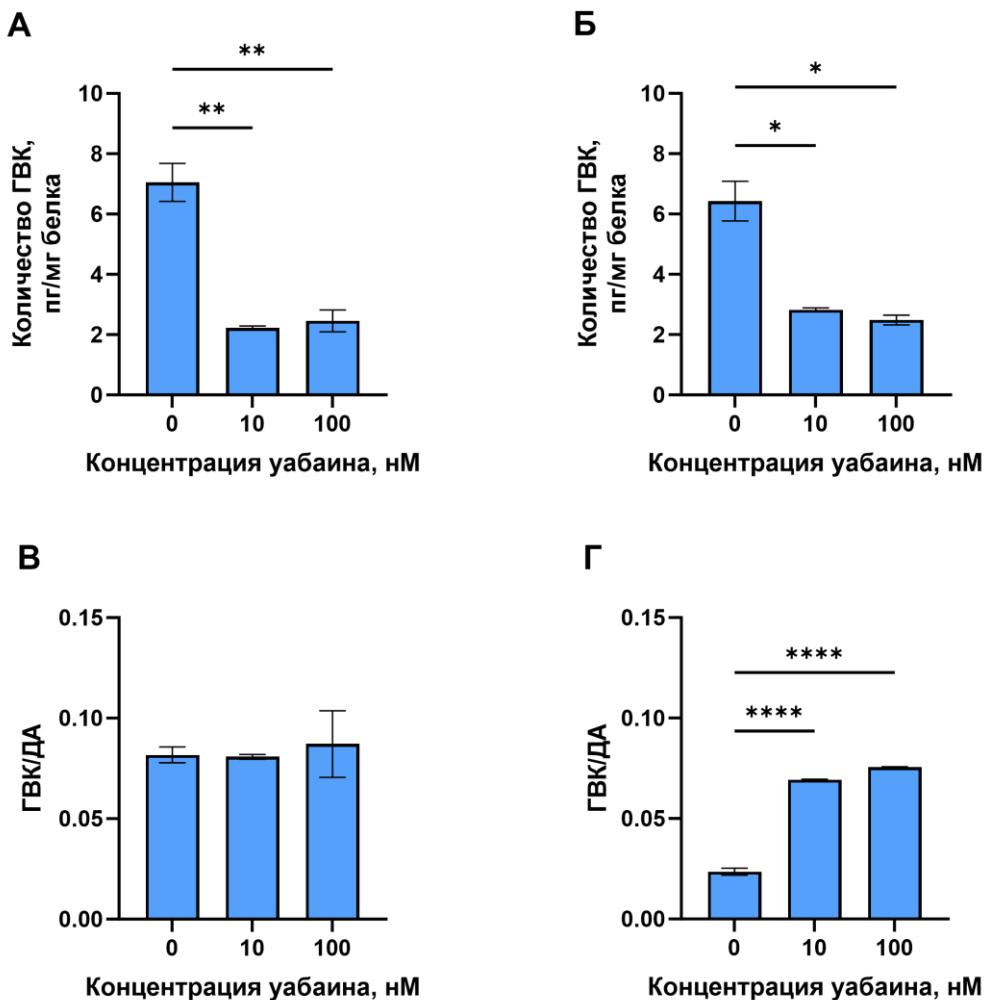


Рисунок 8. Влияние 10 нМ и 100 нМ убайна на содержание гомованилиновой кислоты в лизатах клеток недифференцированной (А) и дифференцированной по дофаминергическому типу (Б) нейробластомы SH-SY5Y и на соотношение ГВК/ДА в лизатах клеток недифференцированной (В) и дифференцированной по дофаминергическому типу (Г) нейробластомы SH-SY5Y после 1 ч инкубации. N=4, Данные представлены в виде среднего (пг моноамина / мг белка) \pm SEM, сравнение групп проведено анализом one-way ANOVA с тестом множественного сравнения Сидак, * - $p < 0,05$, ** - $p < 0,01$, **** - $p < 0,0001$

Таким образом, в данных экспериментах показано, что уабаин оказывает большее влияние на содержание дофамина в недифференцированной культуре, так как снижает его содержание во внеклеточной среде и в лизатах клеток, в то время как в дифференцированной культуре снижается содержание только в среде. Вместе с этим в дифференцированной культуре наблюдается увеличение метаболизма дофамина при действии уабаина. Содержания дофамина в культуральной среде показывает уровень выброса дофамина, в то время как содержание его в клетках является показателем его уровня медиатора, накопленного в синаптических везикулах готового к выделению.

4.1.5. Влияние уабаина на количество про- и анти-апоптотических белков в недифференцированной культуре нейробластомы SH-SY5Y

Поскольку недифференцированная культура нейробластомы SH-SY5Y оказалась гораздо более чувствительной к токсическому действию уабаина актуальным вопросом является оценка количественного содержания антиапоптотических белков Bcl-2 и Bcl-xL, а также проапоптотических белков Bak и Bak в недифференцированной культуре после 3-ч воздействия 10 нМ или 100 нМ уабаина.

При 3 ч инкубации клеток с 10 нМ уабаином количество Bcl-2 в недифференцированной культуре нейробластомы SH-SY5Y не изменяется, в то время как после 3 ч инкубации со 100 нМ уабаином уменьшается на 65% относительно интактных клеток ($p<0,05$, $F(2, 12) = 3,67$ рисунок 9А). В то же время 3-ч инкубация с 10нМ или 100 нМ уабаина не оказала влияния как на количество антиапоптотического белка Bcl-xL, так и проапоптотических белков Bak и Bak (рисунок 9Б–5Д).

Таким образом, можно сделать вывод, что влияние уабаина на регуляцию апоптоза, связанное с семейством белков Bcl-2, опосредуется уменьшением количества Bcl-2. Ранее сообщалось об аналогичном снижении уровня Bcl-2 в недифференцированной культуре нейробластомы SH-SY5Y при использовании более высокой концентрации уабаина (1 мкМ) [Kulikov, 2007].

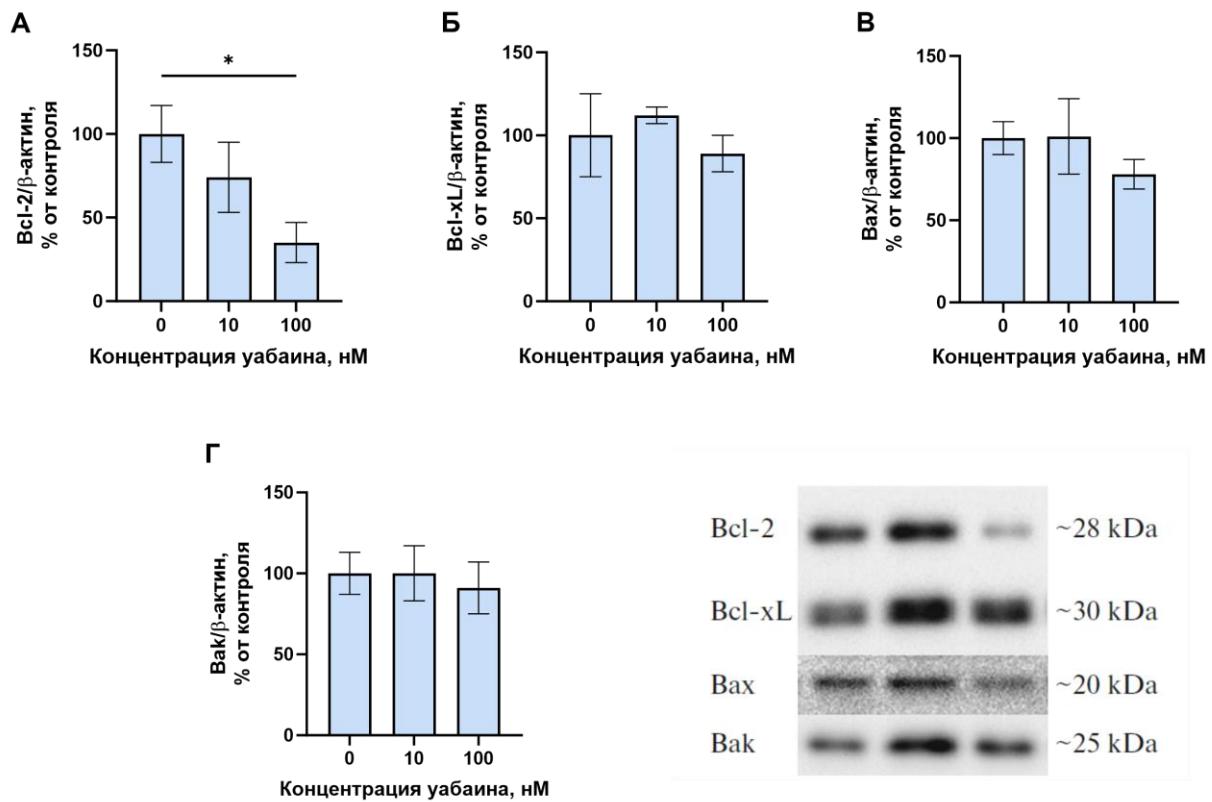


Рисунок 9. Влияние 3-часовой инкубации недифференцированной культуры нейробластомы SH-SY5Y с 10 нМ и 100 нМ убаином на количество белков Bcl-2 (А), Bcl-xL (Б), Bax (В), Bak (Г), нормализованное к общему количеству белка на мембранный дорожку (Sypro stain). (Д) Изображение характерных иммунореактивных полос на мембране. Данные представлены в виде среднего значения \pm SEM, N = 5, сравнение групп проведено анализом one-way ANOVA с тестом множественного сравнения Сидак, *—p < 0,05 по сравнению с контрольной группой.

В данной серии экспериментов было показано, что убаин токсичен как для недифференцированной, так и для дифференцированной нейробластомы SH-SY5Y в диапазоне концентраций от 1 нМ до 1 мкМ. При этом, убаин в 10 раз более токсичен для недифференцированной культуры по сравнению с дифференцированной культурой. Кроме этого, было обнаружено, что наблюдаемая токсичность не зависит от активации дофаминовых D2-рецепторов и AMPA и

каинатных ионотропных глутаматных рецепторов. Вместе с этим ингибирирование ПК С снижает токсический эффект уабаина в большей степени в дифференцированной культуре, на основании чего можно сделать вывод о существовании дополнительных механизмов в недифференцированной культуре, вызывающих гибель клеток при действии КТС. Одним из таких механизмов может являться активация МАР-киназного пути, так как его ингибирирование приводит к снижению токсичности низких концентраций уабаина. Хотя ПК С обычно ассоциируется с увеличением выживаемости клеток [Ruvolo, 2001; Wilson, 1996], в исследованиях, проведенных на культуре эпителиальных клеток [Deng , 2012; Zhang, 2015] показано, что ПК С может участвовать в образовании активных форм кислорода через TNF- α (фактор некроза опухоли-альфа). Также известно, что КТС ланатозид С индуцирует апоптоз клеток гепатоцеллюлярной карциномы через активацию ПК С [Chao, M.-W., 2017]. На основании литературных данных и результатов настоящего исследования можно заключить, что уабайн приводит к активации ПК С и последующему ОС [Xie, 1999], что и приводит к гибели клеток нейробластомы.

Нейротоксический эффект уабаина также связан с внутриклеточными сигнальными каскадами, которые запускаются при его специфическом связывании с Na,K-АТФазой. Так, на первичной культуре мозжечка крысы было показано, что гибель нейронов после воздействия уабаина вызывается долговременной активацией киназы ERK1/2 [Lopachev, 2016]. В настоящей работе ингибирирование ERK1/2 препятствует токсическому действию уабаина в наномолярных концентрациях, не приводящих к ингибирированию насосной функции Na,K-АТФазы, что свидетельствует об активации данного сигнального каскада при связывании уабаина с ферментом. В свою очередь, токсичность более высоких концентраций опосредуется дополнительными процессами, одним из которых является регуляция содержания про- и антиапоптотических белков.

Из литературных данных известно, что уабайн вызывает остановку пролиферации клеток культуры RAW264.7, регулируя соотношение белков Bcl-2 и

Вах и вызывая апоптоз [Luo, 2018]. В настоящей работе было обнаружено, что инкубация недифференцированной культуры SH-SY5Y с 100 нМ уабаина приводит к снижению содержания антиапоптотического белка Bcl-2, что свидетельствует об участии данного механизма в токсическом действии КТС. Аналогичные данные о подавлении Bcl-2 получены ранее [Kulikov, 2007] на недифференцированных культурах SH-SY5Y с использованием более высокой (1 мкМ) концентрации уабаина.

В настоящем исследовании было показано, что уабайн вызывает снижение содержания дофамина как в дифференцированной, так и в недифференцированной культуре нейробластомы человека SH-SY5Y. Кроме этого, уабайн также вызывает уменьшение количества ГВК в клетках обеих культур. В дифференцированной культуре снижение синаптического дофамина (содержащегося в культуральной среде) связано с уменьшением синтеза дофамина, о чем свидетельствует уменьшение ГВК на фоне отсутствия увеличения количества ДА, а также с увеличением его метаболизма, о чем свидетельствует увеличение соотношения метаболита к медиатору. В свою очередь в недифференцированной культуре под действием уабаина происходит снижение синтеза дофамина без влияния на его метаболизм. Полученные данные согласуются с результатами клинических исследований, сообщающих о развитии депрессивно-подобных состояний у пациентов при приеме КТС [El-Mallakh, 1995]. В целом, полученные в данном исследовании результаты предполагает возможности использования уабаина как модулятора работы дофаминергической системы.

Исходя из полученных в данном исследовании данных, можно заключить, что чувствительность культуры нейробластомы человека SH-SY5Y к токсическому эффекту уабаина зависит от дифференцировки культуры по нейрональному фенотипу и связана с активацией ПК С, ERK1/2 и снижением содержания антиапоптотического белка Bcl-2.

4.2. Влияние уабаина на двигательные функции и нейрохимические характеристики в мозге мышей линии C57Bl/6

В экспериментах *in vivo* на мышах линии C57Bl/6 оценивали влияние однократного билатерального и 4x-кратного унилатерального ICV-введения КТС уабаина на двигательные функции, поведение животных, активность Na,K-АТФазы и активацию внутриклеточных сигнальных киназ. Результаты настоящего исследования опубликованы в работах Lopachev et al., 2019 и Тимошина и др., 2023. Структура эксперимента приведена на рисунке 10.



Рисунок 10. Структура эксперимента.

4.2.1. Влияние однократного и четырехкратного введения уабаина на двигательные функции мышей линии C57Bl/6

Оценку двигательной активности и стереотипии движений животных проводили в тесте «Открытое поле» сразу после однократного введения 0,5 мкл 50 мкМ (25 пмоль, 14,6 нг) уабаина и через 24 часа после 4-х дневного ICV-введения 1,5 мкл 50 мкМ (75 пмоль, 43,8 нг) уабаина. Кроме этого, сразу после введения и через 24 часа после 4-х дневного введения уабаина проводили тесты «Приподнятая перекладина», «Наклонная лесенка» и Степпинг-тест для оценки координации животных и качества выполнения точных движений.

Однократное введение 0,5 мкл 50 мкМ уабаина привело к увеличению пройденного мышами расстояния в 1,53 раза ($6945\pm802,9$ см против $4909\pm442,8$ см в контроле, $p<0,05$, $t=2,221$, $df=20$) и увеличению средней скорости в 1,9 раз ($85,24\pm6,709$ см/сек против $44,47\pm5,397$ см/сек в контроле, $p<0,0001$, $t=4,773$, $df=21$). Было обнаружено, что уабайн приводил к увеличению времени нахождения в центральной зоне ($610,9\pm146,9$ сек против $280,1\pm69,48$ сек в контроле, $p<0,05$, $t=2,162$, $df=18$, рисунок 11А). Вместе с этим введение КТС привело также к повышению индекса стереотипии в 3,93 раз ($18,36\pm2,46\%$ против $4,66\pm1,49\%$ в контрольной группе, $p<0,001$, $t=3,991$, $df=11$, рисунок 7Б), что свидетельствует о формировании стереотипности в характере передвижения животных.

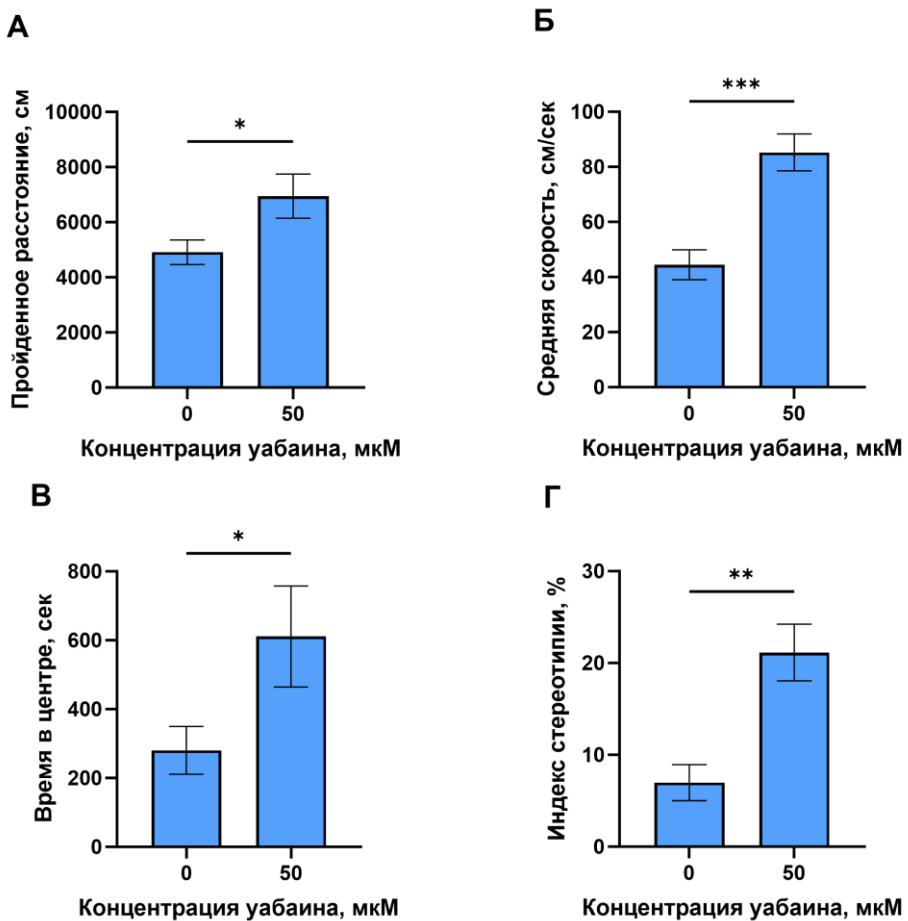


Рисунок 11. Параметры, оцениваемые в тесте «Открытое поле» в течение 20 минут после ICV введения 0,5 мкл 50 мкМ уабаина: пройденное расстояние (А), средняя скорость (Б), время, проведенное в центральной зоне (В), индекс стереотипии (Г). Данные представлены в виде среднего арифметического \pm SEM, N=10 в каждой группе, сравнение групп проведено t-тестом, * - p<0,05 по сравнению с контролем , **- p<0,001 по сравнению с контролем

Животные, получившие уабайн, проходили тесты «Наклонная лесенка» и «Приподнятая планка» на уровне контрольной группы (рисунок 12), что свидетельствует об отсутствии влияния однократного введения 0,5 мкл 50 мкМ уабаина на координацию животных и выполнение мелких движений.

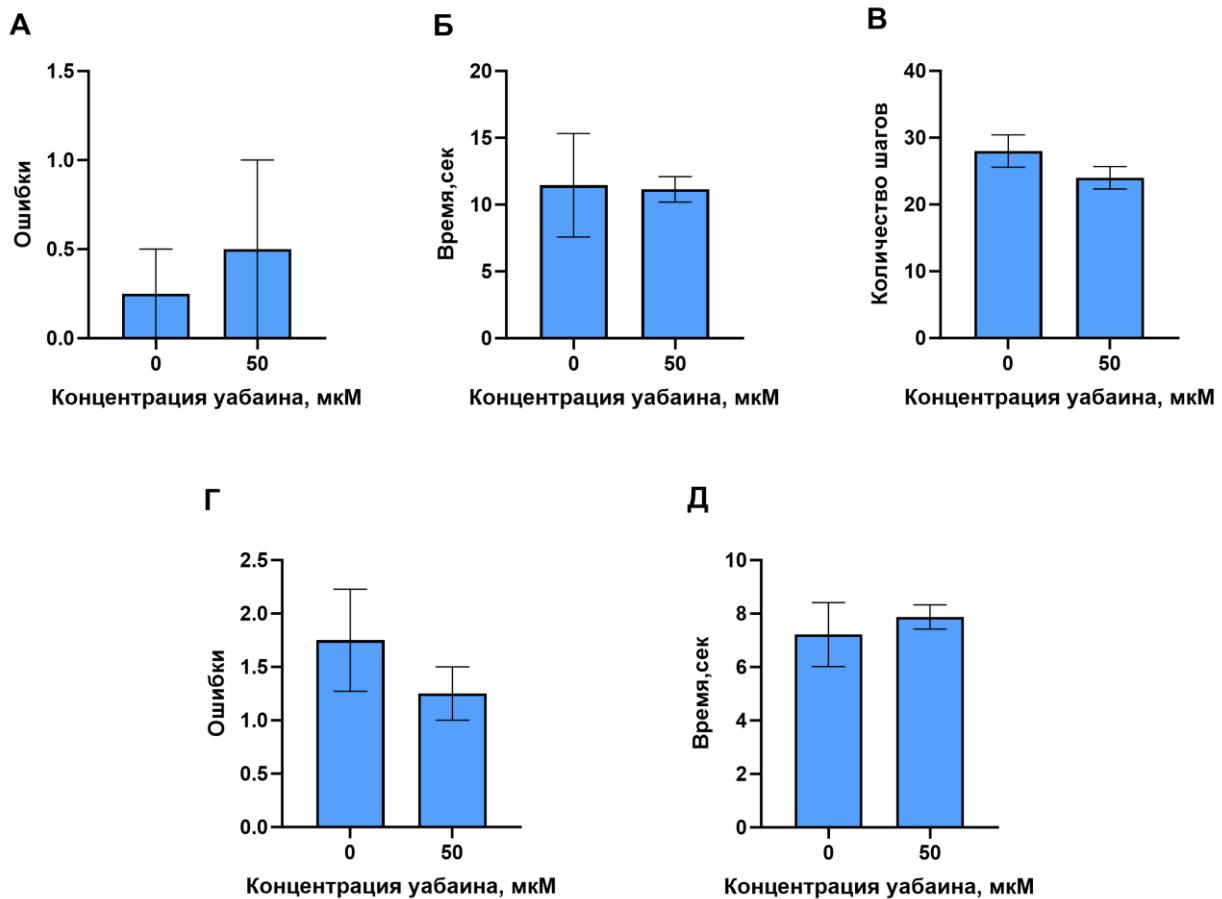


Рисунок 12. Количество ошибок (А) и время прохождения (Б) в тесте «Наклонная лесенка», количество шагов в тесте «Степпинг-тест» (В), количество ошибок (Г) и время прохождения (Д) в тесте «Приподнятая планка» после ICV введения 0,5 мкл 50 мкМ уабаина. Данные представлены в виде среднего арифметического \pm SEM, N=5 в каждой группе, сравнение групп проведено t-тестом, * - p<0,05, ** - p<0,01 по сравнению с контролем

Через 24 ч после 4-х дневного ICV-введения 1,5 мкл 50 мкМ уабаина было обнаружено увеличение двигательной активности животных в 1,9 раза ($3,99\pm0,8$ см/сек против $2,1\pm0,3$ см/сек в контроле, $p<0,05$, $t=2,212$, $df=18$) по сравнению с контрольной группой (рисунок 13Б). Введение уабаина также привело к увеличению индекса стереотипии в 7 раз ($23\pm7\%$ против $3,28\pm0,5\%$ в контроле,

$p<0,05$, $t=2,810$, $df=18$), что свидетельствует о выраженной стереотипичности движений у животных (рисунок 13В).

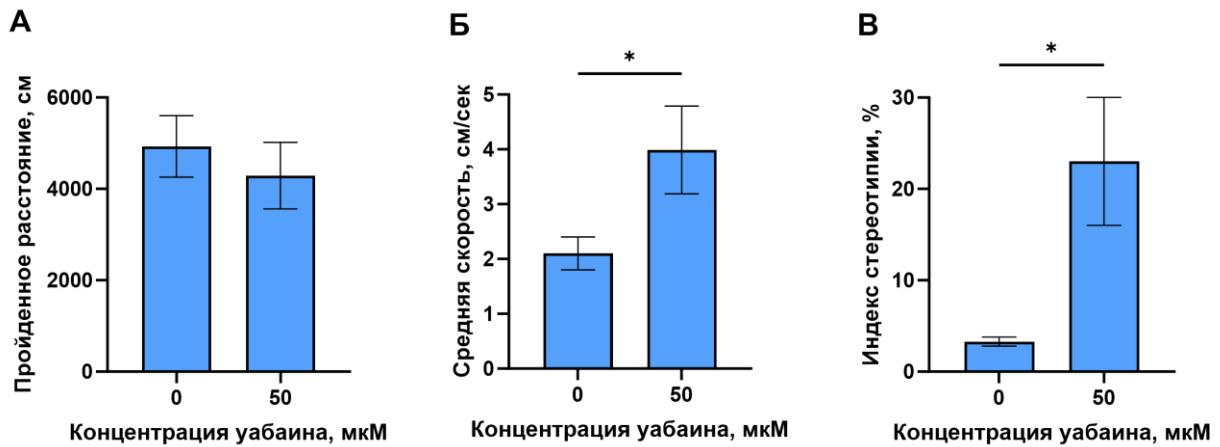


Рисунок 13. Параметры, оцениваемые в тесте «Открытое поле» в течение 20 минут через 24 часа после 4-х дневного ICV введения 1,5 мкл 50 мкМ уабаина: пройденное расстояние (А), средняя скорость (Б), индекс стереотипии (В). Данные представлены в виде среднего арифметического±SEM, N=10 в каждой группе, сравнение групп проведено t-тестом, * - $p<0,05$ по сравнению с контролем

Животные, которым вводили уабайн, выполняли тест «Наклонная лесенка» в 1,8 раза медленнее ($13,6\pm8,4$ сек, $p<0,05$, $t=3,067$, $df=13$, рисунок 14А), чем животные из контрольной группы ($7,52\pm0,36$ сек), и делали в 3,3 раза больше ошибок ($p<0,05$, $t=2,510$, $df=14$, рисунок 14Б): количество ошибок у контрольных животных составило $0,75\pm0,5$, у получавших уабайн $2,5\pm1,9$. После введения уабаина животные выполняли тест «приподнятая перекладина» в 2,2 раза медленнее ($12,93\pm6,07$ сек, $p<0,05$, $t=2,450$, $df=14$, рисунок 14В) и делали в 7,75 раза больше ошибок ($7,75\pm2,87$, $p < 0,01$, $t=4,893$, $df=14$, рисунок 14Г) чем животные из контрольной группы ($5,78\pm0,95$ сек и $1,00\pm0,7$ соответственно).

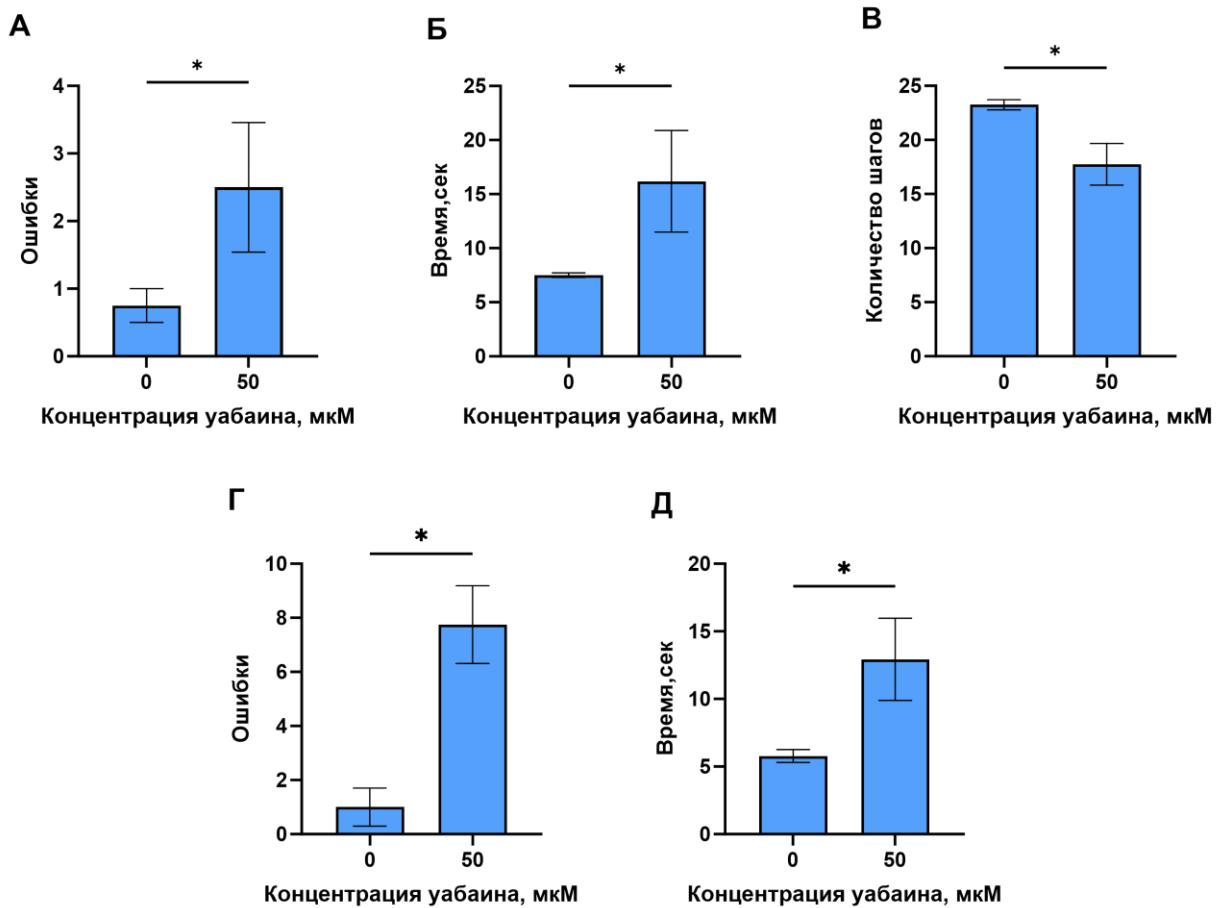


Рисунок 14. Время прохождения (А) и количество ошибок (Б) в тесте «Наклонная лесенка», время прохождения (В) и количество ошибок (Г) в тесте «Приподнятая планка» после 4-х дневного ICV введения 1,5 мкл 50 мкМ уабаина. Данные представлены в виде среднего арифметического \pm SEM, N=5 в каждой группе, сравнение групп проведено t-тестом, * - p<0,05, ** - p<0,01 по сравнению с контролем

Таким образом, было выявлено, что как однократное, так и многократное введение уабаина приводит к гиперлокомоции у животных и формированию стреотипичного поведения. Предположительно, наблюдаемый эффект данного КТС связан с активацией дофаминовой системы, так как аналогичное поведение наблюдается у животных после введения метамфетамина или кокаина, а также у мышей с нокаутом дофаминового переносчика (ДАТ-КО) [Kuribara, 1993; Berridge,

2005]. В свою очередь длительное введение уабаина вызывает нарушения в координации движений животных, чего не происходит после однократного введения.

4.2.2. Влияние уабаина на ферментативную активность Na,K-АТФазы в мозге мышей линии C57Bl/6

Для оценки влияния уабаина на Na,K-АТФазу в ЦНС была измерена её активность в грубой синаптосомальной фракции стриатума, гиппокампа, среднего мозга и мозжечка животных через 10 и 30 после ICV-введения 1,5 мкл 50 мкМ уабаина.

Уабайн вызвал увеличение активности Na,K-АТФазы в синаптосомальной фракции стриатума в 1,4 раза ($4,5 \pm 0,5$ мкМ Pi/мг белка/мин против $3,2 \pm 0,4$ мкМ Pi/мг белка/мин в контроле, $p < 0,05$, $F(2, 12) = 3,59$) через 10 минут после введения. Через 30 и 120 минут после введения КТС активность не отличалась от контрольных значений и составила $4,1 \pm 0,49$ мкМ Pi/мг белка/мин и $3,7 \pm 0,51$ мкМ Pi/мг белка/мин соответственно (рисунок 15А).

В синаптосомальной фракции среднего мозга животных через 30 минут после введения уабаина наблюдалось снижение активности Na,K-АТФазы в 1,8 раз ($2,4 \pm 0,12$ мкМ Pi/мг белка/мин, $p < 0,05$, $F(2, 12) = 3,73$) по сравнению с активностью в контрольной группе ($4,4 \pm 0,8$ мкМ Pi/мг белка/мин). Вместе с этим активность в данной структуре через 10 минут после введения уабаина не отличалась от контрольных значений и составила $3,6 \pm 0,4$ мкМ Pi/мг белка/мин (рисунок 15Б). В остальных исследованных структурах (гиппокамп и мозжечок) в обеих временных точках активность Na,K-АТФазы была на уровне контрольных значений (рисунок 15Б и 15Г).

Полученные данные свидетельствуют о том, что введение используемой дозы уабаина в латеральный желудочек мозга мышей приводит к непродолжительному повышению активности Na,K-АТФазы в стриатуме (через 10 минут) и уменьшению активности фермента в среднем мозге в более поздний срок (через 30 минут). Из литературных данных известно, что уабайн в наномолярных

концентрациях способен повышать активность Na,K-АТФазы за счет связывания с субъединицами тетрамерных комплексов фермента, присутствующих в неактивном виде на клеточной мемbrane, что вызывает их распад. Распад комплекса приводит к высвобождению дополнительных молекул фермента и повышению его общей активности в клетке [Song, 2013]. Наблюдаемое в проведенном исследовании повышение активности может происходить по описанному механизму, что свидетельствует о поступлении в стриатум убацина в концентрациях, способных изменять сигнальную функцию Na,K-АТФазы, но снижать её активность.

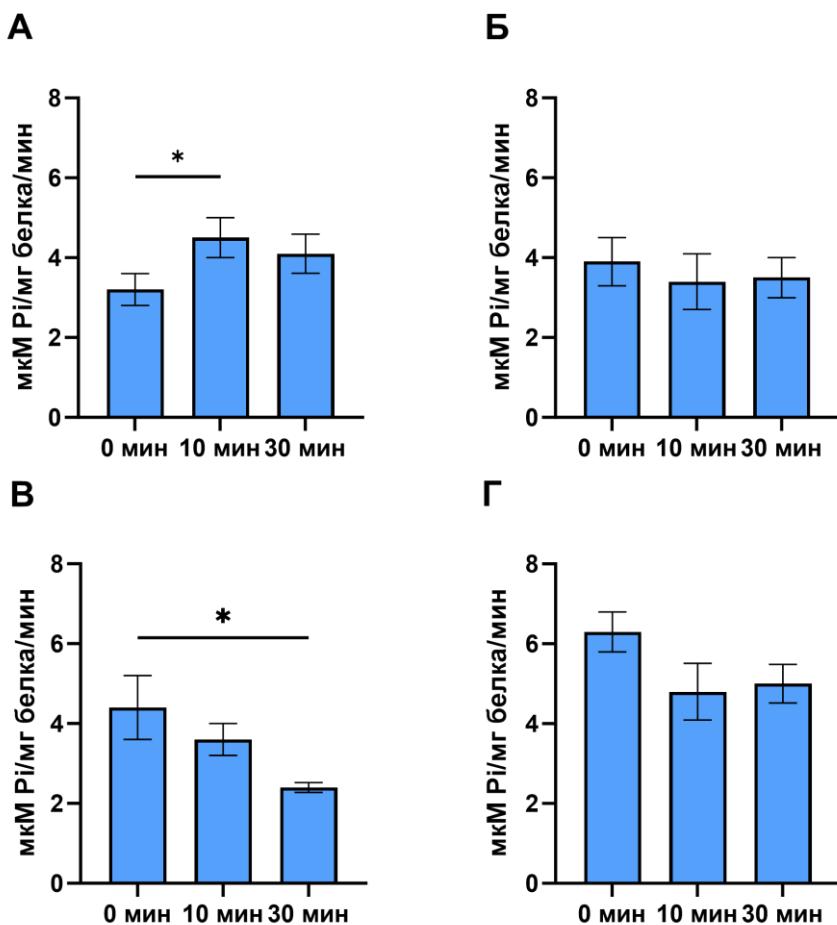


Рисунок 15. Активность Na,K-АТФазы синаптосомальной фракции стриатума (А), гиппокампа (Б), среднего мозга (В) и мозжечка (Г) мышей линии C57Bl/6 через 10 и 30 мин после ICV-введения 1,5 мкл 50 мкМ убацина. Данные представлены в

виде среднего арифметического \pm SEM, N=5 в каждой группе, сравнение групп проведено анализом one-way ANOVA с тестом множественного сравнения Тьюки, * - p<0,05, ** - p<0,01 по сравнению с контролем

4.2.3. Влияние уабаина на активацию внутриклеточных сигнальных киназ и количество белков в стриатуме мышей линии C57Bl/6

Для оценки участия дофаминовой системы в развитии гиперлокомоции после однократного и 4-х кратного введения уабаина методом Вестерн-блотта оценили активацию сигнальных каскадов Akt и МАРК в образцах ткани стриатума через 30 минут после ICV-введения 0,5 мкл 50 мкМ уабаина и через 24 часа после 4-х ICV-введений 1,5 мкл 50 мкМ уабаина. Степень активации оценивали по соотношению фосфорилированной и нефосфорилированной форм белков pAkt (Ser473)/Akt и pERK1/2 (Thr202/ Tyr204) /ERK1/2, так как эти белки участвуют в передаче сигнала от D2-рецепторов.

Было обнаружено, что однократное введение уабаина способствует активации Akt (увеличение фосфорилирования) в стриатуме на 80% (p<0,05, t=3,18, df=14) и повышению активации ERK1/2 (увеличение фосфорилирования) также на 45% (p<0,05, t=4,01, df=11), в то время как после 4-х кратного введения наоборот происходит снижение активации Akt (уменьшение фосфорилирования) на 62% (p<0,05, t=3,98, df=13) без изменений в активации ERK1/2 (рисунок 16).

Таким образом, на основании результатов Вестерн-блотта было показано, что уабайн влияет на внутриклеточные сигнальные каскады, запускаемые от дофаминовых D2-рецепторов. Из литературы известно, что передача сигнала от D2-рецепторов может быть реализована посредством быстрого ответа через G-белки с последующей активацией Akt и медленного ответа, запускаемого активацией комплекса D2/β-аррестин/PP2A, с деактивацией Akt [Beaulieu, 2011]. На основании этих данных и полученных результатов можно сделать вывод, что как после однократного ICV-введения уабаина, так и после 4-х кратного,

происходит активация D2-рецепторов, только в первом случае по быстрому пути, а во втором – по медленному .

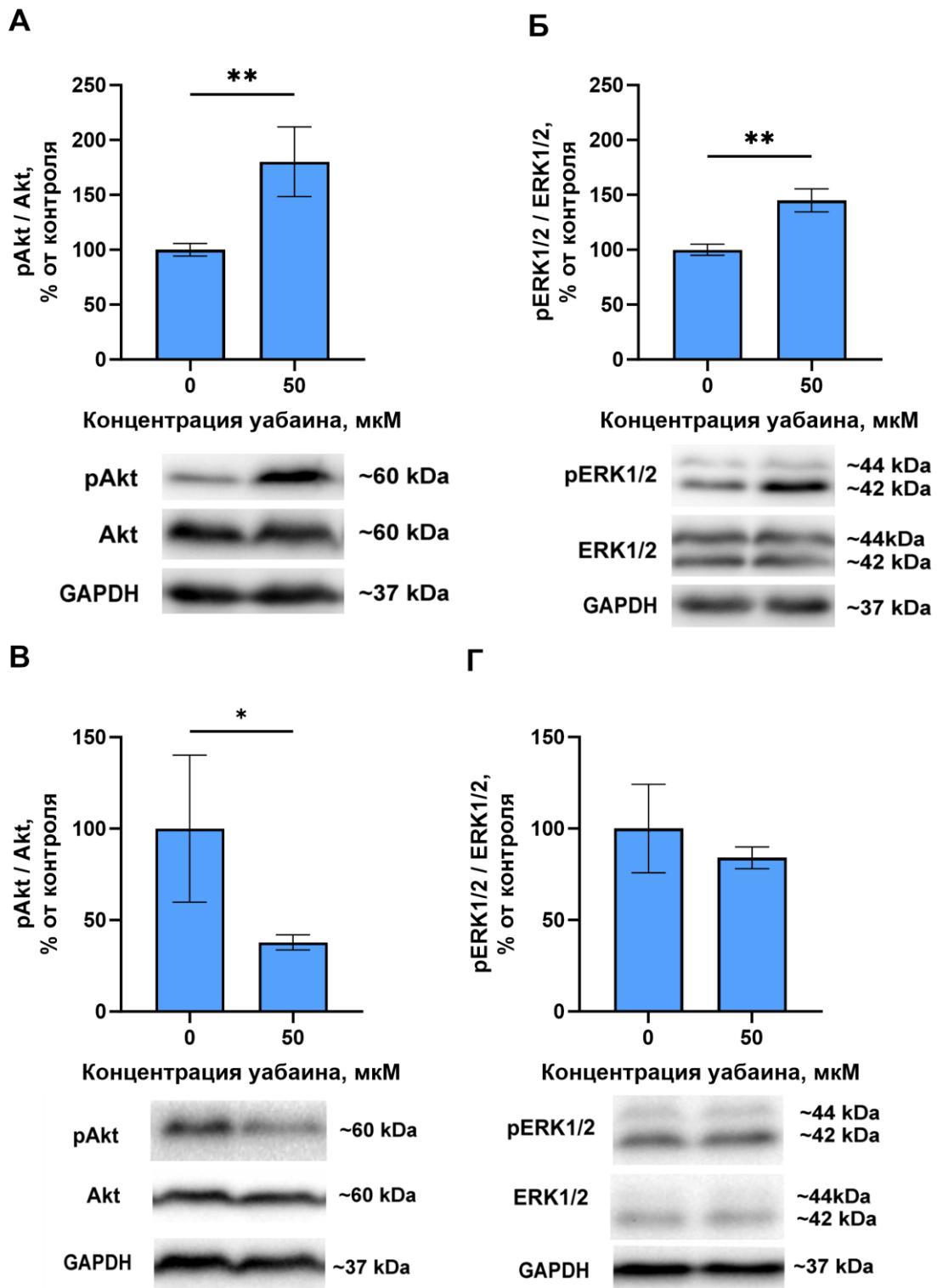


Рисунок 16. Влияние однократного ICV-введения 0,5 мкл 50 мкМ уабаина на активацию Akt (А) и ERK1/2 (Б) и 4-х дневного ICV-введения 1,5 мкл 50 мкМ уабаина на активацию Akt (В) и ERK1/2 (Г) в стриатуме мышей. Данные представлены в виде среднего значения \pm SEM; N=8 в каждой группе, сравнение

групп проведено t-тестом, * $p < 0,05$ по сравнению с контрольной группой. Под графиками приведены репрезентативные изображения иммунореактивных полос

Из работ на клеточных культурах известно, что токсичность уабаина может быть опосредована активацией глутаматных NMDA-рецепторов, связанных с Na₊,K⁻-АТФазой посредством белок-белковых взаимодействий [Akkuratov, 2015]. В связи с этим методом Вестерн-блотт было проанализировано влияние 4-х кратного введения ICV-введения 1,5 мкл 50 мкМ уабаина на количество α1- и α3-изоформ α-субъединицы Na⁺,K⁻-АТФазы и NR2B-субъединицы NMDA-рецептора в стриатуме мышей через 24 часа после последнего введения КТС.

Было обнаружено, что многократное введение уабаина вызывает снижение содержания NR2B-субъединицы на 37% ($p<0,05$, $t=3,70$, $df=14$) по сравнению с контрольными животными (рисунок 17В). Вместе с этим изменения содержания исследуемых субъединиц не выявлено.

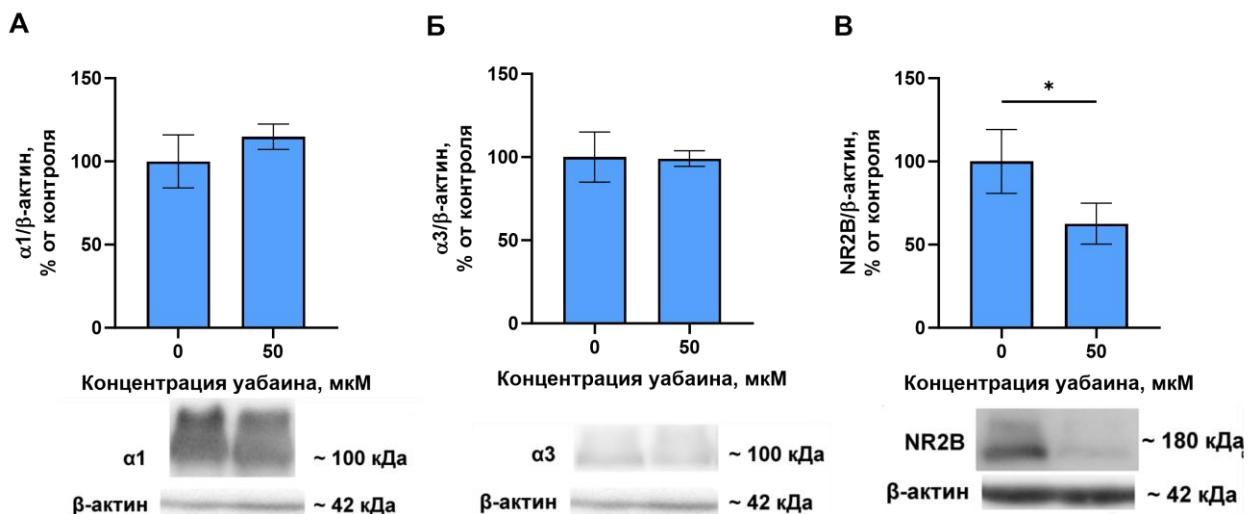


Рисунок 17. Содержание α1- (А) и α3- (Б) изоформ α-субъединицы Na₊,K⁻-АТФазы и NR2B-субъединицы NMDA-рецептора (В) в стриатуме мышей линии C57Bl/6 через 24 часа после 4-х кратного ICV-введения 1,5 мкл 50 мкМ уабаина. Данные представлены в виде среднего значения± SEM; N=8 в каждой группе, сравнение

групп проведено t-тестом, * $p < 0,05$ по сравнению с контрольной группой. Под графиками приведены репрезентативные изображения иммунореактивных полос

В исследованиях по оценки токсичности уабаина на клеточных культурах ранее было обнаружено, что одним из путей реализации токсического эффекта данного КТС может являться снижение содержания антиапоптотического белка Bcl-2. Однако при оценке количества проапоптотических (Bak и Bax) и антиапоптотических (Bcl-2, Bcl-xL) белков в стриатуме мышей после 4-х кратного введения ICV-введения 1,5 мкл 50 мкМ уабаина разницы между опытной и контрольной группой выявлено не было.

В проведенной серии экспериментов по исследованию влияния внутрижелудочкового введения уабаина на поведение и биохимические параметры мозга мышей линии C57Bl/6 было обнаружено что однократное и четырехкратное введение данного КТС вызывает у мышей гиперлокомоцию, сопровождающуюся нарушением координации и мелкой моторики при многократном введении. Оценку данных параметров использовали два теста, широко используемых в моделях паркинсонизма: «Приподнятая планка» и «Наклонная лесенка». В обоих тестах животные, которым вводили уабаин, совершили большее число ошибок, чем контрольные животные, и выполняли данный тест за более длительное время. Наблюдаемые эффекты можно объяснить тем, что хроническое введение уабаина приводит к нарушению способности держать равновесие и совершать точные движения. Вместе с этим после однократного введения уабаина подобных двигательных дефицитов не наблюдалось, что свидетельствует о формировании функциональных либо органических нарушений в работе дофаминергической системы в ответ на многократное введение нетоксической дозы уабаина.

Известно, что в низких концентрациях КТС могут вызывать повышение активности Na,K-АТФазы. Неактивная Na,K-АТФаза присутствует на мембране в виде тетramerных комплексов или в депонированной форме, содержащейся в

цитоплазматических везикулах. При связывании уабаина с одной из молекул тетramerного комплекса происходит его распад, высвобождение фермента и активация, что в итоге ведет к повышению общей активности Na₊K-АТФазы в клетке [Song, 2013]. Наблюдаемое в настоящем исследовании повышение активности фермента в образцах стриатума через 10 минут после введения уабаина указывает на то, что на стриатум действуют наномолярные концентрации КТС, не вызывающие ингибицию фермента. Однако, в среднем мозге через 30 минут после введения уабаина было зафиксировано понижение активности Na₊K-АТФазы, что свидетельствует о действии более высоких концентраций уабаина в данной структуре. Для однозначного понимания концентраций, действующих на ту или иную структуру головного мозга, необходимо исследование накопления уабаина в этих структурах после разных способов введения КТС методом масс-спектрометрии.

Воздействие низких концентраций уабаина на Na₊K-АТФазу влияет на её сигнальную функцию и характер белок-белковых взаимодействий. В настоящем исследовании обнаружено, что после однократного ICV-введения уабаина происходит активация киназ ERK ½ и Akt, что свидетельствует о запуске быстрого ответа от D2-дофаминовых рецепторов. Четырехкратное введение уабаина, в свою очередь, сопровождается снижением активации Akt вследствие активации медленного β-аррестинового пути от D2-дофаминовых рецепторов.

На первичной культуре мозжечка крысы было показано, что инкубация клеток с уабаином приводит к снижению содержания NR2B-субъединицы NMDA-рецептора [Lopachev, 2016]. Аналогичный эффект был обнаружен в стриатуме мышей после 4-х дневного ICV-введения уабаина. Вместе с этим не было выявлено изменений в количестве α1- и α3-изоформ Na₊K-АТФазы в стриатуме, что может свидетельствовать о том, что физиологические эффекты долговременного введения уабаина не связаны с изменением общего количества Na₊K-АТФазы. Для оценки гибели клеток путем активации сигнальных каскадов, приводящих к апоптозу, после многократного введения уабаина, оценили

содержание анти- (Bcl-2, Bcl-xL) и проапоптотических (Bak, Bax) белков в стриатуме экспериментальных животных. В настоящей работе не было обнаружено статистически значимых изменений в количестве этих белков, что свидетельствует о том, что используемые концентрации убацина не вызывают запуска неспецифического митохондриального пути апоптоза.

В целом, однократное билатеральное ICV-введение 0,5 мкл 50 мкМ убацина мышам приводит к гиперлокомоции животных без нарушений в координации, обусловленной запуском быстрого сигнального пути от D2-дофаминовых рецепторов. Четырехдневное унилатеральное ICV-введение 1,5 мкл 50 мкМ уаюаина мышам также вызывает увеличение двигательной активности, сопровождаемой нарушениями координации движений. Полученные изменения в поведении связаны с запуском медленного β -аррестинового пути передачи сигнала от D2-дофаминовых рецепторов.

Представленные в данном исследовании результаты показывают, что воздействие КТС на Na,K-АТФазу в ЦНС приводит к функциональным нарушениям работы дофаминергической системы, что требует дальнейшего изучения особенностей работы Na,K-АТФазы для возможной фармакологической коррекции наблюдаемых нарушений.

4.3. Влияние марганца на поведение, двигательные функции и нейрохимические характеристики в мозге мышей линии C57Bl/6

Несмотря на то, что двигательные нарушения при манганизме аналогичны расстройствам, вызванным гаплонедостаточностью гена, кодирующего $\alpha 3$ -изоформу Na,K-АТФазы, систематических исследований $\alpha 3$ в областях мозга, связанных с двигательными расстройствами дистонического и паркинсонического типа, на животных моделях манганизма не проводилось. Для проверки данной гипотезы было проведено исследование на мышиной модели нейротоксичности Mn, вызванной потреблением 0,5 г/л MnCl₂ с питьевой водой в течение 8 недель. Результаты проведенного исследования опубликованы в работе Smolyaninova et al., 2023. Схема эксперимента приведена на рисунке 18.

ИЗУЧЕНИЕ МЕХАНИЗМОВ ВЛИЯНИЯ ХРОНИЧЕСКОГО ПОТРЕБЛЕНИЯ
МАРГАНЦА НА ПОВЕДЕНИЕ ЖИВОТНЫХ

Потребление 0,5 г/л MnCl₂ с питьевой водой в течение
 2 недель (N=8)
 4 недель (N=8)
 6 недель (N=9)
 8 недель (N=9)



Еженедельная оценка влияния потребления MnCl₂ на поведение

двигательная активность (по тесту "Открытое поле")	наличие двигательных нарушений (по тестам "Сужающаяся дорожка", "Наклонная решетка", степпинг)	пищедобывающее поведение в "Челночной камере"
---	---	---



влияние MnCl ₂ на активность и количество Na,K-АТФазы (по Вестерн-блотту)	влияние MnCl ₂ на активацию киназ ERK1/2 и Akt и содержание белков-регуляторов апоптоза (по Вестерн-блотту)	влияние MnCl ₂ на содержание дофамина и серотонина (по ВЭЖХ-МС)
--	--	--

Рисунок 18. Структура эксперимента.

4.3.1. Влияние хронического потребления хлорида марганца на массу тела животных, потребление пищи и воды

До начала проведения эксперимента вес мыши как контрольной группы (n=9), так и тех, которые в дальнейшем должны получать Mn (n=34), достоверно не различались между группами (контроль: 24,2 ±0,6 г. и Mn: 23,3±0,7 г.). В течение всего эксперимента контрольные мыши и мыши, получавшие марганец

набирали вес примерно с одинаковой скоростью - 0,36-0,45 г/неделю (рисунок 19А) и к окончанию эксперимента вес животных в контрольной группе составил $27,39 \pm 1,98$, в Mn – $25,75 \pm 2,086$ г.

В первые две недели эксперимента мыши контрольной группы пили больше воды, чем животные, получавшие марганец ($0,19 \pm 0,013$ мл/день/г веса и $0,17 \pm 0,026$ мл/день/г веса соответственно). Начиная с третьей недели эксперимента существенных различий в потреблении воды между контрольными и опытными мышами не наблюдалось (рисунок 19Б). Учитывая данные по потреблению питьевой воды, содержание Mn в которой составило 0,5 г/л, суточное потребление Mn варьировало от 87 до 67 мг/кг массы тела мышей между первой и последней восьмой неделами эксперимента. На протяжении всего эксперимента не наблюдалось устойчивых различий в потреблении пищи между контрольными животными и получавшими марганец (рисунок 19В).

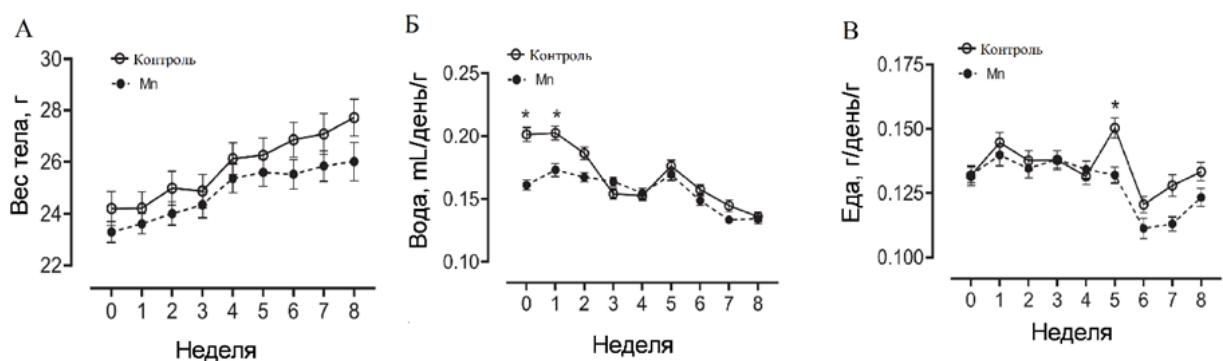


Рисунок 19. Изменение массы тела (А), потребления воды (Б) и пищи (В) в течение восьми недель эксперимента в контрольной и получавшей Mn группах мышей. Количество животных в группе: 9 для всех временных точек в контроле и 34, 26, 18 и 9 для недель 0-2, 3-4, 5-6, и 7-8 в группе Mn, соответственно, сравнение групп проведено анализом REML с последующим тестом множественного сравнения Бонферрони, * - $p < 0,05$ по сравнению с контрольной группой

В данном исследовании мыши получали марганец, содержащийся в питьевой воде, в дозе 0,5 г Mn/л в течение 8 недель. Исходя из полученных данных о весе животных и потреблению воды, расчетное потребление Mn мышами составило 75 мг/кг/сут, что согласуется с расчетным потреблением Mn с питьевой водой в других исследованиях на мышах (60-80 мг/кг/сут).

4.3.2. Оценка обучаемости животных в пищедобывающей задаче в «Челночной камере» при хроническом потреблении хлорида марганца

В пищедобывающем тесте мыши, получавшие Mn, демонстрировали существенно меньшую двигательную активность по сравнению с контрольными животными: начиная со второй недели и до конца эксперимента они реже переходили из одной камеры в другую (*неделя эксперимента: F (3,972, 60,07) = 9,773, потребление Mn: F (1, 16) = 22,67, неделя эксперимента×потребление Mn: F (8, 121) = 1,658*, рисунок 20А) и совершали меньше подходов к кормушке (*неделя эксперимента: F (3,800, 60,80) = 9,697, потребление Mn: F (1, 16) = 29,51, неделя эксперимента×потребление Mn: F (8, 128) = 4,429*, рисунок 20 В). Контрольные животные к третьей неделе эксперимента обучились подходить к кормушке и получали в среднем $4,88 \pm 0,92$ (с третьей по восьмую недели). В свою очередь, животные, потреблявшие Mn, в этом же временном диапазоне получали в среднем $3,8$ меньше подкреплений ($1,275 \pm 0,71$, *неделя эксперимента: F (4,231, 67,70) = 6,234, потребление Mn: F (1, 16) = 23,38, неделя эксперимента×потребление Mn: F (8, 128) = 3,084*, рисунок 20Б).

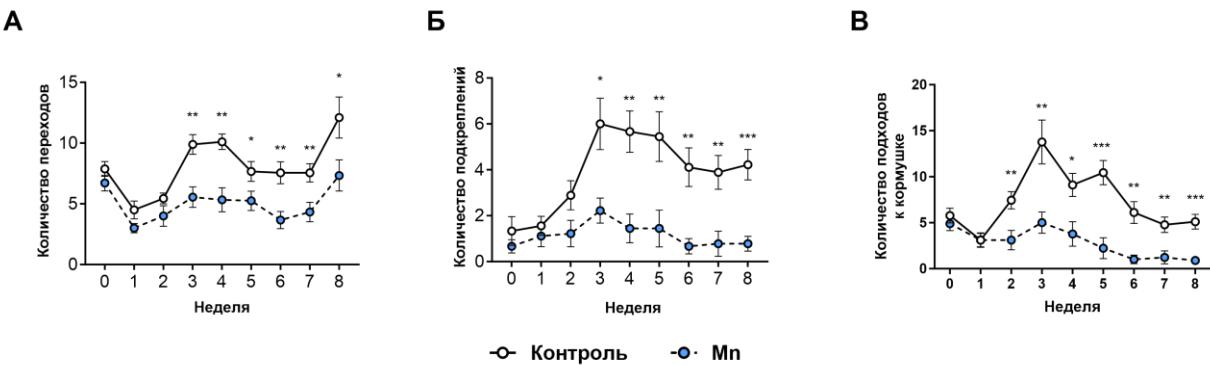


Рисунок 20. Анализ активности и поведения мышей в пищедобывательном тесте в «Челночной камере» в контрольной и получавшей Mn группах мышей. А: Количество переходов между камерами теста. Б: Количество пищевых подкреплений. В: Количество подходов к кормушке. Данные представлены в виде среднего арифметического \pm SEM, N=9 в каждой группе в каждой временной точке, сравнение групп проведено анализом two-way ANOVA с тестом множественного сравнения Сидак, * - p < 0,05, ** - p < 0,01, *** - p <0,001 по сравнению с контрольной группой

Таким образом, в данной исследовании было обнаружено, что потребление марганца препятствует обучению животных в пищедобывательной задаче. Учитывая, что общее потребление пищи у мышей, получавших Mn, в целом оставалось на стабильном уровне и сопоставимо с контрольными животными ($0,13\pm 0,01$ г/день/г веса и $0,14\pm 0,01$ г/день/г веса соответственно, рисунок 19В), такое поведение опытных мышей, в пищедобывательном тесте свидетельствует о подавлении обучения, а не нарушении потребления пищи.

4.3.3. Оценка двигательных функций мышей при хроническом потреблении хлорида марганца

При анализе локомоторной активности животных, оцениваемой по пройденному расстоянию в тесте «Открытое поле», было обнаружено, что животные, получавшие Mn, статистически значимо проходят меньшее расстояние на второй, седьмой и восьмой неделях эксперимента (2 неделя: $3778\pm 277,3$ см

против $5415 \pm 648,5$ в контроле, $p < 0,05$; 7 неделя: $3444 \pm 448,9$ см против $4951 \pm 449,3$ см в контроле, $p < 0,05$; 8 неделя: $2872 \pm 588,8$ см против $4576 \pm 323,6$ в контроле, $p < 0,05$, неделя эксперимента: $F(2, 126, 30,97) = 1,347$, потребление Mn: $F(1, 43) = 0,2387$, неделя эксперимента \times потребление Mn: $F(7, 102) = 0,4465$, рисунок 21А). Различий в исследовательском поведении, оцениваемом по количеству стоек, сделанных животными в teste «Открытое поле», не обнаружено (рисунок 21Б).

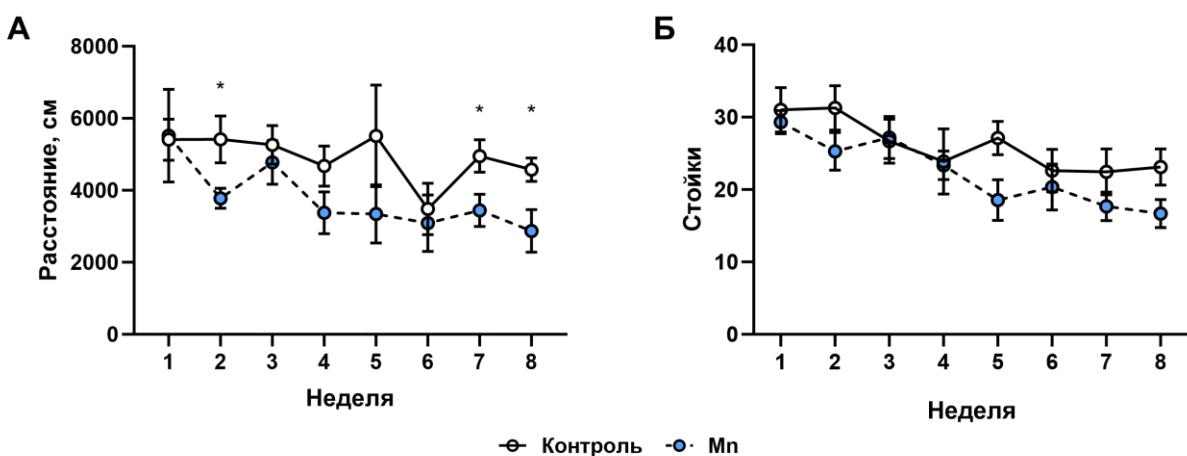


Рисунок 21. Пройденное расстояние (А) и количество стоек (Б) мышей в teste "Открытое поле". Данные представлены в виде среднего арифметического \pm SEM, N=9 в каждой группе в каждой временной точке, сравнение групп проведено анализом two-way ANOVA с тестом множественного сравнения Сидак, * - $p < 0,05$ по сравнению с контрольной группой

По результатам Степпинг-теста (рисунок 22А) и теста «Сужающаяся дорожка» (рисунок 22Б) существенных различий в двигательной координации между контрольной и Mn-группой мышей выявлено не было. Однако, в teste «Наклонная решетка» показатели мышей, получавших Mn, значимо отличались от показателей контрольных мышей. Так, на второй, третьей и седьмой недели эксперимента опытные животные затрачивали статистически значимо больше времени на подъем по решетке по сравнению с контролем: $23,64 \pm 4,42$ сек и $10,02 \pm 1,39$ сек соответственно на второй неделе ($p < 0,05$), $25,47 \pm 3,87$ сек и

$10,34 \pm 0,93$ сек соответственно на третьей неделе ($p < 0,01$), $74,68 \pm 19,33$ сек и $21,89 \pm 3,47$ сек соответственно на седьмой неделе ($p < 0,05$, неделя эксперимента: $F(3,202, 47,23) = 2,911$, потребление Mn: $F(1, 18) = 23,66$, неделя эксперимента \times потребление Mn: $F(8, 118) = 1,612$, рисунок 23А). Количество ошибок при постановке лапы на опору, оцениваемое в тесте «Наклонная решетка», также было выше у мышей Mn-группы, чем у контрольных животных, но со второй по четвертую неделю и было связано с уменьшением числа ошибок у мышей контрольной группы в этот период: $8,56 \pm 1,24$ и $5 \pm 0,69$ соответственно на второй неделе ($p < 0,05$), $12,44 \pm 2,13$ и $6,22 \pm 0,66$ соответственно на третьей неделе ($p < 0,05$), $9,0 \pm 1,66$ и $3,89 \pm 0,75$ соответственно на четвертой неделе ($p < 0,05$, неделя эксперимента: $F(4,217, 73,27) = 1,6$, потребление Mn: $F(1, 139) = 16,48$, неделя эксперимента \times потребление Mn: $F(8, 139) = 1,673$, рисунок 23Б).

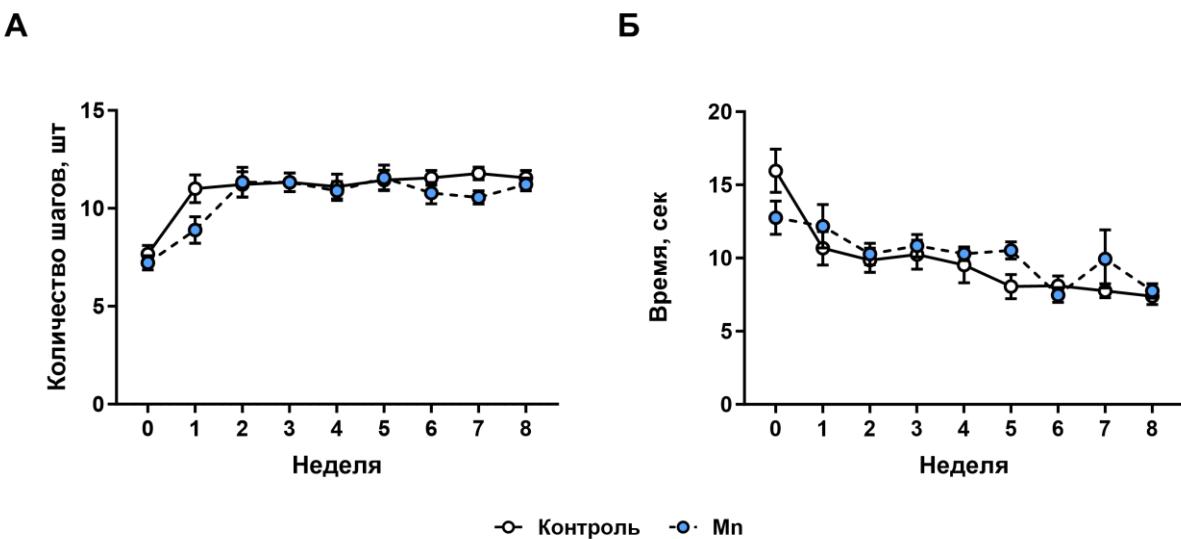


Рисунок 22. Количество шагов, сделанных в Степпинг-тесте (А) и время выполнения теста «Сужающаяся дорожка» (Б). Данные представлены в виде среднего арифметического \pm SEM, N=9 в каждой группе в каждой временной точке, сравнение групп проведено анализом two-way ANOVA с тестом множественного сравнения Сидак.

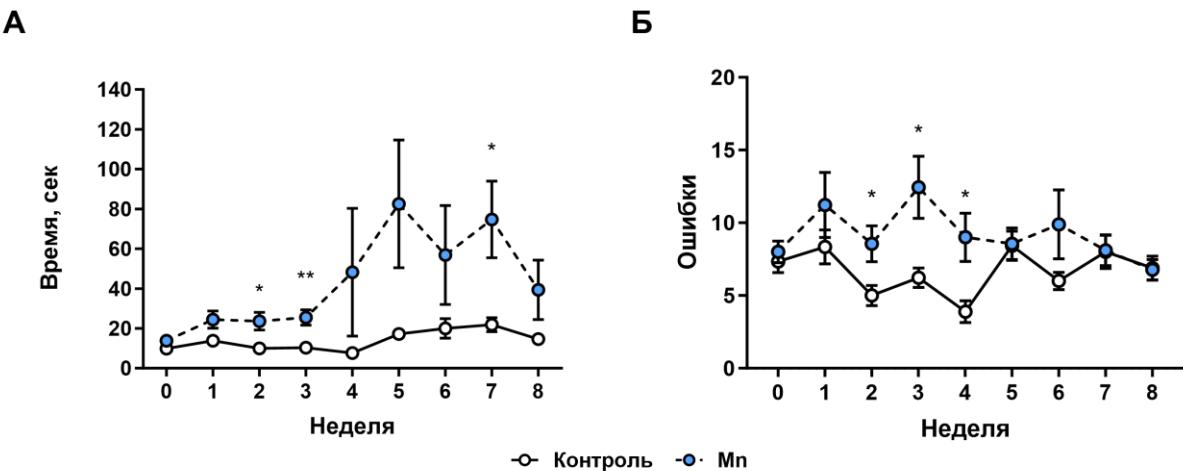


Рисунок 23. Анализ показателей животных в тесте «Наклонная решетка». А: Время подъема по решетке. Б: Количество ошибок при выполнении теста. Данные представлены в виде среднего арифметического \pm SEM, N=9 в каждой группе в каждой временной точке, сравнение групп проведено анализом two-way ANOVA с тестом множественного сравнения Сидак, * - p<0,05, ** - p<0,01 по сравнению с контрольной группой

Таким образом, было обнаружено, что хроническое потребление марганца с питьевой водой приводит к умеренному нарушению равновесия, выявленному только в тесте «Наклонная дорожка». За нарушениями двигательной координации, начавшимися на второй неделе эксперимента, сразу же следуют признаки когнитивного дефицита у получавших Mn мышей, которые проявляются на 3-4-й неделе эксперимента. В свою очередь, у контрольных мышей в пищедобывательной задаче наблюдается хорошо выраженная кривая оперантного обучения, заключающаяся в увеличении количества пищевых подкреплений и переходов между тестовыми отсеками.

4.3.4. Накопление марганца, калия и натрия в структурах головного мозга мышей в результате его длительного приема с питьевой водой

С помощью МС-ИСП был проведен анализ содержания Mn в структурах мозга, вовлеченных в двигательный контроль у грызунов (мозжечок и стриатум). В течение 8 недель эксперимента существенных различий в содержании Mn в

стриатуме контрольных и опытных мышей не наблюдалось ($0,73\pm0,22$ ppm/g ткани и $0,86\pm0,1$ ppm/g ткани соответственно, рисунок 24А). Однако через 4, 6 и 8 недель было отмечено статистически значимое увеличение содержания Mn в мозжечке мышей, получавших Mn ($0,71\pm0,16$ ppm/g ткани, $0,82\pm0,11$ ppm/g ткани и $0,76\pm0,12$ ppm/g ткани соответственно, $p<0,05$, $F(4, 33) = 8,207$, рисунок 24Б), по сравнению с контрольными значениями ($0,53\pm0,07$ ppm/g ткани).

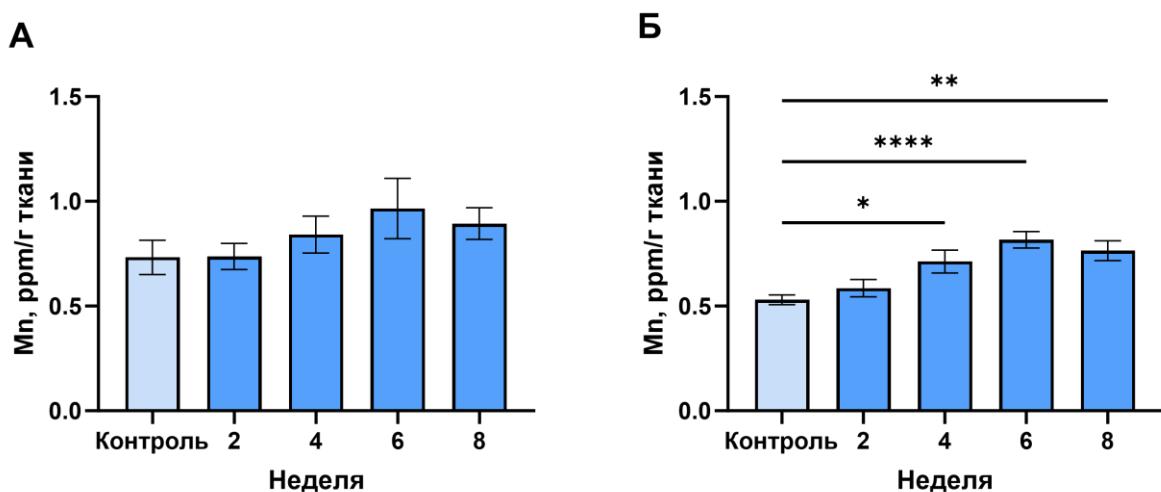


Рисунок 24. МС-ИСП измерения содержания Mn в стриатуме (А) и мозжечке (Б) у контрольных мышей (8-я неделя) и у мышей, получавших Mn, на разных неделях эксперимента. Количество животных в группе: 9 в контроле и 7, 8, 8 и 9 на 2-й, 4-й, 6-й и 8-й неделях в группе, получавшей Mn, сравнение групп проведено анализом one-way ANOVA с тестом множественного сравнения Сидак, * - $p < 0,05$ по сравнению с контрольной группой

Соотношение Na/K, измеренное в образцах тканей мозга (стриатум и мозжечок), оставалось неизменным на протяжении всего эксперимента в обеих экспериментальных группах, за исключением значения в мозжечке на 6 неделе ($0,39\pm0,03$ ppm/g ткани против $0,34\pm0,03$ ppm/g ткани в контроле, $p<0,05$, $F(4, 35) = 6,677$, рисунок 25Б).

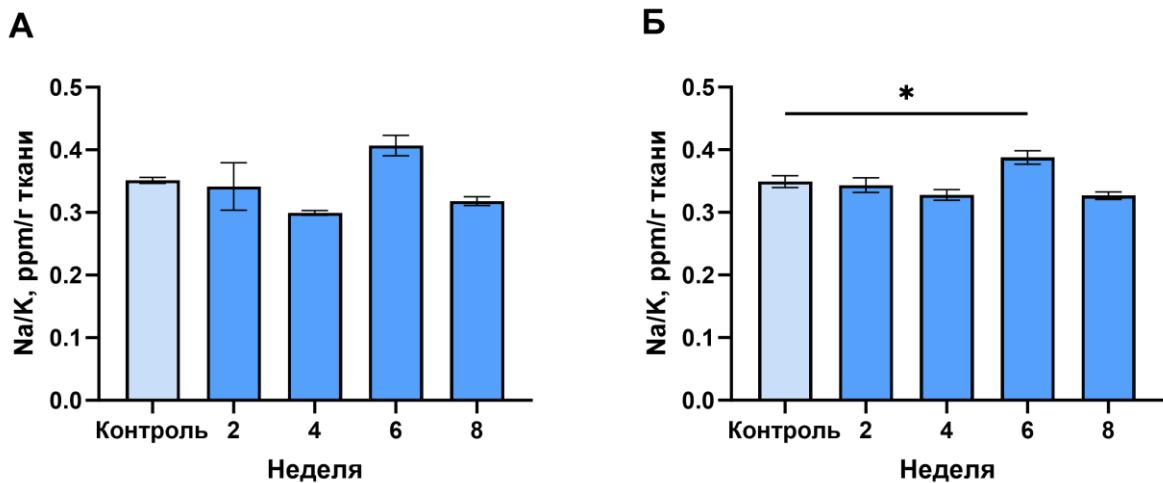


Рисунок 25. Соотношение уровней Na и K в стриатуме (А) и мозжечке (Б) у контрольных мышей (8-я неделя) и у мышей, получавших Mn, на разных неделях эксперимента. Количество животных в группе: n=9 контроль, n=7 2 неделя, n=8 4 неделя, n=8 6 неделя, n=9 8 неделя в группе, получавшей Mn, сравнение групп проведено анализом one-way ANOVA с тестом множественного сравнения Сидак, * - p < 0,05 по сравнению с контрольной группой

4.3.5. Экспрессия изоформ Na,K -АТФазы в стриатуме и мозжечке мышей при хроническом потреблении хлорида марганца

В стриатуме содержание $\alpha 1$ Na,K -АТФазы повышалось в 4,37 раз ($p<0,0001$, $F(4, 36) = 11,20$) относительно контрольного уровня только на 2-й неделе эксперимента (рисунок 26А). Количество других изоформ Na,K -АТФазы ($\alpha 2$ и $\alpha 3$) оставалось на уровне контрольных значений в течение всего эксперимента (рисунок 26Б-В). В мозжечке на второй неделе исследования происходило увеличение экспрессии всех трех изоформ: $\alpha 1$ в 2,6 раз ($p<0,01$, $F(4, 31) = 5,96$), $\alpha 2$ в 3,7 раз ($p<0,0001$, $F(4, 31) = 18,82$), $\alpha 3$ в 2,4 раза ($p<0,0001$, $F(4, 31) = 24,88$) относительно контрольной группы. В остальные временные точки содержание $\alpha 1$ и $\alpha 2$ в мозжечке не отличалось от контрольных значений. В свою очередь

экспрессия $\alpha 3$ в мозжечке была ниже в 2,3 раза ($p<0,05$, $F(4,31) = 24,88$), чем в контроле, на шестой неделе эксперимента (рисунок 26E).

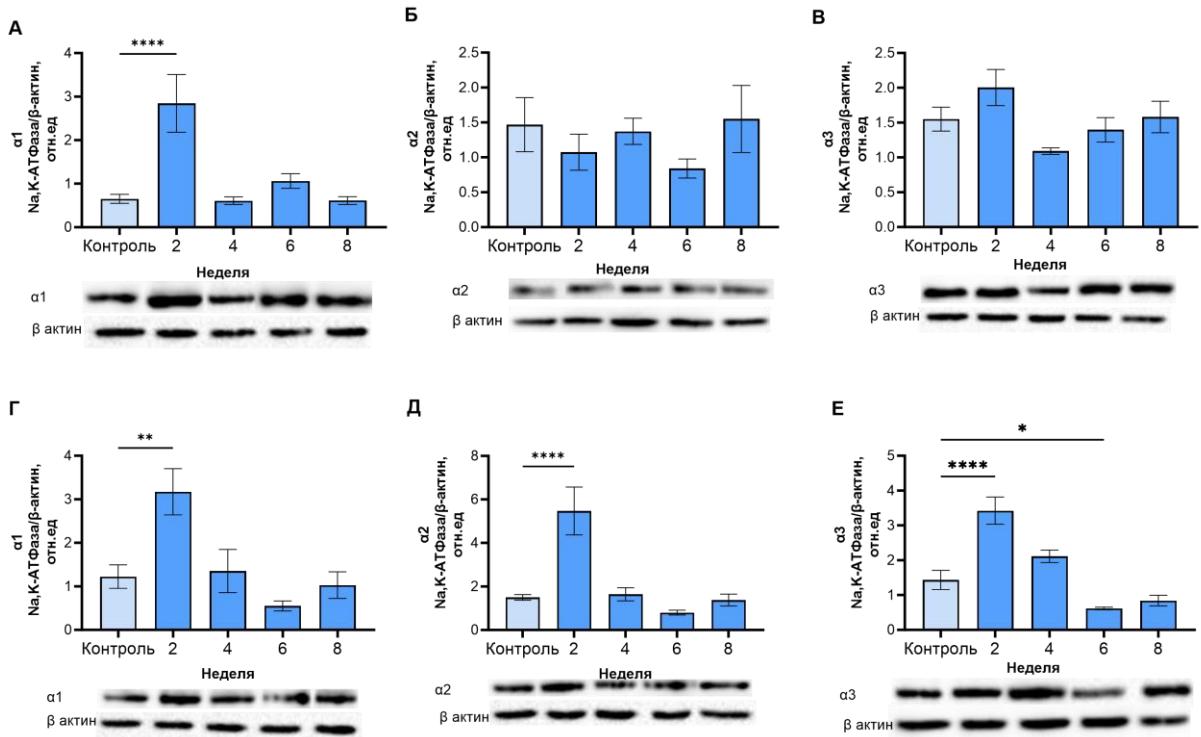


Рисунок 26. Экспрессия $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$ изоформ Na,K-АТФазы в стиатуме (A-B) и мозжечке (Г-Е) у контрольных мышей (8 неделя) и на разных неделях эксперимента в Mn-группе. Количество животных в группе: 9 в контроле и 7, 8, 8 и 9 на 2-й, 4-й, 6-й и 8-й неделях в группе, получавшей Mn, сравнение групп проведено анализом one-way ANOVA с тестом множественного сравнения Сидак, * - $p < 0,05$, ** - $p < 0,01$, *** - $p < 0,0001$ по сравнению с контрольной группой. Под графиками приведены репрезентативные изображения иммунореактивных полос

4.3.6. Активность Na,K-АТФазы в мозжечке в мышь при хроническом потреблении хлорида марганца

В связи с тем, что накопление марганца и изменение экспрессии субъединиц Na,K-АТФазы было зафиксировано в мозжечке, то измерение активности

проводили также в этой структуре. Было обнаружено, что активность уабаинчувствительной Na,K-АТФазы снижается только на второй неделе потребления марганца ($0,37 \pm 0,07$ мкМ/мг белка/мин по сравнению с $1,30 \pm 0,49$ мкМ/мг белка/мин в контроле, $p < 0,01$, $F(4, 28) = 4,79$, рисунок 27).

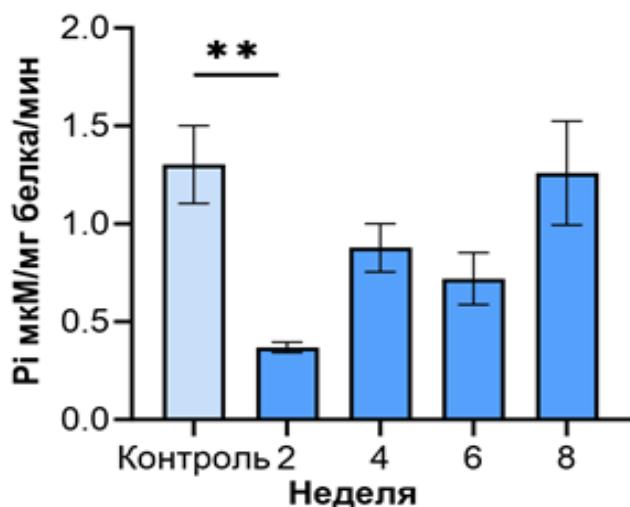


Рисунок 27. Активность Na,K-АТФазы в мозжечке у контрольных мышей (8 неделя) и на разных неделях эксперимента в Mn-группе. Количество животных в группе: 9 в контроле и 7, 8, 8 и 9 на 2-й, 4-й, 6-й и 8-й неделях в группе, получавшей Mn, сравнение групп проведено анализом one-way ANOVA с тестом множественного сравнения Сидак, ** - $p < 0,01$ по сравнению с контрольной группой

4.3.7. Содержание катехоламинов в стриатуме мышей при хроническом потреблении хлорида марганца

В настоящем эксперименте статистически значимых различий в содержании дофамина во всех исследуемых временных точках выявлено не было, однако отмечалась тенденция к снижению содержания дофамина у животных после 2-х и 4-х недель потребления марганца ($12,30 \pm 4,93$ нМ/г на 2 неделе, $p=0,0875$, $11,34 \pm 3,133$ нМ/г ткани на 4 неделе, $p=0,06$, против $28,56 \pm 5,519$ нМ/г ткани в контроле, $F(4, 30) = 2,525$, рисунок 28А). Вместе с этим в те же сроки (2 и 4 недели) у

мышей группы Mn наблюдалось снижение содержания серотонина по сравнению с контрольными животными ($1,30 \pm 0,66$ нМ/г на 2 неделе, $p < 0,05$, $1,175 \pm 0,83$ нМ/г ткани на 4 неделе, $p < 0,05$, против $2,74 \pm 0,99$ нМ/г ткани в контроле, $F(4, 29) = 3,534$, рисунок 28Б).

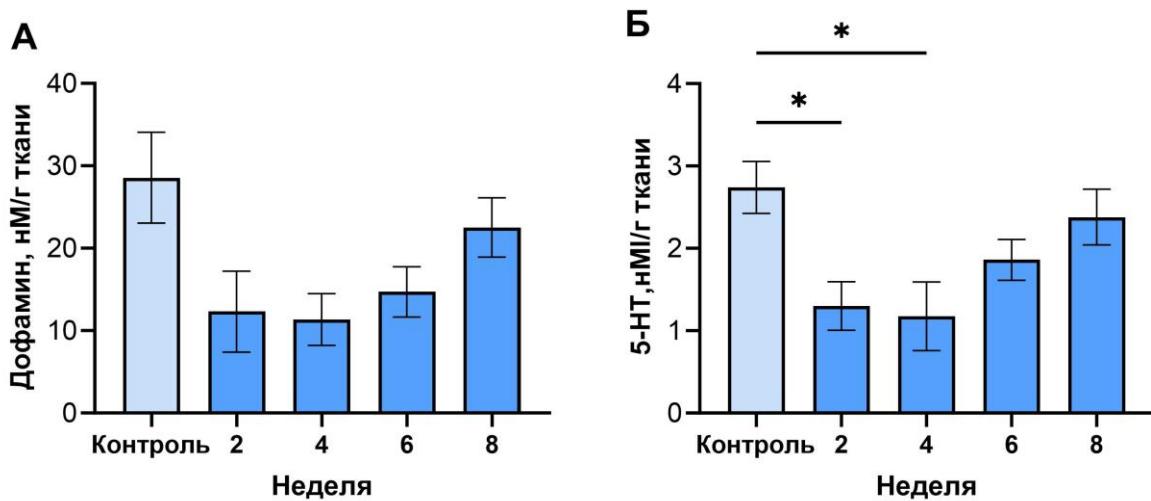


Рисунок 28. Содержание дофамина (А) и серотонина (Б) в стриатуме у контрольных мышей (8 неделя) и на разных неделях эксперимента в Mn-группе. Количество животных в группе: 9 в контроле и 7, 8, 8 и 9 на 2-й, 4-й, 6-й и 8-й неделях в группе, получавшей Mn, сравнение групп проведено анализом one-way ANOVA с тестом множественного сравнения Сидак, * - $p < 0,05$ по сравнению с контрольной группой

4.3.8. Активация внутриклеточных сигнальных каскадов и количество белков в стриатуме мышей при хроническом потреблении хлорида марганца

Было проведено исследование активации внутриклеточных сигнальных каскадов с участием pAkt (Ser473)/Akt и pERK1/2 (Thr202/ Tyr204) /ERK1/2 в стриатуме животных при хроническом потреблении Mn. На второй неделе эксперимента происходило увеличение активности киназы ERK1/2 в 2,17 раза по сравнению с контрольными животными ($p < 0,05$, $F(4, 17) = 2,16$), в остальные

временные точки разницы между экспериментальными группами обнаружено не было (рисунок 29А).

Изменений в активности киназы Akt на всем протяжении эксперимента обнаружено не было, однако на последней неделе эксперимента активность Akt у мышей, потреблявших Mn, была в 1,43 выше, чем у контрольных животных ($p=0,005$, $F(4,18)=2,07$, рисунок 29Б).

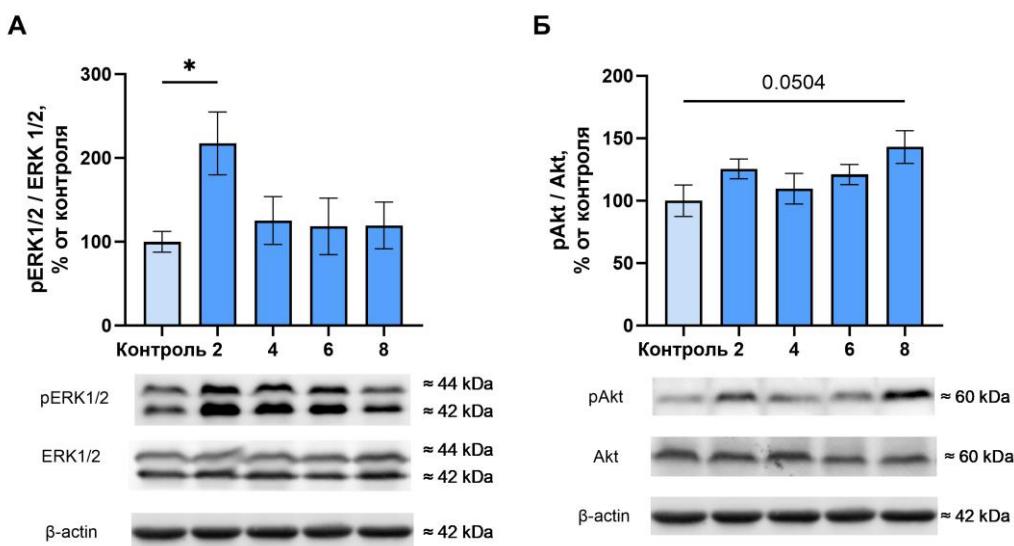


Рисунок 29. Влияние потребления Mn на активацию ERK1/2 (А) и Akt (Б) в стриатуме мышей на разных неделях эксперимента. Изображение характерных иммунореактивных полос на мембране. Данные представлены в виде среднего значения \pm SEM, $N = 9$, сравнение групп проведено анализом one-way ANOVA с тестом множественного сравнения Сидак, *— $p < 0,05$ по сравнению с контрольной группой. Под графиками приведены репрезентативные изображения иммунореактивных полос

Потребление мышами хлорида марганца в течение 8 недель не привело к изменению содержания белка Bak на всем протяжении эксперимента (рисунок 30А). На восьмой неделе эксперимента было обнаружено, что у мышей, потреблявших марганец, увеличено содержание белка Вах в 1,8 раза ($p<0,05$, $F(4,$

$18) = 3,422$, рисунок 30Б) и белка Bcl-xL в 1,6 раза ($p < 0,05$, $F(4, 19) = 3,956$, рисунок 30В) по сравнению с контрольными животными.

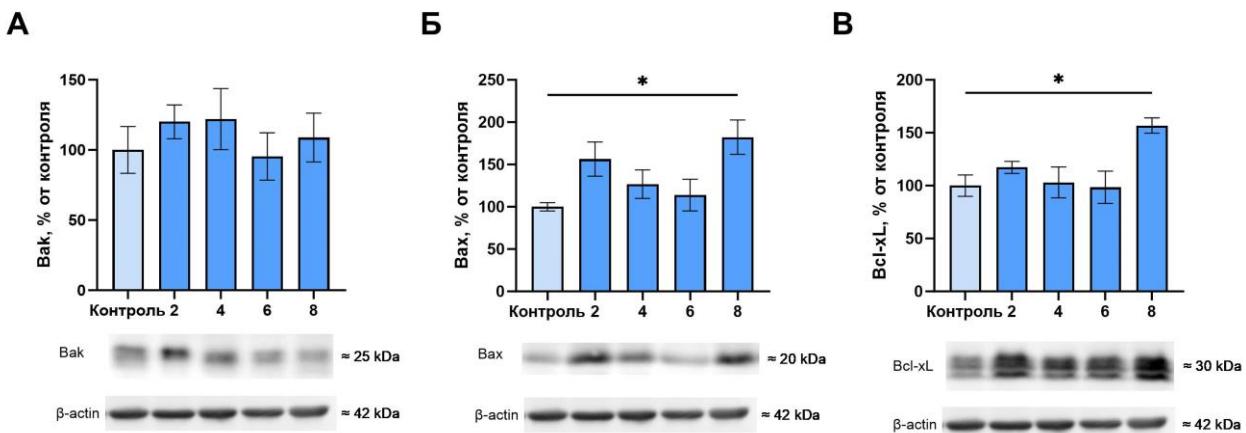


Рисунок 30. Влияние хронического потребления Mn на количество белков Bak (А), Bax (Б) и Bcl-xL (В) в стриатуме мышей в разные временные промежутки эксперимента. Изображение характерных иммунореактивных полос на мемbrane. Данные представлены в виде среднего значения \pm SEM, $N = 9$, сравнение групп проведено анализом one-way ANOVA с тестом множественного сравнения Сидак, *— $p < 0,05$ по сравнению с контрольной группой. Под графиками приведены репрезентативные изображения иммунореактивных полос

Двигательные симптомы манганизма тесно перекликаются с симптомами, развивающимися у людей с гаплонедостаточностью гена, кодирующего нейрональную $\alpha 3$ -субъединицу Na,K-АТФазы. Для проверки гипотезы о том, что двигательные симптомы манганизма могут быть связаны с Mn-индуцированным подавлением экспрессии Na,K-АТФазы в стриатуме и мозжечке мышей при накоплении Mn была использована известная мышиная модель манганизма, основанная на потреблении Mn с питьевой водой [Freeman, 2020]. Настоящее исследование показало связь между повышением уровня Mn в мозжечке и развитием нарушений в обучении и двигательной активности в мышиной модели манганизма. Однако, в ходе данного эксперимента не выявлено четкой связи

между накоплением Mn, изменением экспрессии изоформ Na,K-АТФазы в стриатуме и мозжечке, суммарной активностью Na,K-АТФазы в мозжечке и изменениями в результатах поведенческих тестов. Отклонения в поведении мышей в teste «наклонная решетка», свидетельствующие о нарушении двигательной координации, наблюдались в одни и те же сроки (2 неделя эксперимента), что и увеличение экспрессии $\alpha 1$ - $\alpha 3$ изоформ в мозжечке и $\alpha 1$ в стриатуме стриатуме, а также снижение активности Na,K-АТФазы в мозжечке. Однако эти поведенческие нарушения развивались на фоне стабильно поддерживаемого уровня Mn на уровне контрольных значений в стриатуме и повышенного в мозжечке. Другие изменения поведения, выявленные в пищедобывающем teste в челночной камере, - снижение поискового поведения и оперантного обучения - соответствовали по времени накоплению Mn в мозжечке мышей, но возникали на более поздних сроках эксперимента (3-8) по сравнению с обнаруженными изменениями активности и экспрессии Na,K-АТФазы.

В настоящем исследовании мыши потребляли Mn с питьевой воду (0,5 г Mn/л) в течение восьми недель. Расчетное потребление Mn мышами группы Mn составило 75 мг/кг/сут, что хорошо согласуется с расчетным потреблением Mn с питьевой водой в других исследованиях на мышах (60-80 мг/кг/сут) [Freeman, 2020]. Однако, несмотря на такое сходство в потреблении Mn мышами, накопление Mn в мозжечке составило всего 129-147% от контрольных значений в течение последних четырех недель эксперимента, а в стриатуме не происходило значимых изменений уровня содержания Mn. У мышей, хронически получавших Mn в дозе 10-60 мг/кг/сут через пероральный зонд, подкожно имплантированные осмотические насосы или питьевую воду, через 3-8 недель эксперимента отмечалось повсеместное накопление Mn в различных областях мозга [Sepúlveda, 2012; Krishna, 2014]: 1,6-2,1-кратное увеличение содержания Mn в стриатуме и 1,8-2-кратное - в мозжечке.

Первые признаки нарушения двигательной активности у мышей, потреблявших Mn, проявились на второй неделе эксперимента. Эти признаки

заключаются в увеличении времени подъема в teste «Наклонная решетка». Кроме того, в группе мышей, получавших Mn, наблюдалось повышенное количество ошибок по сравнению с контролем в постановке лапы в этом же teste, которое было статистически значимым на 2-4-й неделях эксперимента. Нарушение поведения грызунов при ходьбе по решетке может отражать акинезию, связанную с дисфункцией стриатума [Wichmann, 2011]. Однако в одном из исследований при внутрижелудочном введении Mn в течение восьми недель (10 или 30 мг/кг) не было выявлено изменений в активности в «Открытом поле» [Raike, 2013]. В свою очередь, в нашем исследовании активность мышей, получавших Mn, статистически достоверно снижалась в teste «Открытое поле» на 2-й неделе и в конце эксперимента на 7 и 8 неделях. Также наблюдаемое снижение активности мышей в teste «наклонная решетка» может быть следствием ухудшения координации, что может быть связано с дисфункцией мозжечка [Raike, 2013].

В пищедобывающей задаче в «Челночной камере», начиная со второй недели, мыши, потреблявшие Mn, не демонстрировали прогресса в обучении: они получали только одно или максимум два первых подкрепления и не переходили из одного отсека в другой в поисках дальнейших пищевых гранул, что также отражалось в увеличении времени груминга. Такое поведение свидетельствует об изменении мотивации и стремления к вознаграждению у мышей, потреблявших Mn, что, возможно, отражает нарушение процесса обучения [Robinson, 2005]. Такие изменения в обучении и мотивации обычно связывают с нарушением дофаминовой и серотониновой сигнализации в мозге [Santiago, 2010]. Воздействие Mn, по-видимому, изменяет метаболизм дофамина и серотонина в мозге мышей [Krishna, 2014]. Однако в нашем исследовании образцов мы не наблюдали статистически значимых изменений в содержании дофамина стриатума, а временное снижение содержание серотонина в стриатуме происходило между второй и четвертой неделями эксперимента.

Основываясь на сходстве симптомов манганизма и заболеваний, связанных с гипонедостаточностью а3-субъединицы Na,K-АТФазы, а также на сообщении о

том, что избыточное воздействие Mn может подавлять экспрессию этой изоформы транспортера, была проанализирована экспрессия изоформ фермента в ключевых областях мозга (стриатуме и мозжечке), определяющих двигательную активность мышей. За все время исследования только на 6 неделе эксперимента было зафиксировано статистически значимое снижение экспрессии $\alpha 3$ -субъединицы в мозжечке, в остальные периоды ни одна из изученных изоформ Na,K-АТФазы не снизилась ни в одной из областей мозга. Концентрация тканевого Mn не изменялась в стриатуме, но увеличивалась в мозжечке в течение последних четырех недель эксперимента. Период полураспада белка $\alpha 3$ Na,K-АТФазы в мембранах нейронов составляет около трех суток [Romanovsky, 2005], поэтому любые необратимые изменения в экспрессии этой изоформы должны были быть выявлены в ходе восьминедельного исследования. Таким образом, наши данные не подтверждают наличие Mn-индуцированного гиперметилирования промотора $\alpha 3$ Na,K-АТФазы или обусловленного метилированием промотора подавления экспрессии $\alpha 3$ у взрослых мышей. Однако следует выяснить, является ли промотор гена $\alpha 3$ взрослых мышей более восприимчивым к устойчивому гиперметилированию по сравнению с промотором гена $\alpha 3$ у новорожденных [Wang, 2013].

Нейротокическое действие Mn связано с окислительным стрессом, при этом в различных областях мозга увеличивается накопление реактивных форм кислорода [Milatovic, 2009], что, в свою очередь, обычно приводит к подавлению активности Na,K-АТФазы [Comellas, 2006], причем изоформы $\alpha 2$ и $\alpha 3$ более уязвимы к повреждению, вызванному окислительным стрессом, чем повсеместно распространенная изоформа $\alpha 1$ [Bogdanova, 2006]. Например, у крыс, получавших перорально MnCl₂ (20 мг/мл) в течение четырех недель, было обнаружено 35%-ное снижение общей активности Na,K-АТФазы мозжечка, а также уменьшение количества $\alpha 3$ -экспрессирующих клеток Пуркинье мозжечка, что было связано с повреждением свободными радикалами [Chtourou, 2012]. Тем не менее, в

настоящем эксперименте снижение активности Na,K-АТФазы происходило только на второй неделе исследования, а затем возвращалось к контрольным значениям.

В образцах стриатума и мозжечка соотношение Na/K оставалось неизменным на протяжении всего эксперимента, что свидетельствует об отсутствии изменений в относительных объемах внеклеточного и внутриклеточного компартментов, которые можно было бы ожидать в случае грубого подавления транспорта ионов с последующим развитием отека или массивной гибели клеток в этих областях [Rossitto, 2020].

Таким образом, полученные на данном этапе данные не позволяют напрямую связать признаки поведенческих нарушений с изменениями экспрессии Na,K-АТФазы в мозжечке и стриатуме или активности в мозжечке в использованной модели манганизма, вызванными накоплением марганца.

4.4. Оценка поведенческих и нейрохимических характеристик в модели премоторной стадии паркинсонизма у мышей линии C57Bl/6, вызванной хроническим введением низкой дозы токсина МФТП

Участие Na,K-АТФазы в формировании токсин-индуцированного паркинсоноподобного поведения оценивали в новой разработанной модели с длительным ежедневным введением 3 мг/кг МФТП. Результаты настоящего исследования опубликованы в работе Timoshina et al., 2025. Схема эксперимента представлена на рисунке 31.



Рисунок 31. Структура эксперимента.

4.4.1. Оценка наличия моторных и немоторных нарушений у мышей при хроническом введении МФТП

Наличие моторной симптоматики оценивали в комплексе тестов, позволяющих проанализировать уровень координации, брадикинезии и мелкой моторики животных, а также общую локомоторную активность. На протяжении всего эксперимента в teste «Сужающаяся дорожка» животные опытной группы не различались по времени выполнения теста относительно контрольных (рисунок 32А), что свидетельствует об отсутствии дефицита баланса и координации после длительного 5 –ти недельного введения 3 мг/кг МФТП.

Начиная с третьей недели эксперимента у животных, получавших МФТП, наблюдалось увеличение времени выполнения теста «Наклонная решетка» (*неделя эксперимента*: $F(5, 100) = 4,277$, *введение МФТП*: $F(1, 100) = 22,06$, *неделя эксперимента* \times *введение МФТП*: $F(5, 100) = 1,976$, рисунок 32Б). На третьей неделе опытные животные проходили тест в 2 раза медленнее контрольных ($p<0,05$), на четвертой - в 2,4 раза ($p<0,001$), на пятой - в 2,2 раза ($p<0,0001$). В контрольной группе изменение данного параметра не происходило. Вместе с этим различий в количество совершенных ошибок при выполнении данного теста между опытной и контрольной группами выявлено не было (рисунок 32В). Также по окончании эксперимента животные обеих групп проходили равное расстояние в teste «Открытое поле» (рисунок 33А).

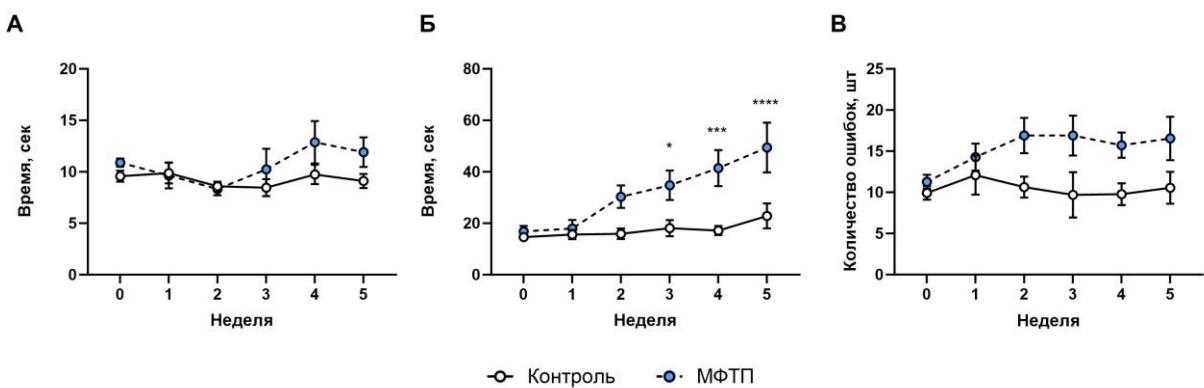


Рисунок 32. А. Время прохождения теста «Сужающаяся дорожка»; Б. Время прохождения теста «Наклонная решетка»; В. Количество ошибок, совершенных в teste «Наклонная решетка». В группе контроль $n=12$, в группе МФТП $n=11$. Данные представлены в виде среднего арифметического \pm SEM, сравнение групп проведено анализом two-way ANOVA с тестом множественного сравнения Сидак, * - $p<0,05$, *** - $p<0,001$, **** - $p<0,0001$ по сравнению с контролем

В конце пятой недели введения МФТП оценивали нарушение пространственной памяти в teste «Y-образный лабиринт», оцениваемой по количеству последовательных переходов животных между рукавами лабиринта.

Животные контрольной группы выполняли правильные чередования движений по рукавам внутри лабиринта в 73 % случаев, в то время как животные, получавшие МФТП - только в 43 % ($p<0,01$, $t=3,230$, $df=10$). Полученные данные свидетельствуют об увеличении числа повторных заходов в рукава и нарушении пространственной рабочей памяти у животных, получавших МФТП (рисунок 33).

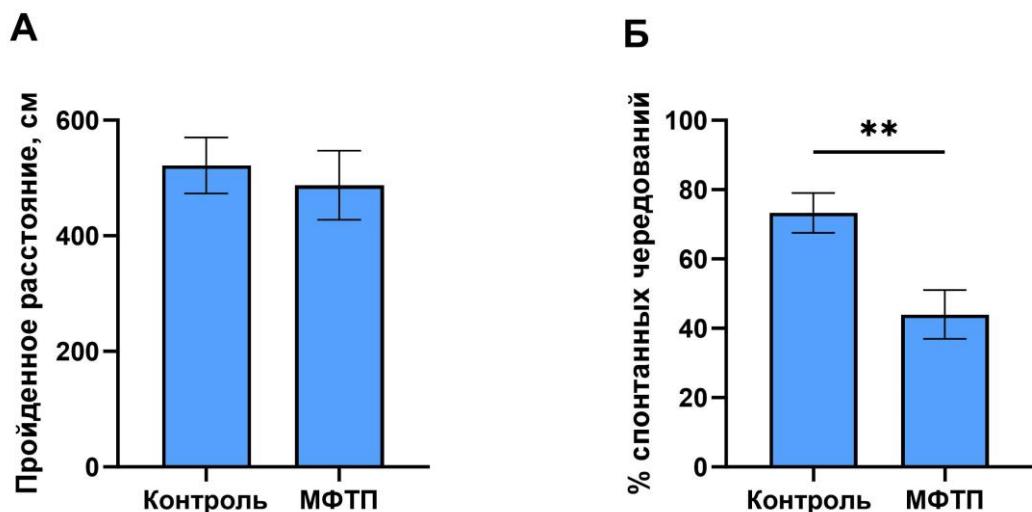


Рисунок 33. А. Пройденное животными расстояние в тесте «Открытое поле»; Б. Процент спонтанных чередований в тесте «Y-образный лабиринт». В группе контроль $n=7$, в группе МФТП $n=6$. Данные представлены в виде среднего арифметического \pm SEM, сравнение групп проведено непарным t-тестом, ** - $p<0.05$ по сравнению с контролем

Полученные в данном исследовании результаты свидетельствуют об отсутствии двигательных нарушений в поведении животных и только в teste «Наклонная решетка» отмечалось снижение скорости движения животного, что указывает на начало развития брадикинезии. В целом, описываемая модель характеризует премоторную стадию паркинсонизма. Также важным аспектом настоящей работы, характеризующей досимптоматическую стадию

паркинсонизма, явилось выявление дефицита пространственной рабочей памяти в тесте «У-образный лабиринт».

4.4.2. Содержание дофамина и его метаболитов в стриатуме и префронтальной коре головного мозга мышей, получавших МФТП

У животных, получавших МФТП, по окончании эксперимента содержание дофамина в стриатуме снизилось на 34% относительно контрольной группы ($33,43 \pm 11,07$ нМ/г и $45,77 \pm 5,56$ соответственно, $p < 0,05$, $t = 2,507$, $df = 13$, рисунок 34А). Статистически значимых изменений в содержании метаболита дофамина дигидроксифенилуксусной кислоты (ДОФУК) и соотношения ДОФУК/Дофамин, характеризующих метаболические процессы обмена дофамина, отмечено не было.

В свою очередь, в префронтальной коре произошло снижение дофамина на 52% у животных, получавших МФТП ($2,61 \pm 1,46$ нМ/г по сравнению с $4,54 \pm 2,23$ нМ/г в контроле, $p < 0,05$, $t = 2,173$, $df = 16$, рисунок 34Г). Статистически значимых изменений в содержании ДОФУК и соотношении ДОФУК/Дофамин так же, как и в стриатуме, выявлено не было.

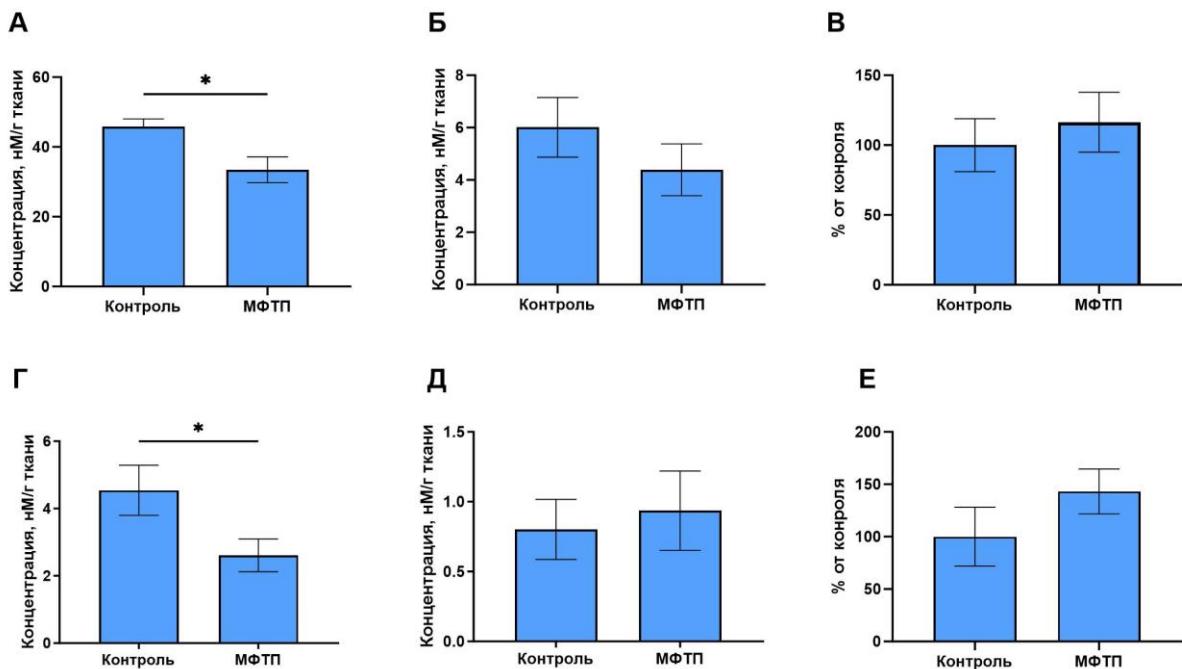


Рисунок 34. Содержание дофамина (А), дигидроксифенилуксусной кислоты (ДОФУК) (Б) и соотношение ДОФУК/Дофамин (В) в стриатуме и коре (Г, Д, Е соответственно) животных. В группе контроль n=12, в группе МФТП n=11. Данные представлены в виде среднего арифметического ± SEM, сравнение групп проведено непарным t-тестом, * - p<0.05 по сравнению с контролем

4.4.3. Активность Na_xK-АТФазы в среднем мозге и мозжечке мышей, получавших МФТП

Измерение общей активности Na_xK-АТФазы не выявило различий в работе данного фермента как в среднем мозге ($4,33 \pm 1,06$ Pi мкМ/мг белка/мин, $p=0,8893$, рисунок 35А), так и в мозжечке ($3,758 \pm 0,5722$ Pi мкМ/мг белка/мин, $p=0,2380$, рисунок 35Б) относительно контроля ($4,39 \pm 0,74$ Pi мкМ/мг белка/мин и $3,36 \pm 0,22$ Pi мкМ/мг белка/мин соответственно), что свидетельствует об устойчивости фермента к воздействию малых доз нейротоксина и отсутствии нарушения в регуляции мембранныго потенциала в ключевых структурах, задействованных в патологических процессах.

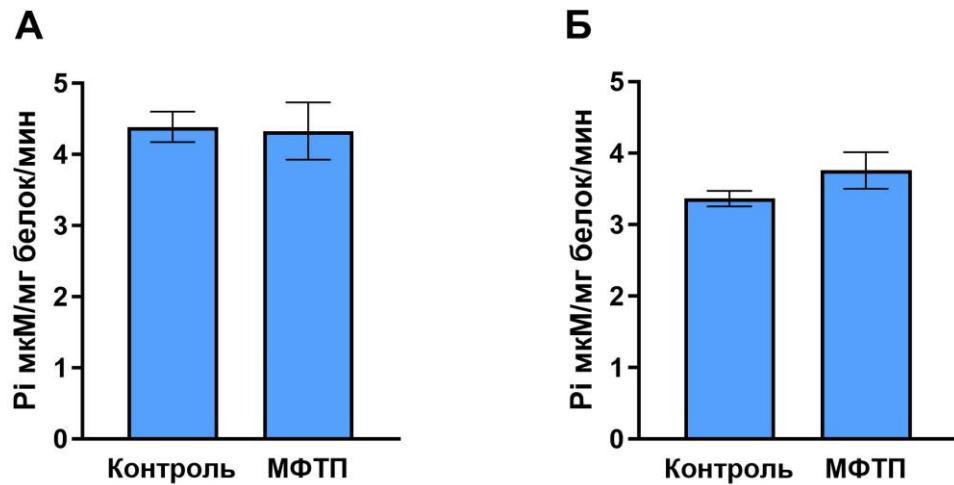


Рисунок 35. Активность Нa,К-АТФазы (мкМ/мг/мин) в среднем мозге (А) и мозжечке (Б). В группе контроль $n=12$, в группе МФТП $n=11$. Данные представлены в виде среднего арифметического \pm SEM, сравнение групп проведено непарным t-тестом

4.4.4. Оценка содержания тирозингидроксилазы в стриатуме и компактной части черной субстанции мозга мышей, получавших МФТП

Повреждение нигростриарной системы оценивали по содержанию ключевого фермента синтеза дофамина - тирозингидроксилазы в стриатуме и кЧС имmunогистохимическим методом. Хроническое введение МФТП привело к снижению количества ТГ-позитивных клеток на 22% в кЧС ($41,81\pm 16,77$ кл. против $51,19\pm 21,40$ кл. в контроле, $p<0,05$, $t=2,394$, $df=65$, рисунок 36Б) и повреждению аксональных терминалей дофаминергических нейронов в стриатуме на 37% ($p<0,01$, $t=2,945$, $df=32$, рисунок 36А) относительно контроля.

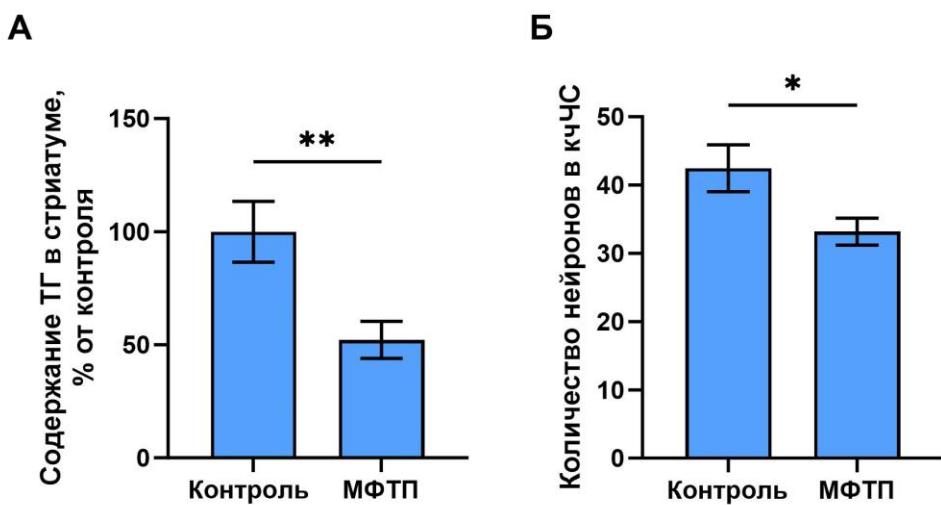


Рисунок 36. А. Изменение интенсивности окрашивания тирозингидроксилазы (ТГ) в стриатуме в процентах от контроля в градациях яркости 8-битного изображения. Б. Изменение количества дофаминергических нейронов в кЧС. В группе контроль n=12, в группе МФТП n=11. Данные представлены в виде среднего арифметического \pm SEM, сравнение групп проведено непарным t-тестом. * - p<0,05, **p<0,05 по сравнению с контролем

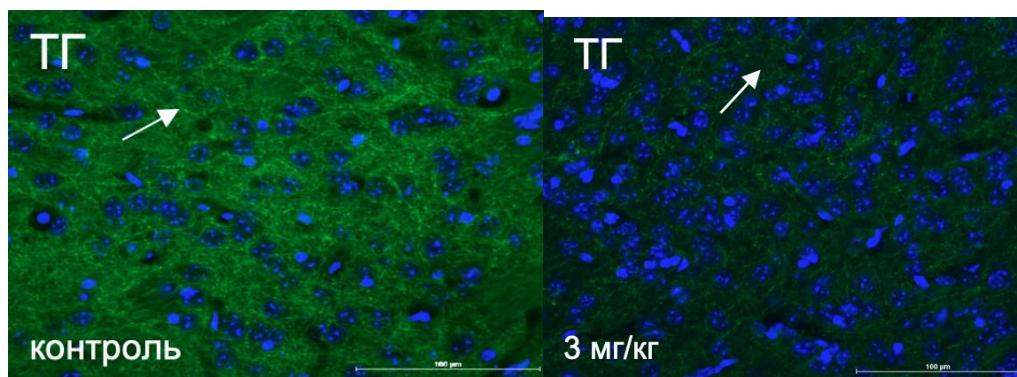


Рисунок 37. Содержание тирозингидроксилазы (ТГ) в аксиальных терминалях дофаминергических нейронов в стриатуме после хронического введения МФТП в дозе 3 мг/кг. Срез сделан на уровне 1,92 мм по атласу Paxinos and Franklin. Объектив x40.

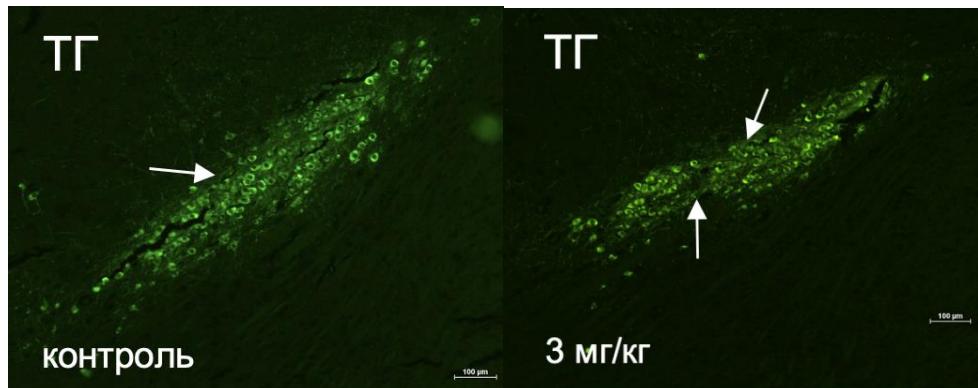


Рисунок 38. Содержание тирозингидроксилазы (ТГ) в нейронах кЧС после хронического введения МФТП в дозе 3 мг/кг. Срез сделан на уровне 1,80 мм по атласу Paxinos and Franklin. Объектив x10.

Таким образом, к 35 суткам эксперимента характерными признаками этой стадии паркинсонизма явилось снижение уровня дофамина в стриатуме на 34% с одновременным повреждением аксональных терминалей дофаминергических нейронов в стриатуме на 37%. При этом отмечалась менее выраженная гибель нейронов (19%) и количество ТГ-позитивных клеток в кЧС (22%), относительно данных, полученных в модели хронического введения МФТП в дозе 4 мг/кг.

4.4.5. Оценка содержания супероксиддисмутазы и цитохромоксидазы (изоформа 1) в компактной части черной субстанции мозга мышей, получавших МФТП

Количество общей супероксиддисмутазы (СОД) и цитохромоксидазы (ЦО) (изоформа 1) оценивали с помощью иммуногистохимического метода. Хроническое введение МФТП в течение 35 дней вызывает увеличение содержания ЦО на 17% ($1050 \pm 130,3$ отн.ед., $p < 0,01$, $t = 3,017$, $df = 18$, рисунок 39А) и СОД на 19,5% в кЧС ($61,83 \pm 7,31$ отн.ед., $p < 0,05$, $t = 2,815$, $df = 11$, рисунок 39Б) относительно контрольных значений ($894,3 \pm 98,08$ отн.ед. и $51,72 \pm 5,65$ отн.ед. соответственно).

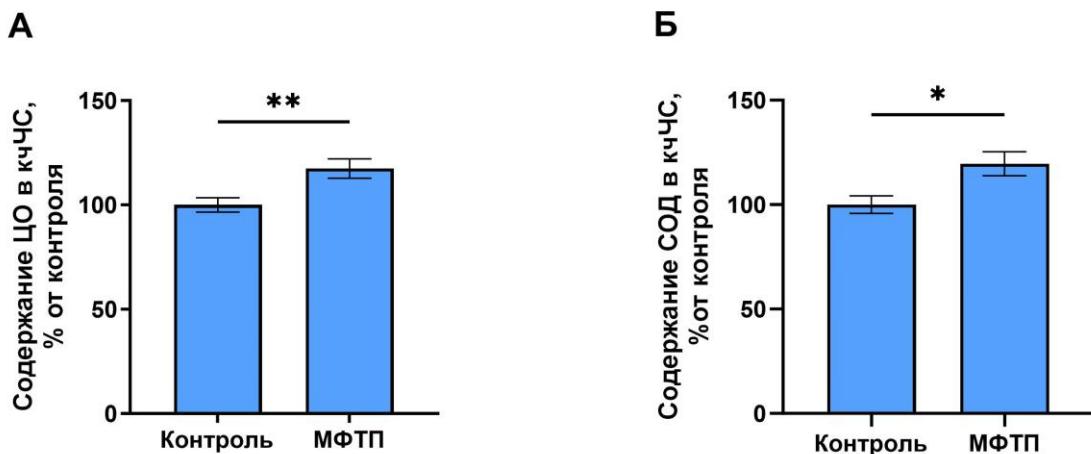


Рисунок 39. А. Изменение интенсивности окрашивания цитохромоксидазы (ЦО) в компактной части черной субстанции (кчЧС) в процентах от контроля в градациях 12-битного изображения. Б. Изменение интенсивности окрашивания супероксиддисмутазы (СОД) в компактной части черной субстанции (кчЧС) в процентах от контроля в градациях яркости 8-битного изображения. В группе контроль n=12, в группе МФТП n=11. Данные представлены в виде среднего арифметического± SEM, сравнение групп проведено непарным t-тестом. * - p<0,05, **p<0.05 по сравнению с контролем

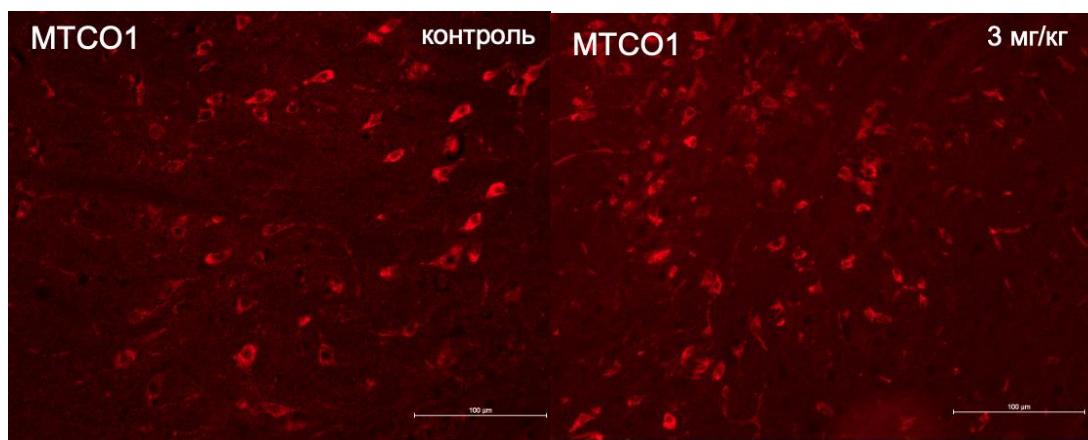


Рисунок 40. Содержание цитохромоксидазы после хронического введения МФТП в дозе 3 мг/кг .Срез сделан на уровне 1,80 мм по атласу Paxinos and Franklin. Объектив x20.

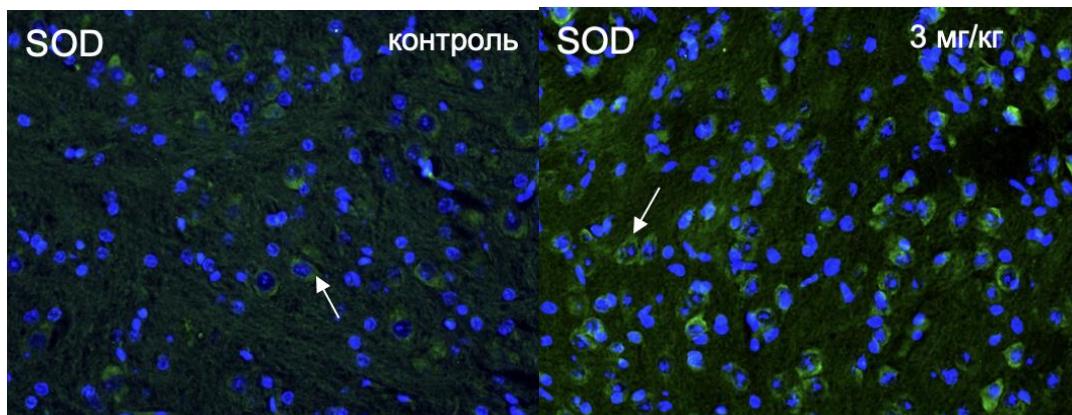


Рисунок 41. Содержание супероксиддисмутазы в телах нейронов кЧС после хронического ведения МФТП в дозе 3 мг/кг. Срез сделан на уровне 1,80 мм по атласу Paxinos and Franklin. Объектив x40.

В ходе выполнения настоящего исследования была продемонстрирована ранняя моторная стадия паркинсонизма, проявляющаяся в снижении дофамина и ТГ-позитивных нейронов кЧС на 40-50% на фоне нарушения походки животного и ухудшения общей неврологической симптоматики. Полученные результаты свидетельствуют об отсутствии двигательных нарушений в поведении животных и только в teste «наклонная решетка» отмечалось снижение скорости движения животного, что указывает на начало развития брадикинезии. Кроме этого, важным аспектом настоящей работы, характеризующей досимптоматическую стадию паркинсонизма, явилось выявление дефицита пространственной рабочей памяти в teste «Y-образный лабиринт». Полученные результаты могут иметь диагностическую значимость премоторной стадии паркинсонизма, поскольку как в экспериментальных [Bezu, 2017; Morgan, 2015], так в клинических исследованиях [Fallon, 2017; Sawamoto, 2008] нарушения когнитивных функций мозга выявляются на фоне развития тяжелей двигательной симптоматики. Известно, что когнитивный дефицит обусловлен изменениями в корково-стриatalьных связях, а ослабление рабочей памяти связан с нарушениями в работе дофаминергической системы [Yoon, 2008]. В нашей работе снижение коэффициента спонтанных альтернаций в teste «Y-образный лабиринт»

сопровождается значительным снижением содержания дофамина в ПФК и стриатуме – на 52% и 34% соответственно по сравнению с контрольными животными, не проявляющими признаков нарушения памяти, что согласуется с другими экспериментальными работами.

К 35 суткам эксперимента характерными признаками этой стадии паркинсонизма явилось снижение уровня дофамина в стриатуме на 34% с одновременным повреждением аксональных терминалей дофаминергических нейронов в стриатуме на 37%.

Полученные данные о повышении количества общей СОД и ЦО (изоформа 1) указывают на активацию АО системы и системы, поддерживающей энергетический баланс в кЧС мозга, что свидетельствует наличия компенсаторных механизмов, препятствующих развитию ОС. Увеличение активности ключевого фермента АО системы СОД говорит об усилении АО защиты, хотя ранее в работах было показано, что при воздействии МФТП уровень экспрессии генов, участвующих в путях борьбы с ОС, включая СОД, заметно снижен [Yan, 2013]. В норме ЦО IV-1 регулирует выработку синтеза АТФ в соответствии с потребностью в энергии [Kadenbach, 1992]. Введение МФТП в дозе 3 мг/кг приводит к увеличению активности ЦО IV-1. Данные показатели несколько не согласуются с данными, полученными в модели хронического введения 4 мг/кг МФТП в более короткие сроки и свидетельствующими об отсутствии изменений в функционировании ЦО к окончанию эксперимента [Berezhnaya, 2021]. В связи с этим можно предположить, что в нашем случае повышение первой изоформы ЦО может быть обусловлено компенсаторными реакциями, которые возникают при введение низкой дозы нейротоксина.

Несмотря на то, что известно о значительной дисфункции Na,K-АТФазы в моделях БП, вызванных нейротоксинами, в настоящей работе при уровне истощения дофамина на 34% изменений в функционировании Na,K-АТФазы в среднем мозге и мозжечке зафиксировано не было, на основании чего можно сделать вывод о вторичном развитии дисфункции фермента при более

значительном поражении дофаминергической системы вследствие истощения АТФ митохондрий.

Таким образом, проведенное экспериментальное исследование позволило нам описать премоторную стадию паркинсонизма, которая характеризуется нейрохимическими нарушениями в дофаминергических структурах мозга на фоне выраженного когнитивного дефицита и отсутствия двигательной симптоматики.

5. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

К настоящему моменту известно, что такие неврологические заболевания, связанные с нарушениями двигательной функции человека, как быстро развивающаяся дистония паркинсонизм (БРДП) и альтернирующая гемиплегия детства (АГД) вызваны гетерозиготными мутациями в гене ATP1A3, кодирующем нейрональную изоформу альфа-субъединицы ($\alpha 3$) Na,K-АТФазы [Salles, 2021]. Однако, к сходному симптомокомплексу приводят разнообразные мутации, преимущественно затрагивающие ион-связывающие области в трансмембранных участках данного фермента [Li, 2022]. Несмотря на общность мутационных изменений БРДП и АГД демонстрируют различные клинические особенности, при этом симптомы АГД, как правило, более выражены по сравнению с БРДП [Lazarov, 2020].

БРДП — это редкое двигательное расстройство, характеризующееся медленным или внезапным началом дистонии с признаками паркинсонизма, которое может длиться от нескольких минут до одного месяца в сочетании с выраженным бульбарными нарушениями [de Carvalho Aguiar, 2004; Haq, 2019]. АГД характеризуется ранними эпизодами гемиплегии или гемидистонии, различными пароксизмальными симптомами и нарушениями развития [Heinzen, 2014; Rosewich, 2014].

В общей сложности в настоящее время описано 32 мутации в ATP1A3, включая 29 миссенс-мутаций и 3 нонсенс-мутации. Среди них 23 генетические мутации связаны только с фенотипом БРДП, 7 связаны с промежуточным фенотипом АГД/БРДП [Yu, 2022]. Вместе с этим отмечаются случаи, когда один и тот же патогенетический вариант (например, мутации в D923N, E277K, T370N, R756H, D801Y [Roubergue, 2013]) приводит к различным клиническим исходам, что позволяет исследователям сделать предположение о существовании клинического континуума с АГД в тяжелой стадии и БРДП в виде более мягкого течения заболевания [Rosewich, 2014], а манифестация и тяжесть заболевания

определяются не только работой Na,K-АТФазы, но и внешними модулирующими факторами, которые требуют изучения [Salles, 2021].

В целом, мутации в ATP1A3 вызывают неврологические расстройства с различными фенотипами и различной степенью тяжести, однако механизмы, определяющие течение заболевания, не изучены, в значительной степени неизвестно, связана ли тяжесть со степенью функционального нарушения а3-субъединицы. По-прежнему недостаточно данных о том, как различные мутации нарушают насосную функцию и только ли функциональными нарушениями работы Na,K-АТФазы определяются заболевания.

Известно, что как для АГД, так и для БРДП характерна пониженная активность Na,K-АТФазы [Heinzen, 2012; Weigand, 2014]. Однако для БРДП отмечается также снижение содержания а3-субъединицы в мозге пациентов [de Carvalho Aguiar, 2004]. Вместе с этим для мутаций, связанных с БРДП, показано снижение Na-сродства, в то время как для мутаций, связанных с АГД - нарушение фосфорилирования, активируемого Na, снижение тока накачки и потеря протонного тока [Li, 2022]. В *in vitro* и *in vivo* экспериментах различных исследовательских групп по моделированию мутаций в ATP1A3 обнаружено, что мутации, которые приводят к высокой смертности животных (например, I758S), не оказывают никакого влияния на ионный ток насоса, в то время как мутации снижающие ток (например, I274T) не приводят к гибели животных, на основании чего авторами высказывается предположение, что механизмы, участвующие в регуляции апоптоза путем снижения активности Na,K-АТФазы, могут быть не связаны с изменением градиентов Na⁺ и K⁺ [de Carvalho Aguiar, 2004].

Тогда какими еще факторами можно объяснить фенотипическое разнообразие мутаций ATP1A3? Помимо своей основной насосной функции Na,K-АТФаза взаимодействует с киназами/фосфатазами, такими как фосфоинозитид-3-киназа, Src и PP2A, сигнальными молекулами, такими как IP3 [Reinhard, 2013; Therien, 2000], глутаматными (NMDA, AMPA) [de Lores Arnaiz, 2014; Akkuratov, 2015] и дофаминовыми (D1R, D2R) рецепторами [Zhang, 2013] и

белками цитоскелета ankyrinB и аддуцин [Liu, 2007; Mohler, 2005; Кривой, 2014]. Соответственно, мутации в Na,K-АТФазе, приводящие к структурным изменениям белка или снижению его экспрессии, могут быть связаны с нарушением внутриклеточных сигнальных взаимодействий. Сообщается, что гетерозиготная мутация, которая только ухудшает активность Na,K-АТФазы, вызывает относительно легкое заболевание, в то время как мутация, которая нарушает нормальное позиционирование α -субъединицы в мембране, может вызвать более тяжелое течение заболевания и привести к гибели нейронов независимо от инактивации ионного насоса [Arystarkhova, 2019], что подтверждает важность изучения не только нарушений насосной функции Na,K-АТФазы, но также её участие в трансдукции внутриклеточных сигналов. Отдельно стоит отметить, что мутации, приводящие к нарушению связывания Na,K-АТФазы с кардиотоническими стероидами (например, E815K), вызывают более тяжелый фенотип АГД, чем не нарушающие связывание КТС (например, D801N) [Sasaki, 2014]. В данном случае роль Na,K-АТФазы в качестве рецептора к эндогенным КТС может служить объяснением менее выраженного фенотипа, наблюдаемого при мутации D801N по сравнению с мутацией E815K, а КТС выступать регуляторами степени тяжести заболевания [Weigand, 2014].

К настоящему моменту известно, что эндогенные кардиотонические стероиды могут модулировать работу Na,K-АТФазы и при связывании с ней запускать внутриклеточные сигнальные каскады. В данной работе было проведено исследование механизмов нейротоксичности уабаина в наномолярных концентрациях на клетках нейробластомы человека SHY5Y, недифференцированных и дифференцированных по дофаминергическому типу, являющихся хорошим модельным организмом для проведения *in vitro* экспериментов по изучению механизмов патофизиологии болезни Паркинсона [Xico, 2017]. Было показано, что уабайн токсичен в концентрации 10 нМ для недифференцированной культуры клеток и 100 нМ для дифференцированной культуры. Известно, что использование в качестве агента дифференцировки

ретиноевой кислоты приводит к формированию более устойчивого к действию токсинов клеточного фенотипа [Cheung, 2009], таким образом наблюдаемое различие в чувствительности культуры может быть обусловлено дифференцировкой клеток. В настоящей работе показано, что гибель клеток недифференцированной культуры сопровождалась снижением содержания антиапоптотического белка Bcl-2. Ранее на других клеточных линиях было продемонстрировано влияние уабаина на апоптоз за счет регуляции белков-регуляторов апоптоза. Так, уабаин приводит к остановке пролиферации клеток культуры RAW264.7 за счет нарушения соотношения белков Bcl-2 и Bax [Luo, 2018]. Вместе с этим в первичной культуре нейронов уабаин в концентрациях менее 1 нМ предотвращает NMDA-индуцированное снижение Bcl-2 в первичной культуре нейронов [Antonov, 2009]. Вместе с этим реализация токсического действия уабаина как на недифференцированную культуру, так и на дифференцированную, происходит при участии ПК С. Известно, что в зависимости от типа ткани ПК С может как увеличивать активность Na,K-АТФазы, так и снижать [Middleton, 1993; Vasilets, 1990]. В свою очередь в экспериментах *in vitro* на первичной культуре нейронов уабаин в наномолярных концентрациях активирует ПК С, что, однако, сопровождается большей выживаемостью нейронов в условиях гипергемоцистенемии [Ivanova, 2020]. В экспериментах *in vivo*, напротив, активация ПК С вызывает дисфункцию нейрональной Na,K-АТФазы [de Lores Arnaiz, 2014]. Активация МАР-киназного пути при действии кардиотонических стероидов является широко-известной и продемонстрирована на различных культурах клеток. Так, показано что в первичной культуре клеток мозжечка крысы уабаин приводит к активации ERK1/2 через активацию Src-субъединицы а1-NaK-АТФазы [Karpova, 2010; Lopachev, 2016], инкубация уабаина с первичной культурой клеток коры головного мозга также приводит к активации киназы ERK1/2 [Lopachev, 2018]. Также известно, что инкубация уабаина с культурой клеток почки свиньи РУ-17 приводит к активации ERK1/2,

опосредованной активацией ПК С [Madan, 2017], что согласуется с данными, полученными в настоящем исследовании. Таким образом, на основании полученных данных можно сделать вывод, что в культуре клеток человеческой нейробластомы уабаин приводит к активации ПК С и последующей активации МАР-киназного пути, что вызывает нарушение соотношения белков-регуляторов апоптоза и гибель клеток. Важно отметить, что в экспериментах по изучению изменений в экспрессии генов в нейронах человека, полученных из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (иПСК), экспрессирующих DARPP-32 (32-kD dopamine and cAMP regulated phosphoprotein) и ГАМК-рецепторы обнаружено, что инкубация 30 нМ уабаин с культурой нейронов в течение 16 часов активирует гены, связанные с созреванием нейронов и формированием синапсов, путем увеличения экспрессии генов, связанных с трансляцией, везикулярным транспортом и усилением функции цепи переноса электронов, наблюдаемые изменения в транскрипции связаны с активацией МАР-киназы ERK1/2 и транскриptionного фактора CREB [Lopachev, 2021]. Таким образом, наибольший интерес представляет дальнейшее изучение киназы ERK ½ в реализации нейротоксического действия уабаина в экспериментах *in vivo*. Также в настоящей работе было показано, что воздействие уабаина в токсических концентрациях приводит к снижению содержания дофамина в дифференцированной и недифференцированной культуре клеток нейробластомы человека SH-SY5Y. Из литературных данных известно, что ингибирование Na₊К⁻АТФазы уабаином приводит к дозозависимому увеличению выброса дофамина в стриатуме и ПФК [Boireau, 1998; Gursoy, 2022; Sui, 2013] непосредственно после введения данного КТС. В свою очередь наблюдаемое нами снижение содержания дофамина может быть связано с быстрым удалением медиатора из синаптической щели, о чем свидетельствует повышение соотношения ГВК/ДА в лизатах клеток нейробластомы спустя 4 часа инкубации с уабаином.

Известно, что наиболее чувствительными клетками к мутациям в ATP1A3 являются ГАМК-эргические нейроны базальных ганглиев, мозжечка и гиппокампа,

в которых наблюдается повышенное содержание $\alpha 3$ -субъединицы по сравнению с другими структурами головного мозга [Jiao, 2022]. Анатомическим субстратом для развития атаксических и дистонических нарушений служат мозжечок и базальные ганглии. Клетки Пуркинье мозжечка уникальны тем, что экспрессируют исключительно $\alpha 3$, что делает их функционирование особенно чувствительным к мутациям в данной субъединице [Judd, 2021]. Кроме того, клетки Пуркинье обладают высокой плотностью Na-каналов, что приводит к большой нагрузке на Na,K-АТФазу при восстановлении мембранныго потенциала после передачи возбуждения [Rossi, 2018]. Дистония является симптомом дисфункции мозжечка, связанной с его аномальной активностью [Brown, 2023], в то время как атаксия развивается при подавлении активности мозжечка вследствие его атрофии или по иной причине [Fremont, 2014]. Действительно, снижение активности или экспрессии $\alpha 3$ субъединицы Na,K-АТФазы может привести к ингибированию клеток Пуркинье и гипервозбуждению мозжечка с последующим нарушением передачи сигнала в базальных ганглиях, что в конечном итоге приводит к дистонии, являющейся характерным симптомом при БРДП и АГД [Jinnah, 2017; Fremont, 2015]. В экспериментах *in vivo* ингибирование $\alpha 3$ -изоформы введением уабаина в мозжечок вызывало у мышей симптомы, похожие на дистонию, а при одновременном введении в мозжечок и базальные ганглии более низкой концентрации уабаина наблюдались легкие симптомы дистонии-паркинсонизма, которые нивелировались при нарушении передачи сигнала между мозжечком и базальными ганглиями [Calderon, 2011]. При посмертном гистопатологическим анализе мозга больных с БРДП не было обнаружено специфической гибели нейронов в мозжечке и базальных ганглиях, за исключением умеренной гибели клеток Пуркинье и активации астроцитов в исследуемых областях [Sampson, 2016; Vezyroglou, 2022]. Отсутствие специфического нейродегенеративного процесса также свидетельствует о главенствующей роли нарушения функциональных межклеточных и внутриклеточных взаимодействий, вызванных мутациями в ATP1A3.

В 2011 году группа ученых под руководством Calderon разработала фармакологическую модель БРДП, основанную на ингибиции Na,K -АТФазы путем одновременного введения в мозжечок и стриатум уабаина. Авторы отмечают, что введение уабаина в стриатум в дозах 518,4 нг (7,2 нг/час в течение 72 часов), 1296 нг (18 нг/час в течение 72 часов), 2592 нг (36 нг/час в течение 72 часов), 5184 нг (72 нг/час в течение 72 часов) приводит к снижению подвижности животных, а именно снижению скорости передвижения в открытом поле, снижению количества шагов и уменьшению размера шага. Однако длительное введение уабаина в желудочки (25920 нг, 360 нг/час в течение 72 часов) не привело к развитию паркинсоноподобной симптоматики. Кроме этого, введение уабаина в дозах, аналогичных введенным в стриатум (518,4 нг, 1296 нг, 2592 нг, 5184 нг), в мозжечок вызвало у животных атаксию, переходящую в генерализованную дистонию при увеличении количества уабаина [Calderon, 2011]. Использование высоких концентраций КТС в данной модели БРДП накладывает ряд ограничений в понимание механизмов течения данного заболевания. Так, при введении уабаина в мозжечок наблюдают специфическое блокирование α_3 -субъединицы Na,K -АТФазы, однако в базальных ганглиях ингибируется как α_3 , так и α_1 ; невозможно оценить рецепторную функцию α_3 -субъединицы и изменение внутриклеточных каскадов при данном протоколе введения КТС. Использование высоких концентраций уабаина вызывает значительное ингибирование Na,K -АТФазы, приводящее к гибели нейронов стриатума, вследствие чего наблюдаемые двигательные нарушения могут быть результатом нейродегенеративного процесса, а не функциональных изменений. В целом, авторы предложили интересную модель, основанную на ингибировании работы Na,K -АТФазы, в свою очередь в выполненной нами работе эксперименты по оценке влияния КТС на двигательные функции животных направлены на изучение действия уабаина в концентрациях, не снижающих активность Na,K -АТФазы. В экспериментах *in vivo* было проведено сравнение влияния однократного билатерального внутрижелудочкового введения 0,5 мкл 50 мкМ уабаина (14,6 нг)

и четырехкратного унилатерального внутрижелудочкового введения 1,5 мкл 50мкМ (175,2 нг, 43,8 нг/сутки в течение 4 суток) уабаина на двигательные функции животных и биохимические параметры в различных структурах мозга. Было показано, что однократное введение уабаина приводит к увеличению двигательной активности животных и формированию стереотипичных движений в течение одного часа после введения вещества. Также уабайн вызывает активацию киназ Akt и ERK1/2 в стриатуме мышей через 30 минут после введения, увеличение активности Na,K-АТФазы в стриатуме через 10 минут после введения и снижение её активности в среднем мозге через 30 минут после введения. В свою очередь многократное введение уабаина также вызывает гиперлокомоцию, сохраняющуюся через 24 часа после последнего введения КТС и сопровождающуюся нарушением координации движений. Вместе с этим было обнаружено, что четырехдневное введение уабаина приводит к снижению активности киназы Akt и содержанию NR2B-субъединицы NMDA рецептора. Ранее было показано, что однократное внутрижелудочковое введение уабаина мышам и крысам приводит к формированию мания-подобного поведения, опосредуемого активацией дофаминергической сигнализации через активацию киназ ERK1/2 и Akt [Maidana, 2025; El-Mallakh, 2003; Kim, 2008], что согласуется с данными, полученными в настоящем исследовании. Часто у больных с БРДП помимо двигательной симптоматики отмечаются когнитивные дисфункции, связанные с нарушением верbalного обучения, зрительной памяти, вниманием, а также расстройства настроения, психозы, дистимия, часто диагносцируется биполярное расстройство [Salles, 2021]. Генетические линии животных с мутациями в ATP1A3, рассматривающиеся как модели БРДП (линия Myshkin) и АГД (линия Mashlool) с соответствующими двигательными симптомами, также проявляют такие особенности поведения, как гиперактивность, нарушения циркадного ритма и сна, нарушение обучения. Таким образом, клинические данные и экспериментальные результаты свидетельствуют о роли дисфункций

Na,K-АТФазы в процессах, связанных как с двигательными расстройствами, так и с расстройствами настроения.

Симптоматика, аналогичная заболеваниям, вызванным мутациями в α 3-субъединице Na,K-АТФазы, наблюдается у пациентов с повышенным содержанием ионов марганца в структурах головного мозга. Накопление марганца в базальных ганглиях и мозжечке вследствие избыточного попадания из окружающей среды с вдыхаемым воздухом, питьем или продуктами питания приводит к развитию окислительного стресса, митохондриальной дисфункции и гибели дофаминергических нейронов с последующим развитием паркинсоноподобной симптоматики [Гаврылышена, 2020; Шестова, 2014; Milatovic, 2009]. Нарушения в работе системы выведения марганца из организма, в частности при аутосомно-рецессивных мутациях генов-переносчиков марганца (Mn) SLC39A14 или SLC30A10, приводят к развитию дистонии-паркинсонизма в детском возрасте [Rodichkin, 2021; Quadri, 2012]. Однако двигательные расстройства, возникающие у животных с нокаутом гена переносчика SLC39A14 (Slc39a14-KO), не сопровождаются изменениями в содержании стриatalного дофамина, его метаболитов, активностью ТГ, а также не связаны с гибелю нейронов кЧС [Rodichkin, 2021]. Исходя из сходства симптомов заболеваний, связанных с мутациями в α 3-субъединице и накоплением или нарушением выведения марганца, в настоящей работе мы провели эксперимент по оценке влияния потребления марганца на функционирование Na,K-АТФазы. В рамках настоящего исследования была проанализирована взаимосвязь поведенческих изменений в мышиной модели манганизма при его длительном приеме с изменениями экспрессии и активности α 3-субъединицы Na,K-АТФазы в мозжечке и стриатуме животных. Потребление 0,5 г/л марганца с водой в течение 8 недель привело к снижению активности животных и нарушению обучения в пищедобывательной задаче в «Челночной камере», а также нарушению координации движений. Однако прогressирование наблюдавшихся отклонений не коррелировало с изменениями в экспрессии изоформ или общей активности Na,K-

АТФазы в исследуемых структурах. Первые проявления гиполокомоции и дискоординации происходили на 2 неделе эксперимента. В этот же период наблюдалось значительное снижение активности Na,K-АТФазы и увеличение экспрессии $\alpha 1$ - $\alpha 3$ изоформ в мозжечке, а также активация киназы ERK1/2 в стриатуме, однако после второй недели данные параметры вернулись к контрольным значениям. К настоящему времени нет однозначных данных о влиянии марганца на функционирование Na,K-АТФазы, в экспериментах *in vitro* и *in vivo* получены противоречивые данные. Известно, что трикарбонил(цикlopентадиенил)марганец вызывает нарушение проводимости седалищного нерва мыши, опосредованное снижением содержания $\alpha 1$ -субъединицы Na,K-АТФазы и её общей активности [Liu, 2000], однако в модели манганизма на крысах изменений в активности данного фермента не обнаружено [Liapi, 2008; Shukla, 1983]. Вместе с этим показано дозозависимое снижение активности Na,K-АТФазы при однократном внутривенном введении хлорида марганца [Deng, 2009]. В экспериментах *in vitro* обнаружено, что марганец не влияет на активность Na,K-АТФазы в синаптосомах мозга крысы [Chandra, 1984], а также может повышать её активность при действии в микромолярных концентрациях [Shukla, 1983 или дозозависимо понижать в более высоких концентрациях [Deng, 2012; Carfagna, 1996; Hussain, 1987].

Несмотря на то, что основными симптомами при БРДП являются брадикинезия, постуральная неустойчивость, дистония, у пациентов нейродегенерации дофаминергических нейронов не происходит [Oblak, 2014; Nicita, 2016; Vezyroglou, 2022]. Вместе с этим как у пациентов, так и в генетически моделях не снижается содержание дофамина, однако сообщается о повышении количества его метаболитов, в частности, ГВК [Zanotti-Fregonara, 2008]. Также не все случаи манганизма связаны с нейродегенеративными процессами или снижением содержания катехоламинов, вызванными марганец-индуцированным ОС [Rodichkin, 2021]. Однако, как в экспериментальных животных моделях, в том числе и в настоящей проделанной работе, так и у генетических линейных

животных с мутациями в α3-субъединице сообщается об изменении активности киназ, участвующих в передаче сигнала от дофаминергических нейронов. Так, реализация мания-подобного поведения у крыс и мышей после однократного введения уабаина в мозг сопровождается повышением активации Akt и ERK1/2 в мозге животных [Maidana, 2025; El-Mallakh, 2003; Kim, 2008]. У мышей линии Myshkin также отмечается повышение фосфорилирования ERK1/2 и Akt в гиппокампе [Kirshenbaum, 2011]. В свою очередь, хроническое потребление марганца как взрослыми животными, так и детенышами в период раннего постнатального периода приводит к увеличению фосфорилирования DARPP-32, ERK1/2 и Akt, участвующих в передаче сигналов от дофаминергической системы, что согласуется с полученными в настоящей работе данными [Cordova, 2012; Zhang, 2007]. Более того, использование нетоксических концентраций марганца, не вызывающих гибели нейронов стриатума, также вызывает активацию ERK1/2 [Peres, 2013]. В нервной системе, как правило, путь MAP-ERK активируется внеклеточными сигналами, которые действуют через рецепторы, связанные с G-белками (GPCR), и рецепторную тирозинкиназу (PTK). Цитоплазматические мишени pERK1/2 участвуют в апоптозе и нейрогенезе. Известно, что индукция активации ERK1/2 во время эмбрионального развития факторами роста поддерживает пролиферацию, дифференцировку и выживание нервных клеток, в то время как отсутствие факторов роста активирует пути p38 и JNK, что приводит к апоптозу [Albert-Gascó, 2020]. В ранее проведенных исследованиях показано, что внутриклеточные сигнальные каскады с вовлечением ERK1/2 участвуют в гибели нейронов и нейродегенеративных процессах при БП [Cheung, 2004]. В экспериментах по фармакологическому моделированию БП на грызунах было показано, что при паркинсонизме происходит активация митохондриальной ERK-киназы, а использование ингибитора ERK1/2 защищает нейроны от действия нейротоксинов [Kulich, 2007; Cavanaugh, 2006]. Кроме этого, p-ERK1/2 был обнаружен в митохондриях дегенерирующих нейронов, полученных от пациентов с болезнью Паркинсона и деменцией с тельцами Леви [Zhu, 2003]. Таким образом,

активация ERK ½ на ранних этапах действия нейротоксических агентов может выступать общим пусковым механизмом, приводящим к нарушению в работе дофаминергических нейронов. Общность симптомов при манганизме и заболеваний, вызванных мутациями в α3- субъединице Na,K-АТФазы, позволяют рассматривать Na,K-АТФазу в качестве важного патофизиологического агента в развитии двигательных нарушений и особенно в патогенезе болезни Паркинсона. Так, во многих экспериментальных моделях токсин-индуцированного паркинсонизма на грызунах показано значительное снижение активности Na,K-АТФазы в мозге животных при развитии двигательной патологии [Lesanmi, 2019; Anusha, 2017]. В свою очередь в настоящей работе было изучено функционирование Na,K-АТФазы на ранних этапах развития нейродегенеративного процесса в модели МФТП-индуцированного паркинсоноподобного состояния. В описанной модели хроническое введение токсина МФТП в дозе 3 мг/кг в течение 35 дней приводит к нарушению мелкой моторики у животных без развития гипокинезии и дисфункцию пространственной памяти, сопровождающуюся истощением содержания дофамина в ПФК. Вместе с этим обнаруживается гибель клеток кЧС, снижение содержания ТГ и, как следствие, дофамина в стриатуме, что в совокупности с фенотипическими характеристиками свидетельствует о формировании у экспериментальных животных ранней досимптоматической стадии паркинсонизма. Наблюдаемые в кЧС нейродегенеративные процессы сопровождаются увеличением содержания ЦО без изменений в функционировании Na,K-АТФазы.

Таким образом, в ходе проведенного исследования не удалось установить прямой связи между дисфункцией Na,K-АТФазы и двигательными нарушениями, возникающими в моделях марганец-индуцированного и МФТП-индуцированного паркинсоноподобного состояния у мышей. В свою очередь, введение мышам ингибитора Na,K-АТФазы убацина не приводит к снижению ее активности или изменению в содержании субъединиц, однако вызывает гиперлокомоцию и нарушение координации движений.

6. ВЫВОДЫ

1. Недифференцированная культура нейробластомы человека SH-SY5Y более чувствительна к токсическому действию убацина, обусловленному активацией протеинкиназы С, активации ERK1/2 и снижением содержания антиапоптотического белка Bcl-2.
2. Многократное внутрижелудочковое введение ингибитора Na,K-АТФазы убацина вызывает повышение двигательной активности мышей, что соответствует мания-подобному состоянию у мышей, нарушение координации движений, сопровождающихся снижением активности киназы Akt.
3. Длительное потребление марганца приводит к снижению двигательной активности животных и дискоординации движений, манифестация данных нарушений сопровождается снижением активности Na,K-АТФазы, увеличением экспрессии всех изоформ Na,K-АТФазы в мозжечке и увеличением активности киназы ERK1/2 в стриатуме.
4. В модели предсимптоматической стадии МФТП-индуцированного паркинсонизма не происходит изменения активности Na,K-АТФазы в среднем мозге и мозжечке.

7. СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- БП — болезнь Паркинсона
- NMDA — N-метил-D-аспартат
- АМПА — α -амино-3-гидрокси-5-метил-4-изоксазолпропионовая кислота
- GlyT2 — переносчик глицина 2 типа
- GLAST — переносчик глутамата и аспартата
- GLT-1 — глиальный переносчик глутамата
- AQP4 — аквапорин 4
- КТС — кардиотонические стероиды
- AMPK — 5'АМФ-активируемая протеинкиназа
- БРДП — быстроразвивающаяся дистония-паркинсонизм
- АГД — альтернирующая гемиплегия детства
- ATP1A3 — ген, кодирующий а₃-субъединицу Na,K-АТФазы
- DBS — глубинная стимуляция мозга
- МФТП — 1-метил-4-фенилпиридиний
- ERK1/2 — extracellular signal-regulated kinase
- кЧС — компактная часть черной субстанции
- ВЭЖХ-ЭД — высокоэффективная жидкостная хроматография с электродетекцией
- МС-ИСП — масс-спектрометрия с индуктивно связанной плазмой
- АЭС-ИСП — атомно-эмиссионная спектрометрия с индуктивно связанной плазмой
- ТМ — трансмембранный
- ГАМК — гамма-аминомасляная кислота
- ЦНС — центральная нервная система
- ПК С — протеинкиназа С
- ПК А — протеинкиназа А
- ОС — окислительный стресс
- МАРК — митогенактивируемая протеин-киназа
- PLC γ — фосфолипаза С γ

PIP2 — фосфатидилинозитол-4,5-дифосфат
ДАГ — 1,2-диацилглицерид
IP3 — инозитол-1,4,5-трифосфат
IP3R — receptor инозитол-1,4,5-трифосфата
CREB — белок, связывающий ответные элементы цАМФ
NF-κB — ядерный фактор κB
CAPOS — мозжечковая атаксия, арефлексия, полая стопа, атрофия зрительного нерва и нейросенсорная тугоухость
RECA — рецидивирующая энцефалопатия с мозжечковой атаксией
FIPWE — пароксизмальная слабость и энцефалопатия, вызванные лихорадкой
EIEE — ранняя детская эпилептическая энцефалопатия
COS — детская шизофрения
DYT12 — быстроразвивающаяся дистония-паркинсонизм
АТФ — аденоzinтрифосфат
ОФЭКТ — однофотонная эмиссионная компьютерная томография
АФК — активные формы кислорода
БАС — боковой амиотрофический склероз
GSH — глутатион
EAAT2 - возбуждающий транспортер аминокислот 2 типа
EAAT1 - возбуждающий транспортер аминокислот 2 типа
NLRP3 — Nod-подобный receptor семейства NALP
цАМФ — циклический аденоzinмонофосфат
FOXO — раздвоенный блок О
ATM — мутантная телеангиэктазия атаксии
mTOR — mammalian target of rapamycin
DMT1 — транспортер двухвалентных металлов 1
NRAMP 2 — ассоциированный с естественной резистентностью макрофагальный белок 2
SLC11A2 — семейство переносчиков растворенных веществ 11, член 2

DCT1 — переносчик двухвалентных катионов 1

ZIP — семейство Zrt- и Irt-подобных белков

Tf — трансферрин

Fpn — ферропортин

ГЭБ — гематоэнцефалический барьер

SPCA1 — ионный насос Ca/Mn

МРТ — магнитно-резонансная томография

ДА — дофамин

6-OH-ДА — 6-гидроксидофамин

MPP⁺ — 1-метил-4-фенилпиридиниевый ион

ДАТ — транспортер обратного захвата дофамина

ЭТЦ — электронтранспортная цепь

NGF — нейрональный фактор роста

CNQX — 6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione

ДБА — диоксибензиламин

иЦСЖ - искусственная цереброспинальная жидкость

ТФА — 12-О-тетрадеканоилфорбол-13-ацетат

МТТ - 4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолийбромид

ДМСО — диметилсульфоксид

ICV - внутрижелудочковое

ТГ — тирозингидроксилаза

СОД - супероксиддисмутаза

ЦО — цитохромоксидаза

ДОФУК — дигидроксифенилуксусная кислота

ГВК — гомованилиновая кислота

TNF- α — фактор некроза опухоли-альфа

иПСК — индуцированные плорипотентные стволовые клетки

DARPP-32 — 32-kD dopamine and cAMP regulated phosphoprotein

GPCR — рецепторы, связанные с G-белками

РТК — рецепторная тирозинкиназа

8. СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Гаврылышена К. В., Гуревич Е. Б., Семенихин В. А., Стрижаков Л. А., Филимонов С. Н., Часовских, Е. В. К вопросу о марганцевой интоксикации //Медицина труда и промышленная экология. – 2020. – Т. 60. – №. 3. – С. 206-210.
2. Залялова З. А. Современные классификации мышечных дистоний, стратегия лечения //Журнал неврологии и психиатрии им. СС Корсакова. – 2013. – Т. 113. – №. 3. – С. 85-9.
3. Иллариошкин С. Н. Современные представления об этиологии болезни Паркинсона //Неврологический журнал. – 2015. – Т. 20. – №. 4. – С. 4-13.
4. Козина Е. А., Колачева 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.
5. Колачева А. А., Козина, Е. А., Волина, Е. В., Угрюмов, М. В. Динамика дегенерации дофаминергических нейронов и сопутствующих компенсаторных процессов в нигростриатной системе у мышей //Доклады Академии наук. – Федеральное государственное бюджетное учреждение" Российская академия наук", 2014. – Т. 456. – №. 2. – С. 246-246.
6. Королев А. Г., Новоселецкая А. В., Киселева Н. М. Изучение распределения а-субъединиц Na/K-АТФазы в структурах мозга крыс в модели паркинсоноподобного синдрома и после коррекции гормоном тимуса //Российский иммунологический журнал. – 2020. – Т. 23. – №. 1. – С. 35-40.
7. Королев А. Г., Киселева Н. М., Иноземцев А. Н. Изменения структуры натрий-калиевого насоса в различных отделах головного мозга у крыс после введения нейротоксина 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридина // Голова и шея. Российское издание. Журнал Общероссийской общественной организации "Федерация специалистов по лечению заболеваний головы и шеи". – 2024. – Т. 12, № 2. – С. 26-30.

8. Краснов М. Ю., Тимербаева С. Л., Иллариошкин С. Н. Генетика наследственных форм дистонии //Анналы клинической и экспериментальной неврологии. – 2013. – Т. 7. – №. 2. – С. 55-62.
9. Кривой И. И. Функциональные взаимодействия Na, K-АТФазы с молекулярным окружением //Биофизика. – 2014. – Т. 59. – №. 5. – С. 871-882.
- 10.Лопачев А.В., Лопачева О.М., Никифорова К.А., Филимонов И.С., Федорова Т.Н., Аккуратов Е.Е. Сравнительное действие кардиотонических стероидов на внутриклеточные процессы в нейронах коры головного мозга крысы //Биохимия. – 2018. – Т. 83. – №. 2. – С. 238-250.
- 11.Лопачева, О. М., Аккуратова, Н. В., Аккуратов, Е. Е. Кардиотонические стероиды как возможные эндогенные регуляторы в нервной системе // Нейрохимия. — 2018. — № 35(1). — С. 5-13.
- 12.Пенниайнен В. А., Кипенко, А. В., Лопатина, Е. В., Крылов, Б. В. Участие p38 МАРК сенсорных нейронов в сигнальном каскаде, запускаемом уабаином //Российский физиологический журнал им. ИМ Сеченова. – 2016. – Т. 102. – №. 12. – С. 1472-1478.
- 13.Тверской А.М., Сидоренко С.В., Климанова Е.А., Акимова О. А., Смольянинова Л. В., Лопина О.Д., Орлов С.Н. Влияние уабаина на пролиферацию эндотелиальных клеток человека коррелирует с активностью Na⁺,K⁺-АТФазы и внутриклеточным соотношением Na⁺ и K⁺ // Биохимия. — 2016. — № 81. — С. 876–883.
14. Тимошина Ю.А., Казанская Р.Б., Завьялов В.А., Вольнова А.Б., Латанов А.В., Федорова Т.Н., Гайнетдинов Р.Р., Лопачев А.В. Хроническое внутрижелудочковое введение уабаина вызывает моторные нарушения у мышей линии C57Bl/6 // Анналы клинической и экспериментальной неврологии. — 2023. — № 17(4). — С. 40-51.
- 15.Украинцева Ю. С., Щеголевский Н. В., Коршунов В. А., Кучеряну В. Г., Угрюмов М. В., Базян А. С. Моделирование досимптомной стадии

- паркинсонизма у мышей – анализ выделения дофамина в стриатуме //Нейрохимия. – 2010. – Т. 27. – №. 2. – С. 164-169.
- 16.Хайндрава В. Г., Козина Е.А., Кудрин В.С., Кучеряну В.Г., Клодт П.Д., Наркевич В.Б., Бочаров Е.В., Нанаев А.К., Крыжановский Г.Н., Раевский К.С., Угрюмов М.В. Экспериментальное моделирование клинической и преклинической стадий болезни Паркинсона // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2010. – Т. 150. – №. 11. – С. 495-498.
- 17.Шестова Г. В., Иванова Т. М., Ливанов Г. А., Сизова К. В. Токсические эффекты марганца как фактор риска для здоровья населения //Медицина экстремальных ситуаций. – 2014. – №. 4 (50). – С. 59-65.
- 18.Шишкина Е. В., Базилевская Т.Н., Белкина А.Б., Андреева А.А., Алышева Л.П., Парамонова А.И., Прожкевич М.О., Маисеенко Д.А. Дистонии-плюс dyt12: трудности диагностики в раннем периоде заболевания //РМЖ. – 2020. – Т. 28. – №. 2. – С. 37-39.
- 19.Akkuratov E.E., Lopacheva O.M., Kruusmägi M., Lopachev A.V., Shah Z.A., Boldyrev A.A., Liu L. Functional Interaction Between Na/K-ATPase and NMDA Receptor in Cerebellar Neurons // Mol Neurobiol. — 2015. — № 52(3). — С. 1726-1734.
- 20.Albert-Gascó H., Ros-Bernal F., Castillo-Gómez E., Olucha-Bordonau F.E. MAP/ERK Signaling in Developing Cognitive and Emotional Function and Its Effect on Pathological and Neurodegenerative Processes // Int J Mol Sci. — 2020. — № 21(12). — С. 4471.
- 21.Anand A., Verhoeff P., Seneca N., Zoghbi S.S., Seibyl J.P., Charney D.S., Innis R.B. Brain SPECT imaging of amphetamineinduced dopamine release in euthymic bipolar disorder patients // Am. J. Psychiatry. — 2000. — № 157. — С. 1108–1114.
- 22.Anglade P., Vyas S., Javoy-Agid F., Herrero M.T., Michel P.P., Marquez J., Mouatt-Prigent A., Ruberg M., Hirsch E.C., Agid Y. Apoptosis and autophagy in nigral neurons of patients with Parkinson's disease // Histol Histopathol. — 1997. — № 12(1). — С. 25-31.

23. Antonov S.M., Krivoi I.I., Drabkina T.M., Mironova E.V., Evstratova A.A. Neuroprotective effect of ouabain and Bcl-2 peptide expression during hyperactivation of NMDA receptors in rat brain cortical neurons in vitro // Dokl Biol Sci. — 2009. — № 426. — C. 207-209.
24. Antunes M.S., Ladd F.V.L., Ladd A.A.B.L., Moreira A.L., Boeira S.P., Cattelan Souza L. Hesperidin protects against behavioral alterations and loss of dopaminergic neurons in 6-OHDA-lesioned mice: the role of mitochondrial dysfunction and apoptosis // Metab Brain Dis. — 2021. — № 36(1). — C. 153-167.
25. Anusha C., Sumathi T., Joseph L.D. Protective role of apigenin on rotenone induced rat model of Parkinson's disease: Suppression of neuroinflammation and oxidative stress mediated apoptosis // Chem Biol Interact. — 2017. — № 269. — C. 67-79.
26. Arystarkhova E., Haq I.U., Luebbert T., Mochel F., Saunders-Pullman R., Bressman S.B., Feschenko P., Salazar C., Cook J.F., Demarest S., Brashear A., Ozelius L.J., Sweadner K.J. Factors in the disease severity of ATP1A3 mutations: Impairment, misfolding, and allele competition // Neurobiol Dis. — 2019. — № 132. — C. 104577.
27. Aschner J.L., Aschner M. Nutritional aspects of manganese homeostasis // Mol. Asp. Med . — 2005. — № 26 (4-5). — C. 353–362.
28. Aschner M., Erikson K.M., Dorman D.C. Manganese dosimetry: species differences and implications for neurotoxicity // Crit Rev Toxicol. — 2005. — № 35(1). — C. 1-32.
29. Atkinson A., Hunt S., Lowe A.G. Manganese activation of a (Na⁺-K⁺)-dependent ATPase in pig brain microsomes // Biochim Biophys Acta . — 1968. — № 167(2). — C. 469-472.
30. Azarias G., Kruusmägi M., Connor S., Akkuratov E.E., Liu X.-L., Lyons D., Brismar H., Broberger C., Aperia A. A Specific and Essential Role for Na,K-ATPase α 3 in Neurons Co-expressing α 1 and α 3 // J. Biol. Chem. — 2013. — № 288. — C. 2734–2743.

31. Bagh M.B., Maiti A.K., Jana S., Banerjee K., Roy A., Chakrabarti S. Quinone and oxyradical scavenging properties of N-acetylcysteine prevent dopamine mediated inhibition of Na⁺, K⁺-ATPase and mitochondrial electron transport chain activity in rat brain: implications in the neuroprotective therapy of Parkinson's disease // Free Radic Res. — 2008. — № 42(6). — C. 574-581.
32. Barbano R.L., Hill D.F., Snively B.M., Light L.S., Boggs N., McCall W.V., Stacy M., Ozelius L., Sweeney K.J., Brashear A. New triggers and non-motor findings in a family with rapid-onset dystonia-parkinsonism // Parkinsonism Relat Disord. — 2012. — № 18(6). — C. 737-741
33. Bastías-Candia S., Zolezzi J.M., Inestrosa N.C. Revisiting the Paraquat-Induced Sporadic Parkinson's Disease-Like Model // Mol Neurobiol. — 2019. — № 56(2). — C. 1044-1055.
34. Beaulieu J.M., Gainetdinov R.R. The physiology, signaling, and pharmacology of dopamine // Pharmacol. Rev. — 2011. — № 63. — C. 182–217.
35. Benarroch E.E. Na⁺, K⁺-ATPase: functions in the nervous system and involvement in neurologic disease // N Neurology. — 2011. — № 76(3). — C. 287-293.
36. Bentle L.A., Lardy H.A. Interaction of anions and divalent metal ions with phosphoenolpyruvate carboxykinase // J Biol Chem. — 1976. — № 251. — C. 2916–2921.
37. Berezhnoy D.S., Troshev D.V., Kulikova O.I. Abaimov D.A., Muzychuk O.A., Stvolinsky S.L., Fedorova T.N. Comparison of Neurobehavioral Changes in Mice Treated with Mitochondrial Toxins—Rotenone and MPTP // Hum. Physiol. — 2021. — № 47. — C. 821–830.
38. Berret E., Smith P. Y., Henry M., Soulet D., Hebert S. S., Toth K., Mouginot D., Drolet G. Extracellular Na(+) levels regulate formation and activity of the NaX/alpha1-Na(+)/K(+)-ATPase complex in neuronal cells // Front Cell Neurosci. — 2014. — № 8. — C. 413.
39. Berridge K.C., Aldridge J.W., Houchard K.R., Zhuang X. Sequential super-stereotypy of an instinctive fixed action pattern in hyper-dopaminergic mutant mice:

- a model of obsessive compulsive disorder and Tourette's // BMC Biol. — 2005. — №3. — C. 4.
40. Bezu M., Malikovic J., Kristofova M., Engidawork E., Höger H., Lubec G., Korz V. Spatial Working Memory in Male Rats: Pre-Experience and Task Dependent Roles of Dopamine D1- and D2-Like Receptors // Front. Behav. Neurosci. — 2017. — № 11. — C. 196.
41. Blanco G., Mercer R.W. Isozymes of the Na-K-ATPase: heterogeneity in structure, diversity in function // Am. J. Physiol. — 1998. — № 275. — C. F633-650.
42. Bogdanova, A., Petrushanko, I., Boldyrev, A.A., Gassmann, M. Oxigen- and redoxinduced regulation of the Na/K-ATPase // Curr. Enzym. Inhib. — 2006. — № 2. — C. 37–59.
43. Boireau A., Meunier M., Imperato A. Ouabain-induced increase in dopamine release from mouse striatal slices is antagonized by riluzole // J Pharm Pharmacol. — 1998. — № 50(11). — C. 1293-7.
44. Bonsi P, Calabresi P, De Persis C, Papa M, Centonze D, Bernardi G, Pisani A. Early ionic and membrane potential changes caused by the pesticide rotenone in striatal cholinergic interneurons // Exp Neurol. — 2004. — № 185(1). — C. 169-81.
45. Böttger P., Tracz Z., Heuck A., Nissen P., Romero-Ramos M., Lykke-Hartmann K. Distribution of Na/K-ATPase alpha 3 isoform, a sodium-potassium P-type pump associated with rapid-onset of dystonia parkinsonism (RDP) in the adult mouse brain // J. Comp. Neurol. — 2011. — № 519. — C. 376–404.
46. Böttger P., Glerup S., Gesslein B., Illarionova N.B., Isaksen T.J., Heuck A., Clausen B.H., Füchtbauer E.M., Gramsbergen J.B., Gunnarson E., Aperia A., Lauritzen M., Lambertsen K.L., Nissen P., Lykke-Hartmann K. Glutamate-system defects behind psychiatric manifestations in a familial hemiplegic migraine type 2 disease-mutation mouse model // Sci Rep. — 2016. — № 6. — C. 22047.
47. Brashear A., Dobyns W.B., de Carvalho Aguiar P., Borg M., Frijns C.J., Gollamudi S., Green A., Guimaraes J., Haake B.C., Klein C., Linazasoro G., Münchau A., Raymond D., Riley D., Saunders-Pullman R., Tijssen M.A., Webb D., Zaremba J.,

- Bressman S.B., Ozelius L.J. The phenotypic spectrum of rapid-onset dystonia-parkinsonism (RDP) and mutations in the ATP1A3 gene // Brain. — 2007. — № 130(Pt 3). — C. 828-835.
48. Brashear A., Sweadner K.J., Haq I., Napoli E., Ozelius L. ATP1A3-Related Disorder // GeneReviews. — 2008. — №7.
49. Brown A.M., van der Heijden M.E., Jinnah H.A., Sillitoe R.V. Cerebellar Dysfunction as a Source of Dystonic Phenotypes in Mice // Cerebellum. — 2023. — № 22(4). — C. 719-729.
50. Burdo J.R., Menzies S.L., Simpson I.A., Garrick L.M., Garrick M.D., Dolan K.G., Haile D.J., Beard J.L., Connor J.R. Distribution of divalent metal transporter 1 and metal transport protein 1 in the normal and Belgrade rat // J Neurosci Res. — 2001. — № 66(6). — C. 1198-1207.
51. Calderon D.P., Fremont R., Kraenzlin F., Khodakhah K. The neural substrates of rapid-onset Dystonia-Parkinsonism // Nat Neurosci. — 2011. — № 14(3). — C. 357-365.
52. Calderon D.P., Khodakhah K. Chapter 29—Modeling Dystonia-Parkinsonism // In Movement Disorders. — Boston: LeDoux, M.S., Ed., Academic Press. — 2015. — C. 507–515.
53. Carfagna M.A., Ponsler G.D., Muhoberac B.B. Inhibition of ATPase activity in rat synaptic plasma membranes by simultaneous exposure to metals // Chem Biol Interact. — 1996. — № 100(1). — C. 53-65.
54. Cavanaugh J.E., Jaumotte J.D., Lakoski J.M., Zigmond M.J. Neuroprotective role of ERK1/2 and ERK5 in a dopaminergic cell line under basal conditions and in response to oxidative stress // J Neurosci Res. — 2006. — № 84(6). — C. 1367-1375.
55. Cawte J. Psychiatric sequelae of manganese exposure in the adult, foetal and neonatal nervous systems // Aust N Z J Psychiatry. — 1985. — № 19(3). — C. 211-217.
56. Cersosimo M.G., Koller W.C. The diagnosis of manganese-induced parkinsonism // Neurotoxicology. — 2006. — № 27(3). — C. 340-346.

- 57.Chandra S.V., Murthy R.C., Husain T., Bansal S.K. Effect of interaction of heavy metals on ($\text{Na}^+ - \text{K}^+$) ATPase and the uptake of 3H-DA and 3H-NA in rat brain synaptosomes // Acta Pharmacol Toxicol (Copenh). — 1984. — № 54(3). — C. 210-213.
- 58.Chen P., Chakraborty S., Mukhopadhyay S., Lee E., Paoliello M.M., Bowman A.B., Aschner M. Manganese homeostasis in the nervous system // J Neurochem. — 2015. — № 134(4). — C. 601-160.
- 59.Cheung E.C., Slack R.S. Emerging role for ERK as a key regulator of neuronal apoptosis // Sci STKE. — 2004. — № 251. — C. 45.
- 60.Cheung Y.T., Lau W.K., Yu M.S., Lai C.S., Yeung S.C., So K.F., Chang R.C. Effects of all-trans-retinoic acid on human SH-SY5Y neuroblastoma as in vitro model in neurotoxicity research // Neurotoxicology. — 2009. — № 30(1). — C. 127-135.
- 61.Cchia S.J., Tan E.-K., Chao Y.-X. Historical Perspective: Models of Parkinson's Disease // Int. J. Mol. Sci. — 2020. — № 21. — C. 24-64.
- 62.Chtourou, Y., Fetoui, H., Garoui, E.M., Boudawara, T., Zeghal, N. Improvement of cerebellum redox states and cholinergic functions contribute to the beneficial effects of silymarin against manganese-induced neurotoxicity // Neurochem. Res. — 2012. — № 37. — C. 469–479.
- 63.Clapcote S.J., Duffy S., Xie G., Kirshenbaum G., Bechard A.R., Rodacker Schack V., Petersen J., Sinai L., Saab B.J., Lerch J.P., Minassian B.A., Ackerley C.A., Sled J.G., Cortez M.A., Henderson J.T., Vilzen B., Roder JC. Mutation I810N in the alpha3 isoform of Na^+, K^+ -ATPase causes impairments in the sodium pump and hyperexcitability in the CNS // Proc Natl Acad Sci U S A. — 2009 . — № 106(33). — C. 14085-14090.
- 64.Clarke R. J., Fan X. Pumping ions // Clin Exp Pharmacol Physiol. — 2011. — № 38 (11). — C. 726-733.
- 65.Comellas, A.P., Dada, L.A., Lecuona, E., Pesce, L.M., Chandel, N.S., Quesada, N., Budinger, G.R., Strous, G.J., Ciechanover, A., Sznajder, J.I. Hypoxia-mediated

- degradation of Na,K-ATPase via mitochondrial reactive oxygen species and the ubiquitin-conjugating system // Circ. Res. — 2006. — № 98. — C. 1314–1322.
66. Cooper W. C. The health implications of increased manganese in the environment resulting from the combustion of fuel additives: A review of the literature // Journal of Toxicology and Environmental Health. — 1984. — № 14(1). — C. 23–46.
67. Cordova F.M., Aguiar A.S. Jr., Peres T.V., Lopes M.W., Gonçalves F.M., Remor A.P., Lopes S.C., Pilati C., Latini A.S., Prediger R.D., Erikson K.M., Aschner M., Leal R.B. In vivo manganese exposure modulates Erk, Akt and Darpp-32 in the striatum of developing rats, and impairs their motor function // PLoS One. — 2012. — № 7(3). — C. e33057.
68. Cortes V. F., Ribeiro I. M., Barrabin H., Alves-Ferreira M., Fontes C. F. Regulatory phosphorylation of FXYD2 by PKC and cross interactions between FXYD2, plasmalemmal Ca-ATPase and Na,KATPase // Arch Biochem Biophys. — 2011. — № 505(1). — C. 75-82
69. Crambert G., Hasler U., Beggah A.T., Yu C., Modyanov N.N., Horisberger J.D., Lelièvre L., Geering K. Transport and pharmacological properties of nine different human Na, K-ATPase isozymes // J. Biol. Chem. — 2000. — № 275. — C. 1976–1986.
70. Cui X., Xie Z. Protein Interaction and Na/K-ATPase-Mediated Signal Transduction // Molecules. — 2017. — № 22(6). — C. 990.
71. Dawson T.M., Ko H.S., Dawson V.L. Genetic animal models of Parkinson's disease // Neuron. — 2010. — № 66(5). — C. 646-661.
72. DeAndrade M.P., Yokoi F., van Groen T., Lingrel J.B., Li Y. Characterization of Atpl1a3 mutant mice as a model of rapid-onset dystonia with parkinsonism // Behav. Brain Res. — 2011. — № 216. — C. 659–665.
73. de Carvalho Aguiar P., Sweadner K.J., Penniston J.T., Zaremba J., Liu L., Caton M., Linazasoro G., Borg M., Tijssen M.A., Bressman S.B., Dobyns W.B., Brashear A., Ozelius L.J. Mutations in the Na⁺/K⁺ -ATPase alpha3 gene ATP1A3 are associated with rapid-onset dystonia parkinsonism // Neuron. — 2004. — № 43(2). — C. :169-75.

- 74.de Juan-Sanz J., Núñez E., Villarejo-López L., Pérez-Hernández D., Rodriguez-Fraticelli A.E., López-Corcuera B., Vázquez J., Aragón C. Na⁺/K⁺-ATPase is a new interacting partner for the neuronal glycine transporter GlyT2 that downregulates its expression in vitro and in vivo // *J Neurosci.* — 2013. — № 33(35). — C. 14269-14281.
- 75.de Lores Arnaiz G.R., Bersier M.G. Relationship between Na⁺, K⁺-ATPase and NMDA receptor at central synapses // *Curr Protein Pept Sci.* — 2014. — № 15(8). — C. 761-777.
- 76.de Lores Arnaiz G.R., Ordieres M.G. Brain Na(+), K(+)-ATPase Activity In Aging and Disease // *Int J Biomed Sci.* — 2014. — № 10(2). — C. 85-102.
- 77.Deng Y., Xu Z., Xu B., Tian Y., Xin X., Deng X., Gao J. The protective effect of riluzole on manganese caused disruption of glutamate-glutamine cycle in rats // *Brain Res.* — 2009. — №1289. — C. 106-117.
- 78.Deng Y., Xu Z., Xu B., Xu D., Tian Y., Feng W. The protective effects of riluzole on manganese-induced disruption of glutamate transporters and glutamine synthetase in the cultured astrocytes // *Biol Trace Elem Res.* — 2012. — № 148(2). — C.242-249.
- 79.de Sá Lima L., Kawamoto E.M., Munhoz C.D., Kinoshita P.F., Orellana A.M.M., Curi R., Rossoni L., Avellar M., Scavone C. Ouabain activates NFκB through an NMDA signaling pathway in cultured cerebellar cells // *Neuropharmacology.* — 2013. — № 73. — C. 327–336.
- 80.Del Fabbro L, Rossito Goes A, Jesse CR, de Gomes MG, Cattelan Souza L, Lobo Ladd FV, Lobo Ladd AAB, Nunes Arantes RV, Reis Simionato A, Oliveira MS, Furian AF, Boeira SP. Chrysin protects against behavioral, cognitive and neurochemical alterations in a 6-hydroxydopamine model of Parkinson's disease // *Neurosci Lett.* — 2019. — № 706. — C. 158-163.
- 81.Deri Z, Adam-Vizi V. Detection of intracellular free Na⁺ concentration of synaptosomes by a fluorescent indicator, Na(+)-binding benzofuran isophthalate: the effect of veratridine, ouabain, and alpha-latrotoxin // *J Neurochem.* . — 1993. — № 61(3). — C. 818-825.

- 82.Desfrere L., Karlsson M., Hiyoshi H., Malmersjö S., Nanou E., Estrada M., Miyakawa A., Lagercrantz H., El Manira A., Lal M., Uhlén P. Na,K-ATPase signal transduction triggers CREB activation and dendritic growth // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 2009. — № 106. — C. 2212–2217.
- 83.Diez A.M., Campo M.L., Soler G. Trypsin digestion of arginase: evidence for a stable conformation manganese directed // Int J Biochem. — 1992. — № 24. — C. 1925–1932.
- 84.Dobretsov M., Stimers J.R. Neuronal function and alpha3 isoform of the Na/K-ATPase // Front Biosci. — 2005. — № 10. — C. 2373-2396.
- 85.Duat Rodriguez A., Prochazkova M., Santos Santos S., Rubio Cabezas O., Cantarin Extremera V., Gonzalez-Gutierrez-Solana L. Early Diagnosis of CAPOS Syndrome Before Acute-Onset Ataxia-Review of the Literature and a New Family // Pediatr Neurol. — 2017. — № 71. — C. 60-64.
- 86.El-Mallakh R.S., Hedges S., Casey D. Digoxin encephalopathy presenting as mood disturbance // J Clin Psychopharmacol. — 1995. — № 15(1). — C. 82-83.
- 87.El-Mallakh R.S., El-Masri M.A., Huff M.O., Li X.P., Decker S., Levy R.S. Intracerebroventricular administration of ouabain as a model of mania in rats // Bipolar Disord. — 2003. — № 5(5). — C. 362-365.
- 88.El-Mallakh R.S., Gao Y., You P. Role of endogenous ouabain in the etiology of bipolar disorder // Int J Bipolar Disord. — 2021. — № 9(1). — C. 6.
- 89.Erikson K.M., Aschner M. Manganese neurotoxicity and glutamate-GABA interaction // Neurochem Int. — 2003. — № 43(4-5). — C. 475-480.
- 90.Fallon S.J., Bor D., Hampshire A., Barker R.A., Owen A.M. Spatial structure normalises working memory performance in Parkinson's disease // Cortex. — 2017. — № 96. — C. 73-82.
- 91.Freeman, D.M., O'Neal, R., Zhang, Q., Bouwer, E.J., Wang, Z. Manganese-induced Parkinsonism in mice is reduced using a novel contaminated water sediment exposure model // Environ. Toxicol. Pharmacol. — 2020. — № 78. — C. 103399.

92. Fremont R., Calderon D.P., Maleki S., Khodakhah K. Abnormal high-frequency burst firing of cerebellar neurons in rapid-onset dystonia-parkinsonism // J Neurosci. — 2014. — № 34(35). — C.11723-11732.
93. Fremont R., Tewari A., Khodakhah K. Aberrant Purkinje cell activity is the cause of dystonia in a shRNA-based mouse model of Rapid Onset Dystonia-Parkinsonism // Neurobiol Dis. — 2015. — № 82. — C. 200-212.
94. Gursoy M., Gul Z., Buyukuyosal R.L. Sigma receptor ligands haloperidol and ifenprodil attenuate hypoxia induced dopamine release in rat striatum // Neurol Res. — 2022. — № 44(10). —C. 927-936.
95. Garty H., Karlish S.J. Role of FXYD proteins in ion transport // Annu Rev Physiol. — 2006. — № 68. — C. 431-459.
96. Genter M.B., Kendig E.L., Knutson M.D. Uptake of materials from the nasal cavity into the blood and brain: are we finally beginning to understand these processes at the molecular level? // Ann N Y Acad Sci. — 2009. — № 1170. — C. 623-628.
97. Girijashanker K., He L., Soleimani M., Reed J.M., Li H., Liu Z., Wang B., Dalton T.P., Nebert D.W. Slc39a14 Gene Encodes ZIP14, A Metal/Bicarbonate Symporter: Similarities to the ZIP8 Transporter // Molecular Pharmacology. — 2008. — № 73(5). — C. 1413–1423.
98. Golden J.P., Demaro J.A. 3rd, Knoten A., Hoshi M., Pehek E., Johnson E.M. Jr, Gereau R.W. 4th, Jain S. Dopamine-dependent compensation maintains motor behavior in mice with developmental ablation of dopaminergic neurons // J. Neurosci. — 2013. — № 33 (43). — C. 17095-17107.
99. Gruenheid S., Canonne-Hergaux F., Gauthier S., Hackam D.J., Grinstein S., Gros P. The iron transport protein NRAMP2 is an integral membrane glycoprotein that colocalizes with transferrin in recycling endosomes // J Exp Med. — 1999. — № 189(5). — C. 831-841.
100. Gunter T.E., Gerstner B., Gunter K.K., Malecki J., Gelein R., Valentine W.M., Aschner M., Yule D.I. Manganese transport via the transferrin mechanism // Neurotoxicology. — 2013. — № 34. — C. 118-127

101. Hamlyn J. M., Ringel R., Schaeffer J., Levinson P. D., Hamilton B. P., Kowarski A. A., Blaustein M. P. A circulating inhibitor of ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$) ATPase associated with essential hypertension // Nature. — 1982. — № 300 (5893). — C. 650-652.
102. Hamlyn J. M., Blaustein M. P., Bova S., DuCharme D. W., Harris D. W., Mandel F., Mathews W. R., Ludens J. H. Identification and characterization of a ouabain-like compound from human plasma // Proc Natl Acad Sci U S A. — 1991. — № 88 (14). — C. 6259-6263.
103. Haq I.U., Snively B.M., Sweedner K.J., Suerken C.K., Cook J.F., Ozelius L.J., Miller C., McCall W.V., Whitlow C.T., Brashear A. Revising rapid-onset dystonia-parkinsonism: Broadening indications for ATP1A3 testing // Mov Disord. — 2019. — № 34(10). — C. 1528-1536.
104. Harvey A.G. Sleep and circadian rhythms in bipolar disorder: Seeking synchrony, harmony, and regulation // Am. J. Psychiatry. — 2008. — № 165. — C. 820–829.
105. He J, Ma X, Zhang J, Yang YP, Qin H, Chen H, Wei S, Li F, Wang J, Liang G, Zou Y. Manganese-induced neurological pyroptosis: Unveiling the mechanism through the ROS activaed Caspase-3/GSDME signaling pathway // Food Chem Toxicol. — 2024. — № 184. — C. 114322.
106. He L., Girijashanker K., Dalton T.P., Reed J., Li H., Soleimani M., Nebert D.W. ZIP8, member of the solute-carrier-39 (SLC39) metal-transporter family: characterization of transporter properties // Mol Pharmacol. — 2006. — № 70(1). — C. 171-180.
107. Heimer G., Sadaka Y., Israelian L., Feiglin A., Ruggieri A., Marshall C. R., Scherer S. W., Ganelin-Cohen E., Marek-Yagel D., Tzadok M., Nissenkorn A., Anikster Y., Minassian B. A., Zeev B. Ben. CAOS-Episodic Cerebellar Ataxia, Areflexia, Optic Atrophy, and Sensorineural Hearing Loss // Journal of Child Neurology. — 2015. — № 30(13). — C. 1749–1756.
108. Heinzen E.L., Arzimanoglou A., Brashear A., Clapcote S.J., Gurrieri F., Goldstein D.B., Jóhannesson S.H., Mikati M.A., Neville B., Nicole S., Ozelius L.J., Poulsen H., Schyns T., Sweedner K.J., van den Maagdenberg A., Vilse B. Distinct neurological

- disorders with ATP1A3 mutations // Lancet Neurol. — 2014. — № 13. — C. 503–514.
109. Helenius I. T., Dada L. A., Sznajder J. I. Role of ubiquitination in Na,K-ATPase regulation during lung injury // Proc Am Thorac Soc. — 2010. — № 7(1). — C. 65-70.
 110. Holley AK, Dhar SK, St Clair DK. Manganese superoxide dismutase vs. p53: regulation of mitochondrial ROS // Mitochondrion. — 2010. — № 10(6). — C. 649-661
 111. Holm T.H., Lykke-Hartmann K. Insights into the Pathology of the α 3 Na⁺/K⁺-ATPase Ion Pump in Neurological Disorders; Lessons from Animal Models // Front. Physiol. — 2016. — № 7. — C. 209.
 112. Holthouse K.A., Mandal A., Merchant M.L., Schelling J.R., Delamere N.A., Valdes R.R. Jr., Tyagi S.C., Lederer E.D., Khundmiri S.J. Ouabain stimulates Na-K-ATPase through a sodium/hydrogen exchanger-1 (NHE-1)-dependent mechanism in human kidney proximal tubule cells // Am. J. Physiol. Renal. Physiol. — 2010. — № 299. — C. 77-90.
 113. Hu Z., Bonifas J.M., Beech J., Bench G., Shigihara T., Ogawa H., Ikeda S., Mauro T., Epstein E.H. Jr. Mutations in ATP2C1, encoding a calcium pump, cause Hailey-Hailey disease // Nat Genet. — 2000. — № 24. — C. 61–65.
 114. Huang E., Ong W.Y., Connor J.R. Distribution of divalent metal transporter-1 in the monkey basal ganglia // Neuroscience. — 2004. — № 128(3). — C. 487-496.
 115. Hunanyan A.S., Fainberg N.A., Linabarger M., Arehart E., Leonard A.S., Adil S.M., Helseth A.R., Swearingen A.K., Forbes S.L., Rodriguez R.M., Rhodes T., Yao X., Kibbi N., Hochman D.W., Wetsel W.C., Hochgeschwender U., Mikati M.A. Knock-in mouse model of alternating hemiplegia of childhood: Behavioral and electrophysiologic characterization // Epilepsia. — 2015. — № 56. — C. 82–93.
 116. Hussain T., Ali M.M., Chandra S.V. The combined effect of Pb²⁺ and Mn²⁺ on monoamine uptake and Na⁺, K⁺-ATPase in striatal synaptosomes // J Appl Toxicol. — 1987. — № 7(4). — C. 277-280.

117. Ikeda K., Satake S., Onaka T., Sugimoto H., Takeda N., Imoto K., Kawakami K. Enhanced inhibitory neurotransmission in the cerebellar cortex of Atp1a3-deficient heterozygous mice // *J. Physiol.* — 2013. — № 591. — C. 3433–3449.
118. Ilesanmi O.B., Akinmoladun A.C., Josiah S.S., Olaleye M.T., Akindahunsi A.A. Modulation of key enzymes linked to Parkinsonism and neurologic disorders by *Antiaris africana* in rotenone-toxified rats // *J Basic Clin Physiol Pharmacol.* — 2019. — № 31(3).
119. Illarionova N.B., Gunnarson E., Li Y., Brismar H., Bondar A., Zelenin S., Aperia A. Functional and molecular interactions between aquaporins and Na,K-ATPase // *Neuroscience*. — 2010. — № 168(4). — C. 915-925.
120. Ivanova M.A., Kokorina A.D., Timofeeva P.D., Karelina T.V., Abushik P.A., Stepanenko J.D., Sibarov D.A., Antonov S.M. Calcium Export from Neurons and Multi-Kinase Signaling Cascades Contribute to Ouabain Neuroprotection in Hyperhomocysteinemia // *Biomolecules*. — 2020. — № 10(8). — C.1104.
121. Jiao S., Johnson K., Moreno C., Yano S., Holmgren M. Comparative description of the mRNA expression profile of Na⁺/K⁺-ATPase isoforms in adult mouse nervous system // *J Comp Neurol.* — 2022. — № 530(3). — C. 627-647.
122. Jinnah H.A., Neychev V., Hess E.J. The Anatomical Basis for Dystonia: The Motor Network Model // *Tremor Other Hyperkinet Mov (N Y)*. — 2017. — № 7. — C. 506.
123. Judd E.N., Lewis S.M., Person A.L. Diverse inhibitory projections from the cerebellar interposed nucleus // *Elife*. — 2021. — №20. — C. 10:e66231.
124. Kadenbach B., Reimann A. Cytochrome c oxidase: tissue-specific expression of isoforms and regulation of activity // *New Comprehensive Biochemistry*. — 1992. — № 10. — C. 241–263.
125. Kanai R., Cornelius F., Ogawa H., Motoyama K., Vilsen B., Toyoshima C. Binding of cardiotonic steroids to Na⁺, K⁺-ATPase in the E2P state // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. — 2021. — № 118.

126. Kann O., Papageorgiou I.E., Draguhn A. Highly energized inhibitory interneurons are a central element for information processing in cortical networks // *J. Cereb. Blood Flow Metab.* — 2014. — № 34. — C. 1270–1282.
127. Kaplan J.H. Biochemistry of Na,K-ATPase // *Annu Rev Biochem.* — 2002. — № 71. — C. 511-535.
128. Karpova L.V., Bulygina E.R., Boldyrev A.A. Different neuronal Na(+)/K(+)-ATPase isoforms are involved in diverse signaling pathways // *Cell Biochem Funct.* — 2010. — № 28(2). — C. 135-141.
129. Keane PC, Kurzawa M, Blain PG, Morris CM. Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease // *Parkinsons Dis.* — 2011. — № 15. — C. 716871.
130. Keller S., Frishman W.H. Neuropsychiatric effects of cardiovascular drug therapy // *Cardiol. Rev.* — 2003. — № 11. — C. 73–93.
131. Kim S.H., Yu H.S., Park H.G., Jeon W.J., Song J.Y., Kang U.G., Ahn Y.M., Lee Y.H., Kim Y.S. Dose-dependent effect of intracerebroventricular injection of ouabain on the phosphorylation of the MEK1/2-ERK1/2-p90RSK pathway in the rat brain related to locomotor activity // *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* — 2008. — № 32(7). — C1637-1642.
132. Kirshenbaum G.S., Clapcote S.J., Duffy S., Burgess C.R., Petersen J., Jarowek K.J., Yücel Y.H., Cortez M.A., Snead O.C. 3rd, Vilzen B., Peever J.H., Ralph M.R., Roder J.C. Mania-like behavior induced by genetic dysfunction of the neuron-specific Na⁺, K⁺-ATPase α3 sodium pump // *Proc Natl Acad Sci USA.* — 2011. — № 108(44). — C. 18144-18149.
133. Kirshenbaum G.S., Dawson N., Mullins J.G., Johnston T.H., Drinkhill M.J., Edwards I.J., Fox S.H., Pratt J.A., Brotchie J.M., Roder J.C., Clapcote S.J. Alternating hemiplegia of childhood-related neural and behavioural phenotypes in Na⁺, K⁺-ATPase α3 missense mutant mice // *PLoS ONE.* — 2013. — № 8. — C. e60141.
134. Khadrawy Y. A., Mourad I. M., Mohammed H. S., Noor N. A., Ezz H. S. A. A study on the possible therapeutic role of Panax ginseng extract against a rat model of

- Parkinson's disease induced by intrastriatal rotenone injection // Int. J. Clin. Exp. Med. — 2016. — № 9. — C. 3831–3841.
135. Khadrawy Y.A., Salem A.M., El-Shamy K.A., Ahmed E.K., Fadl N.N., Hosny E.N. Neuroprotective and Therapeutic Effect of Caffeine on the Rat Model of Parkinson's Disease Induced by Rotenone // J Diet Suppl. — 2017. — № 14(5). — C. 553-572.
136. Khadrawy Y.A., Mourad I.M., Mohammed H.S., Noor N.A., Aboul Ezz H.S. Cerebellar neurochemical and histopathological changes in rat model of Parkinson's disease induced by intrastriatal injection of rotenone // Gen Physiol Biophys. — 2017. — № 36(1). — C. 99-108.
137. Khan F.H., Sen T., Chakrabarti S. Dopamine oxidation products inhibit Na⁺, K⁺-ATPase activity in crude synaptosomal-mitochondrial fraction from rat brain // Free Radic Res. — 2003. — № 37(6). — C. 597-601.
138. Komiyama Y., Dong X. H., Nishimura N., Masaki H., Yoshika M., Masuda M., Takahashi H. A novel endogenous digitalis, telocinobufagin, exhibits elevated plasma levels in patients with terminal renal failure // Clin Biochem. — 2005. — № 38 (1). — C. 36-45.
139. Kordower J.H., Olanow C.W., Dodiya H.B., Chu Y., Beach T.G., Adler C.H., Halliday G.M., Bartus R.T. Disease duration and the integrity of the nigrostriatal system in Parkinson's disease // Brain. — 2013. — № 136. — C. 2419–2431.
140. Krishna, S., Dodd, C.A., Hekmatyar, S.K., Filipov, N.M. Brain deposition and neurotoxicity of manganese in adult mice exposed via the drinking water // Arch. Toxicol. — 2014. — № 88 (1). — C. 47–64.
141. Kulich S.M., Horbinski C., Patel M., Chu C.T. 6-Hydroxydopamine induces mitochondrial ERK activation // Free Radic Biol Med. — 2007. — № 43(3). — C. 372-383.
142. Kulikov A., Eva A., Kirch U., Boldyrev A., Scheiner-Bobis G. Ouabain activates signaling pathways associated with cell death in human neuroblastoma // Biochim Biophys Acta. — 2007. — № 1768(7). — C. 1691-1702.

143. Kurauchi Y., Yoshimaru Y., Kajiwara Y., Yamada T., Matsuda K., Hisatsune A., Seki T., Katsuki H. Na⁺, K⁺-ATPase inhibition causes hyperactivity and impulsivity in mice via dopamine D2 receptor-mediated mechanism // Neurosci Res. — 2019. — № 146. — C. 54-64.
144. Kuribara H., Uchihashi Y. Dopamine antagonists can inhibit methamphetamine sensitization, but not cocaine sensitization, when assessed by ambulatory activity in mice // J Pharm Pharmacol. — 1993. — № 45(12). — C.1042-1045.
145. Lai J.C., Leung T.K., Lim L., Chan A.W., Minski M.J. Effects of chronic manganese treatment on rat brain regional sodium-potassium-activated and magnesium-activated adenosine triphosphatase activities during development // Metab Brain Dis. — 1991. — № 6(3). — C. 165-174.
146. Laursen M., Yatime L., Nissen P., Fedosova N. U. Crystal structure of the high-affinity Na⁺K⁺-ATPase-ouabain complex with Mg²⁺ bound in the cation binding site // Proc Natl Acad Sci U S A. – 2013. – № 110(27). – C. 10958-10963.
147. Laursen M., Gregersen J. L., Yatime L., Nissen P., Fedosova N. U. Structures and characterization of digoxin- and bufalin-bound Na⁺,K⁺-ATPase compared with the ouabain-bound complex // Proc Natl Acad Sci U S A. – 2015. – № 112(6). – C. 1755-1760.
148. Lazarov E., Hillebrand M., Schröder S., Ternka K., Hofhuis J., Ohlenbusch A., Barrantes-Freer A., Pardo L.A., Fruergaard M.U., Nissen P., Brockmann K., Gärtner J., Rosewich H. Comparative analysis of alternating hemiplegia of childhood and rapid-onset dystonia-parkinsonism ATP1A3 mutations reveals functional deficits, which do not correlate with disease severity // Neurobiol Dis. — 2020. — № 143. — C. 105012.
149. Ledonne A., Massaro Cenere M., Paldino E., D'Angelo V., D'Addario S.L., Casadei N., Nobili A., Berretta N., Fusco F.R., Ventura R., Sancesario G., Guatteo E., Mercuri N.B. Morpho-Functional Changes of Nigral Dopamine Neurons in an α -Synuclein Model of Parkinson's Disease // Mov. Disord. — 2023. — № 38 (2). — C. 256-266.

150. Leite Silva A.B.R., Gonçalves de Oliveira R.W., Diógenes G.P., de Castro Aguiar M.F., Sallem C.C., Lima M.P.P., de Albuquerque Filho L.B., Peixoto de Medeiros S.D., Penido de Mendonça L.L., de Santiago Filho P.C., Nones D.P., da Silva Cardoso P.M.M., Ribas M.Z., Galvão S.L., Gomes G.F., Bezerra de Menezes A.R., Dos Santos N.L., Mororó V.M., Duarte F.S., Dos Santos J.C.C. Premotor, nonmotor and motor symptoms of Parkinson's Disease: A new clinical state of the art // Ageing Res. Rev. — 2023. — № 84. — C. 1018-10134.
151. Lewis MM, Galley S, Johnson S, Stevenson J, Huang X, McKeown MJ. The role of the cerebellum in the pathophysiology of Parkinson's disease // Can J Neurol Sci. — 2013. — № 40(3). — C. 299-306.
152. Leyva-Illades D., Chen P., Zogzas C.E., Hutchens S., Mercado J.M., Swaim C.D., Morrisett R.A., Bowman A.B., Aschner M., Mukhopadhyay S. SLC30A10 Is a Cell Surface-Localized Manganese Efflux Transporter, and Parkinsonism-Causing Mutations Block Its Intracellular Trafficking and Efflux Activity // J Neurosci. — 2014. — № 34. — C. 14079–14095.
153. Li Y., Liu X., Wang C., Su Z., Zhao K., Yang M., Chen S., Zhou L. Molecular and clinical characteristics of ATP1A3-related diseases // Front Neurol. — 2022. — № 13. — C. 924788.
154. Li Z., Langhans S.A. Transcriptional regulators of Na,K-ATPase subunits // Front. cell Dev. Biol. — 2015. — № 3. — C. 66.
155. Liapi C, Zarros A, Galanopoulou P, Theocharis S, Skandali N, Al-Humadi H, Anifantaki F, Gkrouzman E, Mellios Z, Tsakiris S. Effects of short-term exposure to manganese on the adult rat brain antioxidant status and the activities of acetylcholinesterase, (Na,K)-ATPase and Mg-ATPase: modulation by L-cysteine // Basic Clin Pharmacol Toxicol . — 2008. — № 103(2). — C. 171-175.
156. Lin K.H., Li C.Y., Hsu Y.M., Tsai C.H., Tsai F.J., Tang C.H., Yang J.S., Wang Z.H., Yin M.C. Oridonin, A natural diterpenoid, protected NGF-differentiated PC12 cells against MPP⁺- and kainic acid-induced injury // Food Chem Toxicol. — 2019. — № 133. — C. 110765

157. Liu C., Yan D.Y., Tan X., Ma Z., Wang C., Deng Y., Liu W., Yang T.Y., Xu Z.F., Xu B. Effect of the cross-talk between autophagy and endoplasmic reticulum stress on Mn-induced alpha-synuclein oligomerization // Environ Toxicol. — 2018. — № 33(3). — C. 315-324.
158. Liu C., Ju R. Manganese-induced neuronal apoptosis: new insights into the role of endoplasmic reticulum stress in regulating autophagy-related proteins // Toxicol Sci. — 2023. — № 191(2). — C. 193-200.
159. Liu S.H., Wang J.H., Kang J.J., Lin R.H., Lin-Shiau S.Y. Alterations in the properties and isoforms of sciatic nerve Na(+), K(+)-ATPase in methylcyclopentadienyl manganese tricarbonyl-treated mice // Environ Res. — 2000. — № 82(3). — C. 239-244.
160. Liu X.L., Miyakawa A., Aperia A., Krieger P. Na,K-ATPase generates calcium oscillations in hippocampal astrocytes // Neuroreport. — 2007. — № 18(6). — C. 597-600.
161. Lopachev, A.V., Lopacheva, O.M., Osipova, E.A., Vladychenskaya, E.A., Smolyaninova, L.V., Fedorova, T.N., Koroleva, O.V., Akkuratov, E.E. Ouabain-induced changes in MAP kinase phosphorylation in primary culture of rat cerebellar cells // Cell Biochem. Funct. — 2016. — № 34 (5). — C. 367–377
162. Lopachev A.V., Lopacheva O.M., Nikiforova K.A., Filimonov I.S., Fedorova T.N., Akkuratov E.E. Comparative Action of Cardiotonic Steroids on Intracellular Processes in Rat Cortical Neurons // Biochemistry (Mosc). — 2018. — № 83(2). — C. 140-151.
163. Lopachev A., Volnova A., Evdokimenko A., Abaimov D., Timoshina Y., Kazanskaya R., Lopacheva O., Deal A., Budygin E., Fedorova T., Gainetdinov R. Intracerebroventricular injection of ouabain causes mania-like behavior in mice through D2 receptor activation // Sci Rep. — 2019. — № 9(1). — C. 15627.
164. Lopachev A.V., Khutorova A.V., Abaimov D.A., Timoshina Y.A., Fedorova T.N., Kazanskaya R.B. Comparative Evaluation of Cardiotonic Steroid Action on the

- Viability of Differentiated and Undifferentiated Human Neuroblastoma SH-SY5Y Cell Culture // Human Physiology. — 2021. — № 47(8). — C.861-869.
165. Lopachev A.V., Lagarkova M.A., Lebedeva O.S., Ezhova M.A., Kazanskaya R.B., Timoshina Y.A., Khutorova A.V., Akkuratov E.E., Fedorova T.N., Gainetdinov R.R. Ouabain-Induced Gene Expression Changes in Human iPSC-Derived Neuron Culture Expressing Dopamine and cAMP-Regulated Phosphoprotein 32 and GABA Receptors // Brain Sci. — 2021. — № 11(2). — C. 203.
 166. Lowry C.A., Golod M.E., Andrew R.D., Bennett B.M. Expression of Neuronal Na⁺/K⁺-ATPase α Subunit Isoforms in the Mouse Brain Following Genetically Programmed or Behaviourally-induced Oxidative Stress // Neuroscience. — 2020. — № 442. — C. 202-215.
 167. Luo Y., Qin H., Zhao L., Jin L., Jiang A., Li X., Li M., Wang X. Report-Ouabain inhibits RAW264.7 cells proliferation and induces apoptosis via Bcl-2 and bax expression // Pak J Pharm Sci.— 2018. — № 31(5). —C. 1997-2003.
 168. Lv C., Hong T., Yang Z., Zhang Y., Wang L., Dong M., Zhao J., Mu J., Meng Y. Effect of Quercetin in the 1-Methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine-Induced Mouse Model of Parkinson's Disease // Evid Based Complement Alternat Med. — 2012. — № 2012. — C. 928643.
 169. Lynam D.R., Roos J.W., Pfeifer G.D., Fort B.F., Pullin T.G. Environmental effects and exposures to manganese from use of methylcyclopentadienyl manganese tricarbonyl (MMT) in gasoline // Neurotoxicology. — 1999. — № 20(2-3). — C. 145-150.
 170. Madan N., Xu Y., Duan Q., Banerjee M., Larre I., Pierre S.V., Xie Z. Src-independent ERK signaling through the rat α3 isoform of Na/K-ATPase // Am J Physiol Cell Physiol. — 2017. — № 312(3). — C. 222-232.
 171. Maidana L.M., Guerra J.M.D.S., Souza-Pereira A., Lins M.P., Moreira-Silva M.J., Paiva E.G., Godinho D.B., Royes L.F.F., Rambo L.M. Previous strength training attenuates ouabain-induced bipolar disorder-related behaviors and memory deficits

- in rats: Involvement of hippocampal ERK/CREB and PI3K/AKT/mTOR pathways // Neurochem Int. — 2025. — № 183. — C. 105919.
172. Maor G., Dubreuil R.R., Feany M.B. α -Synuclein Promotes Neuronal Dysfunction and Death by Disrupting the Binding of Ankyrin to β -Spectrin // J Neurosci. — 2023. — № 43(9). — C. 1614-1626.
173. Mergler D., Huel G., Bowler R., Iregren A., Bélanger S., Baldwin M., Tardif R., Smargiassi A., Martin L. Nervous system dysfunction among workers with long-term exposure to manganese // Environ Res. — 1994. — № 64(2). — C. 151-180.
174. Meredith G.E., Rademacher D.J. MPTP Mouse Models of Parkinson's Disease: An Update // Journal of Parkinson's Disease. — 2011. — № 1. — C. 19 – 33.
175. Middleton J.P., Khan W.A., Collinsworth G., Hannun Y.A., Medford R.M. Heterogeneity of protein kinase C-mediated rapid regulation of Na/K-ATPase in kidney epithelial cells // J Biol Chem. — 1993. — № 268(21).— C.15958-64.
176. Milatovic, D., Zaja-Milatovic, S., Gupta, R.C., Yu, Y., Aschner, M. Oxidative damage and neurodegeneration in manganese-induced neurotoxicity. // Toxicol. Appl. Pharmacol. — 2009. — № 240 (2). — C. 219–225.
177. Meyer-Baron M., Knapp G., Schäper M., van Thriel C. Performance alterations associated with occupational exposure to manganese--a meta-analysis // Neurotoxicology. — 2009. — № 30(4). — C. 487-496.
178. Mims M.P., Prchal J.T. Divalent metal transporter 1 // Hematology. — 2005. — № 10(4). — C. 339-345.
179. Mohler P.J., Davis J.Q., Bennett V. Ankyrin-B coordinates the Na/K ATPase, Na/Ca exchanger, and InsP3 receptor in a cardiac T-tubule/SR microdomain // PLoS Biol. — 2005. — № 3(12). — C. e423.
180. Moos T., Morgan E.H. Transferrin and transferrin receptor function in brain barrier systems // Cell Mol Neurobiol. — 2000. — № 20(1). — C. 77-95.
181. Morgan R.G., Gibbs J.T., Melief E.J., Postupna N.O., Sherfield E.E., Wilson A., Keene C.D., Montine T.J., Palmiter R.D., Darvas M. Relative contributions of

- severe dopaminergic neuron ablation and dopamine depletion to cognitive impairment // *Exp. Neurol.* — 2015. — № 271. — C. 205-214.
182. Moseley A.E., Williams M.T., Schaefer T.L., Bohanan C.S., Neumann J.C., Behbehani M.M., Vorhees C.V., Lingrel J.B. Deficiency in Na,K-ATPase α Isoform Genes Alters Spatial Learning, Motor Activity, and Anxiety in Mice // *J. Neurosci.* — 2007. — № 27. — C. 616–626.
183. Munzer J.S., Daly S.E., Jewell-Motz E.A., Lingrel J.B., Blostein R. Tissue- and isoform-specific kinetic behavior of the Na,K-ATPase // *J. Biol. Chem.* — 1994. — № 269. — C. 16668–16676.
184. Nicita F., Travaglini L., Sabatini S., Garavaglia B., Panteghini C., Valeriani M., Bertini E., Nardocci N., Vigevano F., Capuano A. Childhood-onset ATP1A3-related conditions: Report of two new cases of phenotypic spectrum // *Parkinsonism Relat Disord.* — 2016. — № 30. — C. 81-82.
185. Nyarko-Danquah I., Pajarillo E., Digman A., Soliman K.F.A., Aschner M., Lee E. Manganese Accumulation in the Brain via Various Transporters and Its Neurotoxicity Mechanisms // *Molecules.* — 2020. — № 25(24). — C. 5880.
186. Oblak A.L., Hagen M.C., Sweadner K.J., Haq I., Whitlow C.T., Maldjian J.A., Epperson F., Cook J.F., Stacy M., Murrell J.R., Ozelius L.J., Brashear A., Ghetti B. Rapid-onset dystonia-parkinsonism associated with the I758S mutation of the ATP1A3 gene: a neuropathologic and neuroanatomical study of four siblings // *Acta Neuropathol.* — 2014. — № 128(1). — C. 81-98.
187. Ogawa H., Shinoda T., Cornelius F., Toyoshima C. Crystal structure of the sodium-potassium pump (Na⁺,K⁺-ATPase) with bound potassium and ouabain // *Proc Natl Acad Sci U S A.* — 2009. - № 106(33). – C. 13742-13747.
188. Olanow C. W. Manganese-induced parkinsonism and Parkinson's disease // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* — 2004. — № 1012. — C. 209–223.
189. Orellana A.M., Leite J.A., Kinoshita P.F., Vasconcelos A.R., Andreotti D.Z., de Sá Lima L., Xavier G.F., Kawamoto E.M., Scavone C. Ouabain increases neuronal

- branching in hippocampus and improves spatial memory // Neuropharmacology. — 2018. — № 140. — C. 260–274.
190. Pajarillo E., Nyarko-Danquah I., Digman A., Multani H.K., Kim S., Gaspard P., Aschner M., Lee E. Mechanisms of manganese-induced neurotoxicity and the pursuit of neurotherapeutic strategies // Front Pharmacol. . — 2022. — № 13. — C. 1011947.
191. Paulus M.P., Dulawa S.C., Ralph R.J., Mark A.G. Behavioral organization is independent of locomotor activity in 129 and C57 mouse strains // Brain Res. — 1999. — № 835. — C. 27–36.
192. Peng L., Martin-Vasallo P., Sweadner K.J. Isoforms of Na,K-ATPase alpha and beta subunits in the rat cerebellum and in granule cell cultures // J. Neurosci. — 1997. — № 17. — C. 3488–3502.
193. Peng L., Arystarkhova E., Sweadner K.J. Plasticity of Na,K-ATPase isoform expression in cultures of flat astrocytes: species differences in gene expression // Glia. — 1998. — № 24. — C. 257–271.
194. Peres T.V., Pedro D.Z., de Cordova F.M., Lopes M.W., Gonçalves F.M., Mendes-de-Aguiar C.B., Walz R., Farina M., Aschner M., Leal R.B. In vitro manganese exposure disrupts MAPK signaling pathways in striatal and hippocampal slices from immature rats // Biomed Res Int. — 2013. — № 2013. — C. 769295.
195. Peres T.V., Schettinger M.R., Chen P., Carvalho F., Avila D.S., Bowman A.B., Aschner M. Manganese-induced neurotoxicity: a review of its behavioral consequences and neuroprotective strategies // BMC Pharmacol Toxicol. — 2016. — № 17(1). — C. 57.
196. Petrushanko I.Y., Bogdanov N.B., Lapina N., Boldyrev A.A., Gassmann M., Bogdanova A.Y. Oxygen-induced Regulation of Na/K ATPase in cerebellar granule cells // J Gen Physiol. — 2007. — № 130(4). — C. 389-398.
197. Petrushanko I. Y., Yakushev S., Mitkevich V. A., Kamanina Y. V., Ziganshin R. H., Meng X., Anashkina A. A., Makhro A., Lopina O. D., Gassmann M., Makarov A. A., Bogdanova A. Sglutathionylation of the Na,K-ATPase catalytic alpha subunit is a

- determinant of the enzyme redox sensitivity // J Biol Chem. – 2012. – №287(38). – C. 32195-32205.
198. Petrushanko I.Y., Mitkevich V.A., Anashkina A.A., Adzhubei A.A., Burnysheva K.M., Lakunina V.A., Kamanina Y.V., Dergousova E.A., Lopina O.D., Ogunshola O.O., Bogdanova A.Y., Makarov A.A. Direct interaction of beta-amyloid with Na,K-ATPase as a putative regulator of the enzyme function // Sci Rep. — 2016. — № 6. — C. 27738.
199. Pfeifer G.D., Roper J.M., Dorman D., Lynam D.R. Health and environmental testing of manganese exhaust products from use of methylcyclopentadienyl manganese tricarbonyl in gasoline // Sci Total Environ. — 2004. — № 334-335. — C. 397-408.
200. Pierre S., Xie Z. The Na, K-ATPase receptor complex // Cell Biochemistry and Biophysics. — 2006. — № 46. — C. 303–315.
201. Pivovarov A.S., Calahorro F., Walker R.J. Na⁺/K⁺-pump and neurotransmitter membrane receptors // Invert Neurosci. — 2018. — № 19(1). — C. 1.
202. Qi Z, Yang X, Sang Y, Liu Y, Li J, Xu B, Liu W, He M, Xu Z, Deng Y, Zhu J. Fluoxetine and Riluzole Mitigates Manganese-Induced Disruption of Glutamate Transporters and Excitotoxicity via Ephrin-A3/GLAST-GLT-1/Glu Signaling Pathway in Striatum of Mice // Neurotox Res. — 2020. — № 38(2). — C. 508-523.
203. Quadri M., Federico A., Zhao T., Breedveld G.J., Battisti C., Delnooz C., Severijnen L.A., Di Toro Mammarella L., Mignarri A., Monti L., Sanna A., Lu P., Punzo F., Cossu G., Willemse R., Rasi F., Oostra B.A., van de Warrenburg B.P., Bonifati V. Mutations in SLC30A10 cause parkinsonism and dystonia with hypermanganesemia, polycythemia, and chronic liver disease // Am J Hum Genet. – 2012. – № 90(3). – C. 467-77.
204. Radad K., Al-Shraim M., Al-Emam A., Wang F., Kranner B., Rausch W.D., Moldzio R. Rotenone: from modelling to implication in Parkinson's disease // Folia Neuropathologica. – 2019. – № 57(4). – C. 317-326.

205. Raike, R.S., Pizoli, C.E., Weisz, C., Maagdenberg, A.M.J.M., van den, Jinnah, H.A., Hess, E.J. Limited regional cerebellar dysfunction induces focal dystonia in mice // *Neurobiol. Dis.* — 2013. — № 49. — C. 200–210.
206. Rathbun W.B., Betlach M.V. Estimation of enzymically produced orthophosphate in the presence of cysteine and adenosine triphosphate // *Anal. Biochem.* — 1969. — № 28 (1). — C. 436–445.
207. Reinhard L., Tidow H., Clausen M. J., Nissen P. Na₊,K₊-ATPase as a docking station: Protein-protein complexes of the Na₊,K₊-ATPase // *Cellular and Molecular Life Sciences.* — 2013. — № 70(2). — C. 205–222.
208. Robinson, S., Sandstrom, S.M., Denenberg, V.H., Palmiter, R.D. Distinguishing whether dopamine regulates liking, wanting, and/or learning about rewards // *Behav. Neurosci.* — 2005. — № 119 (1). — C. 5–15.
209. Rodichkin A.N., Edler M.K., McGlothan J.L., Guilarte T.R. Behavioral and neurochemical studies of inherited manganese-induced dystonia-parkinsonism in Slc39a14-knockout mice // *Neurobiol Dis.* — 2021. — № 158. — C. 105467.
210. Roels H.A., Ortega Eslava M.I., Ceulemans E., Robert A., Lison D. Prospective study on the reversibility of neurobehavioral effects in workers exposed to manganese dioxide // *Neurotoxicology.* — 1999. — № 20(2-3). — C. 255-271.
211. Romanovsky, D., Light, K.E., Walker, J., Dobretsov, M. Target-determined expression of alpha3 isoform of the Na₊,K₊-ATPase in the somatic nervous system of rat // *J. Comp. Neurol.* — 2005. — № 483 (1). — C. 114–123.
212. Rose E.M., Koo J.C., Antflick J.E., Ahmed S.M., Angers S., Hampson D.R. Glutamate transporter coupling to Na,K-ATPase // *J Neurosci.* — 2009. — № 29(25). — C. 8143–8155.
213. Rosewich H., Baethmann M., Ohlenbusch A., Gärtner J., Brockmann K. A novel ATP1A3 mutation with unique clinical presentation // *J Neurol Sci.* — 2014. — № 341(1-2). — C. 133-135.

214. Rossi M., Balint B., Millar Vernetti P., Bhatia K.P., Merello M. Genetic Dystonia-ataxia Syndromes: Clinical Spectrum, Diagnostic Approach, and Treatment Options // *Mov Disord Clin Pract.* — 2018. — № 5(4). — C. 373-382.
215. Rossitto, G., Mary, S., Chen, J.Y., Boder, P., Chew, K.S., Neves, K.B., Alves, R.L., Montezano, A.C., Welsh, P., Petrie, M.C., Graham, D., Touyz, R.M., Delles, C. Tissue sodium excess is not hypertonic and reflects extracellular volume expansion // *Nat. Commun.* — 2020. — № 11 (1). — C. 4222.
216. Roubergue A., Philibert B., Gautier A., Kuster A., Markowicz K., Billett De Villemeur T., Vuillaumier-Barrot S., Nicole S., Roze E., Douummar D. Excellent Response to a Ketogenic Diet in a Patient with Alternating Hemiplegia of Childhood // *JIMD Reports.* — 2012. — № 4. — C. 113–116.
217. Roubergue A., Roze E., Vuillaumier-Barrot S., Fontenille M.J., Méneret A., Vidailhet M., Fontaine B., Douummar D., Philibert B., Riant F., Nicole S. The multiple faces of the ATP1A3-related dystonic movement disorder // *Mov Disord.* — 2013. — № 28(10). — C. 1457-1459.
218. Sahni V., Léger Y., Panaro L., Allen M., Giffin S., Fury D., Hamm N. Case report: a metabolic disorder presenting as pediatric manganism // *Environ Health Perspect.* — 2007. — № 115(12). — C. 1776-1779.
219. Salles P.A., Mata I.F., Brünger T., Lal D., Fernandez H.H. ATP1A3-Related Disorders: An Ever-Expanding Clinical Spectrum // *Front Neurol.* — 2021. — № 12. — C. 637890.
220. Sampson J.B., Michaeli T.H., Wright B.A., Goldman J.E., Vonsattel J.P., Fahn S. Basal Ganglia Gliosis in a Case of Rapid-Onset Dystonia-Parkinsonism (DYT12) with a Novel Mutation in ATPase 1A3 (*ATP1A3*) // *Mov Disord Clin Pract.* — 2016. — № 3(6). — C. 618-620.
221. Santiago R.M., Barbieiro J., Lima M.M.S., Dombrowski P.A., Andreatini R., Vital M.A. Depressive-like behaviors alterations induced by intranigral MPTP, 6- OHDA, LPS and rotenone models of Parkinson's disease are predominantly associated with

- serotonin and dopamine // *Prog. Neuro-Psychopharmacol. Biol. Psychiatry.* — 2010. — № 34 (6). — C. 1104–1114.
222. Santos M.S., Goncalves P.P., Carvalho A.P. Effect of ouabain on the gamma-[³H] aminobutyric acid uptake and release in the absence of Ca (+)+ and K (+)-depolarization // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* — 1990. — № 253. — C. 620–627.
223. Sasaki M., Ishii A., Saito Y., Morisada N., Iijima K., Takada S., Araki A., Tanabe Y., Arai H., Yamashita S., Ohashi T., Oda Y., Ichiseki H., Hirabayashi S., Yasuhara A., Kawakami H., Kimura S., Shimono M., Narumiya S., Suzuki M., Yoshida T., Oyazato Y., Tsuneishi S., Ozasa S., Yokochi K., Dejima S., Akiyama T., Kishi N., Kira R., Ikeda T., Oguni H., Zhang B., Tsuji S., Hirose S. Genotype-phenotype correlations in alternating hemiplegia of childhood // *Neurology.* — 2014. — № 82(6). — C. 482-490.
224. Sawamoto N., Piccini P., Hotton G., Pavese N., Thielemans K., Brooks D.J. Cognitive deficits and striato-frontal dopamine release in Parkinson's disease // *Brain.* — 2008. — № 131. — C. 1294-12302.
225. Schneider R., Wray V., Nimtz M., Lehmann W. D., Kirch U., Antolovic R., Schoner W. Bovine adrenals contain, in addition to ouabain, a second inhibitor of the sodium pump // *J Biol Chem.* — 1998. — № 273 (2). — C. 784-792.
226. Schonfeld W., Weiland J., Lindig C., Masnyk M., Kabat M. M., Kurek A., Wicha J., Repke K. R. The lead structure in cardiac glycosides is 5 beta, 14 beta-androstan-3 beta 14-diol // *NaunynSchmiedeberg's archives of pharmacology.* — 1985. — № 329(4). — C. 414-426.
227. Sepúlveda, M.R., Dresselaers, T., Vangheluwe, P., Everaerts, W., Himmelreich, U., Mata, A.M., Wuytack, F. Evaluation of manganese uptake and toxicity in mouse brain during continuous MnCl₂ administration using osmotic pumps // *Contrast Media Mol. Imaging.* — 2012. — № 7 (4). — C. 426–434
228. Shapira AH, Jenner P. Etiology and pathogenesis of Parkinson's disease // *Mov Disord.* — 2011. — № 12(6). — C. 1049-55

229. Shinoda T., Ogawa H., Cornelius F., Toyoshima C. Crystal structure of the sodium-potassium pump at 2.4 Å resolution // *Nature*. — 2009. — № 459(7245). — C. 446-450.
230. Shrivastava A.N., Redeker V., Fritz N., Pieri L., Almeida L.G., Spolidoro M., Liebmann T., Bousset L., Renner M., Léna C., Aperia A., Melki R., Triller A. α -synuclein assemblies sequester neuronal α 3-Na⁺/K⁺-ATPase and impair Na⁺ gradient // *EMBO J.* — 2015. — № 34(19). — C. 2408-2423.
231. Shrivastava A.N., Redeker V., Pieri L., Bousset L., Renner M., Madiona K., Mailhes-Hamon C., Coens A., Buée L., Hantraye P., Triller A., Melki R. Clustering of Tau fibrils impairs the synaptic composition of α 3-Na⁺/K⁺-ATPase and AMPA receptors // *EMBO J.* — 2019. — № 38(3). — C. e99871.
232. Shukla G.S., Malhotra K.M., Chandra S.V. Effects of manganese on rat brain microsomal Mg²⁺-Na⁺-K⁺-ATPase: in vivo and in vitro studies // *Environ Res*. — 1983. — № 32(1). — C. 212-219.
233. Sidoryk-Wegrzynowicz M., Aschner M. Manganese toxicity in the central nervous system: the glutamine/glutamate- γ -aminobutyric acid cycle // *J Intern Med*. — 2013. — № 273(5). — C. 466-477.
234. Simola N., Morelli M., Carta A.R. The 6-Hydroxydopamine model of parkinson's disease // *Neurotoxicity Research*. — 2009. — № 11. — C. 151-167.
235. Skou J.C., Esmann M. The Na,K-ATPase // *J Bioenerg Biomembr*. — 1992. — № 24(3). — C. 249-261.
236. Smolyaninova L.V., Timoshina Y.A., Berezhnoy D.S., Fedorova T.N., Mikheev I.V., Seregina I.F., Loginova N.A., Dobretsov M.G. Impact of manganese accumulation on Na,K-ATPase expression and function in the cerebellum and striatum of C57Bl/6 mice // *NeuroToxicology*. — 2023. — № 98. — C. 86-97.
237. Song H., Karashima E., Hamlyn J.M., Blaustein M.P. Ouabain-digoxin antagonism in rat arteries and neurones // *J Physiol*. — 2014. — № 592(5). — C. 941-69.

238. Sriram K., Lin G.X., Jefferson A.M., Roberts J.R., Wirth O., Hayashi Y., Krajnak K.M., Soukup J.M., Ghio A.J., Reynolds S.H., Castranova V., Munson A.E., Antonini J.M. Mitochondrial dysfunction and loss of Parkinson's disease-linked proteins contribute to neurotoxicity of manganese-containing welding fumes // FASEB J. — 2010. — № 24(12). — C. 4989-5002.
239. Stallings W.C., Metzger A.L., Patridge K.A., Fee J.A., Ludwig M.L. Structure-function relationships in iron and manganese superoxide dismutases // Free Radic Res Commun. — 1991. — № 12-13. — C. 259-268.
240. Stamelou M., Tuschl K., Chong W.K., Burroughs A.K., Mills P.B., Bhatia K.P., Clayton P.T. Dystonia with brain manganese accumulation resulting from SLC30A10 mutations: A new treatable disorder // Mov Disord. — 2012. — № 27. — C. 1317–1322.
241. Stephenson A.P., Schneider J.A., Nelson B.C., Atha D.H., Jain A., Soliman K.F., Aschner M., Mazzio E., Renee Reams R. Manganese-induced oxidative DNA damage in neuronal SH-SY5Y cells: attenuation of thymine base lesions by glutathione and N-acetylcysteine // Toxicol Lett. — 2013. — № 218(3). — C. 299-307.
242. Sweadner K. J. Enzymatic properties of separated isozymes of the Na,K-ATPase. Substrate affinities, kinetic cooperativity, and ion transport stoichiometry // J Biol Chem. — 1985. — № 260(21). — C. 11508-11513.
243. Sugimoto H., Ikeda K., Kawakami K. Heterozygous mice deficient in Atp1a3 exhibit motor deficits by chronic restraint stress // Behav. Brain Res. — 2014. — № 272. — C. 100–110.
244. Sui L., Song X.J., Ren J., Ju L.H., Wang Y. Intracerebroventricular administration of ouabain alters synaptic plasticity and dopamine release in rat medial prefrontal cortex // J Neural Transm (Vienna). — 2013. — № 120(8). — C. 1191-1199.
245. Surmeier D.J., Schumacker P.T. Calcium, bioenergetics, and neuronal vulnerability in Parkinson's disease // J Biol Chem. Apr. — 2013. — № 288(15). — C. 10736-41.

246. Taguchi T., Ikuno M., Yamakado H., Takahashi R. Animal Model for Prodromal Parkinson's Disease // *Int. J. Mol. Sci.* — 2020. — № 21. — C. 1961.
247. Therien A.G., Blostein R. Mechanisms of sodium pump regulation // *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* — 2000. — № 279. — C. 541-566.
248. Tidow H., Aperia A., Nissen P. How are ion pumps and agrin signaling integrated? // *Trends Biochem Sci.* — 2010. — № 35(12). — C. 653-659.
249. Timoshina Y.A., Pavlova A.K., Voronkov D.N., Abaimov D.A., Latanov A.V., Fedorova T.N. Assessment of the Behavioral and Neurochemical Characteristics in a Mice Model of the Premotor Stage of Parkinson's Disease Induced by Chronic Administration of a Low Dose of MPTP // *International Journal of Molecular Sciences.* — 2025. — №26(18). — C.8856.
250. Toyoshima C., Kanai R., Cornelius F. First crystal structures of Na⁺,K⁺-ATPase: new light on the oldest ion pump // *Structure.* — 2011. — № 19(12). — C. 1732-1738.
251. Tran T.T., Chowanadisai W., Lönnerdal B., Le L., Parker M., Chicz-Demet A., Crinella F.M. Effects of neonatal dietary manganese exposure on brain dopamine levels and neurocognitive functions // *Neurotoxicology.* — 2002. — № 23(4-5). — C. 645-651.
252. Tuschl K., Mills P.B., Parsons H., Malone M., Fowler D., Bitner-Glindzicz M., Clayton P.T. Hepatic cirrhosis, dystonia, polycythaemia and hypermanganesaemia—a new metabolic disorder // *J Inherit Metab Dis.* — 2008. — № 31. — C. 151–163.
253. Tuschl K., Mills P.B., Clayton P.T. Manganese and the brain // *Int Rev Neurobiol.* — 2013. — № 110. — C. 277-312.
254. Tymiak A. A., Norman J. A., Bolgar M., DiDonato G. C., Lee H., Parker W. L., Lo L. C., Berova N., Nakanishi K., Haber E., Haupert G. T. Physicochemical characterization of a ouabain isomer isolated from bovine hypothalamus // *Proc Natl Acad Sci U S A.* — 1993. — № 90 (17). — C. 8189-8193.

255. Veldhuis W.B., van der Stelt M., Delmas F., Gillet B., Veldink G.A., Vliegenthart J.F.G., Nicolay K., Bär P.R. In vivo excitotoxicity induced by ouabain, a Na⁺/K⁺-ATPase inhibitor // *J. Cereb. Blood Flow Metab.* — 2003. — № 23. — C. 62–74.
256. Vezyroglou A., Akilapa R., Barwick K., Koene S., Brownstein C.A., Holder-Espinasse M., Fry A.E., Németh A.H., Tofaris G.K., Hay E., Hughes I., Mansour S., Mordekar S.R., Splitt M., Turnpenny P.D., Demetriou D., Koopmann T.T., Ruivenkamp C.A.L., Agrawal P.B., Carr L., Clowes V., Ghali N., Holder S.E., Radley J., Male A., Sisodiya S.M., Kurian M.A., Cross J.H., Balasubramanian M. The Phenotypic Continuum of *ATPIA3*-Related Disorders // *Neurology*. — 2022. — № 99(14). — C. 1511-1526.
257. Villa RF, Arnaboldi R, Ghigini B, Gorini A. Parkinson-like disease by 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) toxicity in *Macaca fascicularis*: synaptosomal metabolism and action of dihydroergocriptine // *Neurochem Res.* — 1994. — № 19(3). — C. 229-236.
258. Vinciguerra M., Mordasini D., Vandewalle A., Feraille E. Hormonal and nonhormonal mechanisms of regulation of the NA,K-pump in collecting duct principal cells // *Semin Nephrol.* — 2005. — № 25(5). — C. 312-21.
259. Vasilets L.A., Schmalzing G., Mädefessel K., Haase W., Schwarz W. Activation of protein kinase C by phorbol ester induces downregulation of the Na⁺/K⁽⁺⁾-ATPase in oocytes of *Xenopus laevis* // *J Membr Biol.* — 1990. — № 118(2). — C. 131-42.
260. Wang L., Shiraki A., Itahashi M., Akane H., Abe H., Mitsumori K., Shibutani M. Aberration in epigenetic gene regulation in hippocampal neurogenesis by developmental exposure to manganese chloride in mice // *Toxicol Sci.* — 2013. — № 136(1). — C. 154-165.
261. Wedler F. C., Denman R. B. Glutamine synthetase: The major Mn(II) enzyme in mammalian brain // *Curr. Top. Cell. Regul.* — 1984. — № 24. — C. 153–169.

262. Webb G. D., Taylor E. A., Oh V. M., Yeo S. B., Ng L. L. Effect of extracellular potassium concentration on the sodium-potassium pump rate in human lymphocytes // *Clin Sci (Lond)*. — 1995. — № 88(6). — C. 695-700.
263. Weigand K.M., Messchaert M., Swarts H.G., Russel F.G., Koenderink J.B. Alternating Hemiplegia of Childhood mutations have a differential effect on Na(+),K(+)-ATPase activity and ouabain binding // *Biochim Biophys Acta*. — 2014. — № 1842(7). — C. 1010-1016.
264. Wichmann T., Dostrovsky J.O. Pathological basal ganglia activity in movement disorders // *Neuroscience*. — 2011. — № 198. — C. 232–244.
265. Williams K., Wilson M.A., Bressler J. Regulation and developmental expression of the divalent metal-ion transporter in the rat brain // *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*. — 2000. — № 46(3). — C. 563-571.
266. Winslow J.W.W., Limesand K.H., Zhao N. The Functions of ZIP8, ZIP14, and ZnT10 in the Regulation of Systemic Manganese Homeostasis // *Int J Mol Sci*. — 2020. — № 21(9). — C. 3304.
267. Xicoy H., Wieringa B., Martens G.J. The SH-SY5Y cell line in Parkinson's disease research: a systematic review // *Mol Neurodegener*. — 2017. — № 12(1). — C. 10.
268. Xu Z, Jia K, Xu B, He A, Li J, Deng Y, Zhang F. Effects of MK-801, taurine and dextromethorphan on neurotoxicity caused by manganese in rats // *Toxicol Ind Health*. — 2010. — № 26(1). — C. 55-60.
269. Yan M.H., Wang X., Zhu X. Mitochondrial defects and oxidative stress in Alzheimer disease and Parkinson disease // *Free Radical Biology and Medicine*. — 2013. — № 62. — C. 90–101.
270. Yan D.Y., Xu B. The Role of Autophagy in Manganese-Induced Neurotoxicity // *Front Neurosci*. — 2020. — № 14. — C. 574750.
271. Yoon T., Okada J., Jung M.W., Kim J.J. Prefrontal cortex and hippocampus subserve different components of working memory in rats // *Learn Mem*. — 2008. — № 15(3). — C. 97-105.

272. Yu L., Peng G., Yuan Y., Tang M., Liu P., Liu X., Ni J., Li Y., Ji C., Fan Z., Zhu W., Luo B., Ke Q. ATP1A3 mutation in rapid-onset dystonia parkinsonism: New data and genotype-phenotype correlation analysis // *Front Aging Neurosci.* – 2022. – № 14. — C. 933893.
273. Zanotti-Fregonara P., Vidailhet M., Kas A., Ozelius L.J., Clot F., Hindié E., Ravasi L., Devaux J.Y., Roze E. [123I]-FP-CIT and [99mTc]-HMPAO single photon emission computed tomography in a new sporadic case of rapid-onset dystonia-parkinsonism // *J Neurol Sci.* — 2008. — № 273(1-2). — C. 148-151.
274. Zhang D., He X., Huang S., Li Y. Toxicity of manganese exposure on the postnatal development of brain in mice // *Wei Sheng Yan Jiu.* — 2002. — № 31(2). — C. 73-75.
275. Zhang D., Hou Q., Wang M., Lin A., Jarzylo L., Navis A., Raissi A., Liu F., Man H.Y. Na,K-ATPase activity regulates AMPA receptor turnover through proteasome-mediated proteolysis // *J Neurosci.* — 2009. — № 29(14). — C. 4498-4511.
276. Zhang J., Yang Y., Yang X., Qin J., Wei X., Peng Y. Influence of manganese exposure on cognitive function, plasma APP and A β levels in older men // *J. Trace Elem. Med. Biol.* — 2021. — № 67. — C. 126788.
277. Zhang L., Zhang Z., Guo H., Wang Y. Na $^{+}$ /K $^{+}$ -ATPase-mediated signal transduction and Na $^{+}$ /K $^{+}$ -ATPase regulation // *Fundam Clin Pharmacol.* – 2008. – №22(6). – C. 615-621.
278. Zhang L.N., Li J.X., Hao L., Sun Y.J., Xie Y.H., Wu S.M., Liu L., Chen X.L., Gao Z.B. Crosstalk between dopamine receptors and the Na $^{+}$ /K $^{+}$ -ATPase (review) // *Mol Med Rep.* — 2013. — № 8(5). — C. 1291-1299.
279. Zhang P., Hatter A., Liu B. Manganese chloride stimulates rat microglia to release hydrogen peroxide // *Toxicol Lett.* — 2007. — № 173(2). — C. 88-100.
280. Zhang X., Lee W., Bian J.S. Recent Advances in the Study of Na $^{+}$ /K $^{+}$ -ATPase in Neurodegenerative Diseases // *Cells.* — 2022. — № 11(24). — C. 4075.

281. Zhu J.H., Guo F., Shelburne J., Watkins S., Chu C.T. Localization of phosphorylated ERK/MAP kinases to mitochondria and autophagosomes in Lewy body diseases // Brain Pathol. — 2003. — № 13(4). — С. 473-81.