

НЕЙРОДЕГЕНЕРАТИВНЫЕ ЗАБОЛЕВАНИЯ:

от генома
до целостного организма

Под редакцией
академика РАН М.В. УГРЮМОВА

ТОМ 1



МОСКВА НАУЧНЫЙ МИР 2014

УДК 616.8
ББК 56.1
НЗ8

НЕЙРОДЕГЕНЕРАТИВНЫЕ ЗАБОЛЕВАНИЯ: от генома до целостного организма. В 2-х томах.
Том 1 / Под ред. М.В. Угрюмова. – М.: Научный мир, 2014. – 580 с.

ISBN 978-5-91522-400-0 (общ.)

ISBN 978-5-91522-395-9 (том 1)

Монография посвящена современным представлениям об эпидемиологии, фармакоэкономике, клинике, патогенезе, диагностике и лечении социально значимых нейродегенеративных заболеваний, болезни Альцгеймера, болезни Паркинсона и др. Наряду с описанием мировых достижений, обобщены результаты многолетних мультидисциплинарных исследований, выполненных авторами – ведущими российскими неврологами, психиатрами, нейрофизиологами, фармакологами, молекулярными биологами, генетиками, математиками, физиками и химиками по программе Российской академии наук «Фундаментальные науки – медицине». Основное внимание сосредоточено на создании и использовании новых «прорывных» технологий доклинической диагностики – задолго до появления симптомов, и превентивного лечения, направленного на остановку гибели специфических нейронов. При этом дается оценка нейротехнологий, позволяющих понять молекулярные механизмы функционирования мозга в норме и при патологии, создать диагностику на основе геномики, эпигеномики и протеомики, найти новые молекулярные мишени для лекарственных веществ и способы их адресной доставки.

Для широкого круга биологов и медиков, а также для преподавателей и студентов биологических и медицинских вузов.

Дополнительный тираж публикуется при финансовой поддержке Программы фундаментальных исследований Президиума РАН «Фундаментальные науки – медицине».

NEURODEGENERATIVE DISEASES: from genome to the whole organism. Vol. 1 / Ed. M.V. Ugrymov. – М.: Scientific World, 2014. – 580 p.

The monograph is devoted to the advanced concepts of epidemiology, pharmacoeconomics, clinics, pathogenesis, diagnostics and treatment of socially significant neurodegenerative diseases, Alzheimer's disease, Parkinson's disease, and others. Along with the description of the world progress, the monograph summarizes the results of long-term multidisciplinary research carried out by the authors, leading Russian neurologists, psychiatrists, neurophysiologists, pharmacologists, molecular biologists, genetics, mathematicians, physicists and chemists in the frame of the program of the Russian Academy of Sciences «Basic Science for Medicine». The main attention was attracted to the development and use of advanced «breakthrough» technologies for preclinical diagnostics, long before the appearance of symptoms, and creation of preventive therapy, serving to stop the death of specific neurons. Furthermore, it was given a description of recent neurotechnologies, which serve to discover unknown molecular mechanisms of brain functions in health and disease, make diagnostics, based on genomics, proteomics, and genomics, find new molecular targets for drugs, and methods of targeted delivery.

For a wide range of biologists and physicians, as well as for teachers and students of biological and medical faculties of the universities.

ISBN 978-5-91522-400-0 (общ.)

ISBN 978-5-91522-395-9 (том 1)

© Коллектив авторов, 2014

© Научный мир, 2014

ОГЛАВЛЕНИЕ

ТОМ 1

Авторы монографии	9
Предисловие (<i>А.И. Григорьев</i>)	18
Предисловие (<i>А.Н. Коновалов</i>)	20
Введение Трансляционная, персонализированная и профилактическая медицина как основа для борьбы с нейродегенеративными заболеваниями (<i>М.В. Угрюмов</i>)	22

Часть I

МОТОРНАЯ ФУНКЦИЯ И ЕЕ РЕГУЛЯЦИЯ В НОРМЕ И ПРИ ПАТОЛОГИИ

Глава I. Регуляция моторной функции в норме и при болезни Паркинсона

Регуляция моторного поведения (<i>А.С. Базян, Г.А. Григорьян, М.Е. Иоффе</i>)	45
Болезнь Паркинсона: клиника, диагностика и лечение (<i>А.Б. Гехт, Г.Р. Попов, А.А. Гудкова, Е.С. Коршунова, Е.А. Болдырева, Е.И. Гусев</i>)	74
Особенности поддержания вертикальной позы на ранней стадии болезни Паркинсона (<i>Ю.С. Левик, В.Ю. Шлыков, Н.В. Холмогорова, Т.Б. Киреева</i>)	96
Болезнь Паркинсона и эссенциальный тремор: сходство синдрома при разных прогнозах (<i>М.Е. Курганская, А.А. Фролов, М.Е. Иоффе</i>)	110
Корреляты функционального состояния центральной (моторной) нервной системы в неинвазивной диагностике нейродегенеративных патологий (<i>С.П. Романов, З.А. Александян</i>)	128
Болезнь Паркинсона, дофаминергическая система мозга и регуляция сна (<i>В.М. Ковальзон, И.М. Завалко, В.Б. Дорохов</i>)	151
Электрофизиологические подходы к ранней и дифференциальной диагностике болезни Паркинсона (<i>Ю.В. Обухов, А.В. Габова, З.А. Залялова, С.Н. Иллариошкин, А.В. Карабанов, М.С. Королев, Г.Д. Кузнецова, А.А. Морозов, Р.Р. Нигматуллина, К.Ю. Обухов, О.С. Сушкова</i>)	177

Использование компьютерной электромиографии для ранней и дифференциальной диагностики экстрапирамидных заболеваний (О.Е. Хуторская)	194
Оценка периферических проявлений болезни Паркинсона – новый подход к созданию доклинической диагностики (Р.Р. Нигматуллина, З.А. Залялова, В.С. Кудрин, Т.С. Пронина, С.Г. Георгиева, Н.Е. Воробьева, Н.В. Сошникова, А.Н. Краснов, О.И. Кузьмина, М.В. Угрюмов)	203
Альфа-синуклеин как биомаркер болезни Паркинсона (С.Н. Пчелина, А.К. Емельянов)	233
Генетические факторы в патогенезе семейной и спорадической формы болезни Паркинсона (М.И. Шадрина, Е.В. Филатова, А.Х. Алиева, С.А. Лимборская, П.А. Сломинский).....	251
Молекулярные основы болезни Паркинсона, обусловленной мутациями в гене <i>LRRK2</i> (С.Н. Пчелина, А.К. Емельянов, Т.С. Усенко).	287
Молекулярно-генетическое изучение болезни Паркинсона в Республике Башкортостан (И.М. Хидиятова, И.Р. Гилязова, Г.Н. Ахмадеева, А.Р. Байтимеров, Р.В. Магжанов, Э.К. Хуснутдинова)	305
Молекулярные механизмы патогенеза болезни Паркинсона и перспективы превентивной терапии (Ю.Ф. Пастухов, И.В. Екимова, А.Ю. Чеснокова)	316
Экспериментальное моделирование болезни Паркинсона (А.А. Колачева, Е.А. Козина, Г.Р. Хакимова, В.Г. Кучеряну, В.С. Кудрин, Р.Р. Нигматуллина, А.С. Базян, Г.А. Григорьян, М.В. Угрюмов).....	356
Глава 2. Нарушение моторики непаркинсонического происхождения	
Судорожная активность и нейродегенерация (В.А. Аниол, Н.В. Гуляева).....	423
Механизмы участия глутаматных рецепторов в патогенезе судорожных состояний и перспективы фармакологических воздействий (Л.Г. Магазаник, А.В. Зайцев, К.Х. Ким, Н.Я. Лукомская)	433
Электрическая стимуляция спинного мозга – эффективный способ регуляции локомоторных функций (Т.Р. Мошонкина, И.Н. Богачева, Н.А. Щербакова, А.Н. Макаровский, Ю.П. Герасименко)	468
Часть II	
РАССЕЯННЫЙ СКЛЕРОЗ	
Рассеянный склероз: патогенез, диагностика и лечение (А.Г. Габитов, О.О. Фаворова, О.Г. Кулакова, А.Н. Бойко, А.А. Белогуров, Н.А. Пономаренко)	496

Агрегация РНК-связывающего белка FUS как патогенетический фактор развития нейродегенеративного процесса (Т.А. Шелковникова, Е.И. Леонова, Р.К. Овчинников, Н.Н. Нинкина)	558
---	-----

ТОМ 2

Часть III

КОГНИТИВНЫЕ ФУНКЦИИ И ИХ РЕГУЛЯЦИЯ В НОРМЕ И ПРИ ПАТОЛОГИИ

Глава 1. Когнитивные функции в норме и при некоторых психических заболеваниях

Организация высших форм памяти у человека и структуры гиппокампа (А.М. Иваницкий)	7
Анатомо-функциональная организация и механизмы работы мозга человека при длительных нарушениях сознания как инновационная основа для разработки лечения этой патологии (Ю.И. Вайншкенер, И.М. Ивченко, А.Д. Коротков, С.В. Медведев)	15
Анализ ассоциации полиморфных вариантов генов-кандидатов с параноидной шизофренией и ответом на типичные нейролептики (А.Э. Гареева, Э.К. Хуснутдинова)	28
Экстралингвистические характеристики речевого сигнала и показатели ЭЭГ у больных с различными аффективными расстройствами (Н.Н. Лебедева, Е.Д. Каримова, Е.А. Казимирова)	50
Особенности μ -ритма ЭЭГ при шизофрении и аутизме (В.Б. Стрелец, Ж.В. Гарах, В.Ю. Новотоцкий-Власов, О.Ю. Хаердинова, Е.А. Луцкекина, В.С. Луцекин)	68

Глава 2. Нарушения когнитивных функций и их регуляции при болезни Альцгеймера

Болезнь Альцгеймера – клиника, диагностика и лечение (С.И. Гаврилова)	82
Ранняя диагностика болезни Альцгеймера на додементной стадии и превентивная терапия (С.И. Гаврилова, Н.Д. Селезнева, И.Ф. Рощина, Я.Б. Федорова)	95
Стратегии поиска биомаркеров синдрома мягкого когнитивного снижения и болезни Альцгеймера (И.А. Журавин, С.И. Гаврилова, Я.Б. Федорова, Н.М. Дубровская, Д.И. Козлова, С.А. Плесева, Н.Н. Наливаева)	124
Молекулярные аспекты патогенеза и современные подходы к фармакологической коррекции болезни Альцгеймера (М.С. Кухарский, Р.К. Овчинников, А.А. Устюгов, С.О. Бачурин)	137
Патогенез болезни Альцгеймера и кальциевый гомостаз (М.А. Рязанцева, Г.Н. Можяева, Е.В. Казначеева)	163

Формирование пусковых факторов амилоидоза нейронов и активация теплозащитных механизмов латентной стадии болезни Альцгеймера (<i>А.В. Мальцев, О.В. Галзитская</i>)	182
Роль предшественника амилоидного пептида и его метаболитов в патогенезе болезни Альцгеймера (<i>Н.Н. Наливаева, И.А. Журавин, Э. Дж. Тернер</i>)	224
Изучение амилоидогенеза <i>in vitro</i> : значение для разработки диагностики и терапии амилоидозов (<i>З.А. Поддубная, А.Г. Бобылёв</i>)	274
Потенциальная роль сфинголипидов в качестве биомаркеров болезни Альцгеймера (<i>А.В. Алесенко, С.И. Гаврилова</i>)	298
Дисфункция синапсов при нейродегенеративных заболеваниях и старении (<i>А.Л. Шварцман, С.В. Саранцева</i>)	321
Дисфункция периферических возбудимых структур при нейродегенеративных заболеваниях (<i>М.А. Мухамедьяров, П.Н. Григорьев, А.В. Леушина, А.А. Ризванов, А.В. Мартынов, Р.Р. Исламов, А.Л. Зефирова</i>)	339
Инъекционные модели болезни Альцгеймера как подход к исследованию клеточных механизмов патогенеза: нейродегенеративных изменений, воспаления, нарушений нейрогенеза (<i>М.Ю. Степаничев, Н.В. Гуляева</i>)	352
Изучение динамики нейродегенерации и компенсаторных механизмов у бульбэктомированных животных (<i>Н.В. Бобкова, М.Б. Евгеньев</i>)	380
Нарушение активности мозга на модели болезни Альцгеймера (<i>Е.А. Муганцева</i>)	405
Изучение механизмов когнитивных дисфункций с использованием модели пренатальной гипоксии (<i>И.А. Журавин, Д.С. Васильев, Н.М. Дубровская, Д.И. Козлова, Е.Г. Кочкина, С.А. Плеснева, Н.Л. Туманова, О.С. Алексеева, А.Н. Ветош, Н.Н. Наливаева</i>)	419
Моделирование патогенеза нейродегенеративных заболеваний на <i>Drosophila melanogaster</i> (<i>С.В. Саранцева, А.Л. Шварцман</i>)	438
Молекулярно-генетическая модель таупатии на основе сверхэкспрессии протеинкиназы GSK3 β в нервной системе <i>Drosophila melanogaster</i> (<i>М.В. Тростников, Н.В. Роцина, А.В. Симоненко, Д.В. Муха, Е.Г. Пасюкова</i>)	453

Глава 3. Нарушение сенсорики

Молекулярные механизмы нейродегенерации клеток сетчатки при ишемии (<i>Г.Р. Каламкаргов, А.Е. Бугрова, Т.С. Константинова, Т.Ф. Шевченко</i>)	465
--	-----

Флуорофоры липофусциновых гранул в клетках ретинального пигментного эпителия и аутофлуоресценция глазного дна человека как новый неинвазивный метод диагностики старческих изменений и дегенеративных заболеваний сетчатки (<i>М.А. Островский, Т.Б. Фельдман, М.А. Яковлева, С.А. Борзенко, П.М. Арбуханова</i>)	489
--	-----

Повреждение и восстановление сетчатки у мышей после воздействия генотоксических агентов ионизирующей радиации и метилнитрозомочевины (<i>В.А. Тронов, Ю.В. Виноградова, В.А. Поплинская, М.А. Островский</i>)	523
--	-----

Часть IV НОВЫЕ ПОДХОДЫ К ИССЛЕДОВАНИЮ, ДИАГНОСТИКЕ И ЛЕЧЕНИЮ ЗАБОЛЕВАНИЙ МОЗГА

Глава 1. Методы исследований

Никотиновые ацетилхолиновые рецепторы: физиологические функции и роль в нейродегенеративных процессах (<i>Е.В. Крюкова, И.В. Шелухина, М.Н. Жмак, М.Н. Осипов, Д.С. Кудрявцев, Л.О. Оджомоко, И.Е. Кашиверов, Ю.Н. Уткин, В.И. Цетлин</i>)	542
---	-----

Экспериментальные модели гиперпролактинемии (<i>Т.С. Пронина, Л.К. Дильмухаметова, М.В. Угрюмов</i>)	555
---	-----

Автоматизация анализа изображений в исследованиях мозга: постановка задач, математические основы, информационные технологии (<i>И.Б. Гуревич, Ю.И. Журавлев, А.А. Мягков, А.А. Колачева, Ю.О. Трусова, В.В. Яшина, Т.С. Пронина, М.В. Угрюмов</i>)	570
---	-----

Система компьютерной реконструкции 3D-распределений нейронов (<i>О.В. Евсеев, Е.В. Анциперов, Ю.В. Обухов, А.А. Колачева, М.В. Угрюмов</i>)	618
--	-----

Компьютерный метод объективизации головокращения и дифференциации вестибулопатий разного генеза (<i>Л.Н. Корнилова, Г.А. Екимовский, Е.В. Хабарова, Д.О. Глухих, И.А. Наумов, В.Н. Сагалович, Е.Г. Филатова, В.И. Федорова</i>)	634
--	-----

Глава 2. Диагностика

Позитронная эмиссионная томография в исследованиях рецепторов мозга: дофаминергическая система (<i>Р.Н. Красикова</i>)	650
---	-----

Использование магнитно-резонансной спектроскопии для диагностики и мониторинга лечения неврологических и психических заболеваний (<i>Н.А. Семенова, Т.А. Ахадов, М.В. Ублинский, С.Д. Варфоломеев</i>)	662
---	-----

Влияние острого введения алкоголя на личностные свойства и системную организацию поведения в реальной и виртуальной средах (<i>Б.Н. Безденежных, Ю.И. Александров</i>)	680
---	-----

Технология оптической интраоперационной диагностики в нейроонкологии на основе спектроскопического анализа нервных тканей (Т.А. Савельева, В.Б. Лоценов, А.В. Рябова, М.В. Лоценов, П.В. Грачев, М.А. Исаев, Д.В. Поминова, В.В. Волков, С.А. Горяинов, П.В. Зеленков, Г.М. Юсубалиева, Г.В. Павлова, А.А. Потапов)	705
--	-----

Глава 3. Лечение

Нейролипиды – эндогенные нейропротекторы при ишемии мозга и основа для создания новых гибридных мультифункциональных препаратов (М.Ю. Бобров, Н.М. Грецкая, М.Г. Акимов, В.В. Безуглов)	726
Исследование фармакокинетики и фармакодинамики амидной формы нейропротекторного пептида HLDF-6 с использованием равномерно меченных изотопами водорода соединений (Ю.А. Золотарев, Г.И. Ковалев, А.К. Дадаян, В.С. Козик, Е.А. Кондрахин, Е.В. Васильева, В.М. Липкин)	763
Нейропротектирующее действие иммуномодуляторов на дегенерирующие нейроны гиппокампа как основа для поиска лекарственных веществ (О.В., Годухин, Е.А. Туровский, М.В. Туровская, Е.А. Туховская, С.Г. Левин, Т.А. Савина, Т.Г. Щипакина, М.В. Конаков, В.П. Зинченко, А.Н. Мурашов)	778
Применение аденозинфосфатов для предотвращения молекулярного старения NADH-дегидрогеназы в митохондриях (М.С. Фролова, Н.Л. Векшин)	789
Репрограммирование соматических клеток: возможности применения для изучения болезней нервной системы и разработки методов лечения (Е.Д. Некрасов, И.В. Честков, М.А. Лагарькова, С.Л. Киселев)	799
Разработка пористых полимерных матриц-носителей для нейротрансплантатов (В.Н. Баграташвили, Е.Н. Антонов, А.В. Королева, В.К. Попов, П.С. Тимашев, А.В. Миронов, Б.Н. Чичков, М.В. Ведунова, Т.В. Шишкина, Е.В. Митрошина, Т.А. Сахарнова, И.В. Мухина)	811
Перспективы применения лентивирусной трансдукции клеток мозга для доставки генов нейротрофинов в область «полутени» ишемического очага (Г.Р. Тухбатова, М.В. Гуляев, М.М. Свинов, П.М. Балабан, С.В. Саложин)	839

АВТОРЫ МОНОГРАФИИ

- Акимов М.Г.* Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва
- Александров Ю.И.* Институт психологии РАН, Москва
- Алексамян З.А.* Институт мозга человека им. Н.П. Бехтерева РАН, Санкт-Петербург
- Алексеева О.С.* Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН, Санкт-Петербург
- Алесенко А.В.* Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, Москва
- Алиева А.Х.* Институт молекулярной генетики РАН, Москва
- Аниол В.А.* Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН, Москва
- Антонов Е.Н.* Институт проблем лазерных и информационных технологий РАН, Шатура
- Анциперов А.В.* Институт радиотехники и электроники им. В.А. Котельникова РАН, Москва
- Арбуханова П.М.* МНТК «Микрохирургия глаза» им. академика С.Н. Федорова, Москва
- Ахадов Т.А.* Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, Москва
- Ахмадеева Г.Н.* Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра РАН, Уфа
- Баграташвили В.Н.* Институт проблем лазерных и информационных технологий РАН, Шатура
- Базян А.С.* Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН, Москва
- Байтимеров А.Р.* Башкирский государственный медицинский университет, Уфа
- Балабан П.М.* Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН, Москва
- Бачурин С.О.* Институт физиологически активных веществ РАН, Черноголовка
- Безденежных Б.Н.* Институт психологии РАН, Москва
- Безуглов В.В.* Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва
- Белогуров А.А.* Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва
- Билалова Д.Ф.* Казанский государственный медицинский университет, Казань
- Бобкова Н.В.* Институт биофизики клетки РАН, Пущино
- Бобров М.Ю.* Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва
- Бобылев А.Г.* Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино
- Богачева И.Н.* Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН, Санкт-Петербург
- Бойко А.Н.* Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова, Москва
- Болдырева Е.А.* Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова, Москва

Борзенко С.А. МНТК «Микрохирургия глаза» им. академика С.Н. Федорова, Москва

Бугрова А.Е. Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, Москва

Вайншенкер Ю.И. Институт мозга человека им. Н.П. Бехтеревой РАН, Санкт-Петербург

Варфаломеев С.Д. Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, Москва

Васильев Д.С. Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН, Санкт-Петербург

Васильева Е.В. НИИ фармакологии им. В.В. Закусова РАМН, Москва

Ведунова М.В. Нижегородская государственная медицинская академия, Нижний Новгород

Векишин Н.Л. Институт биофизики клетки РАН, Пущино

Ветош А.Н. Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН, Санкт-Петербург

Виноградова Ю.В. Объединенный Институт ядерных исследований, Дубна

Волков В.В. Институт общей физики им. А.М. Прохорова РАН, Москва

Воробьева Н.Е. Институт биологии гена РАН, Москва

Габиров А.Г. Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва

Габова А.В. Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН, Москва

Гаврилова С.И. Научный центр психического здоровья РАМН, Москва

Галзитская О.В. Институт белка РАН, Пущино

Гарах Ж.В. Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН, Москва

Гареева А.Э. Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра РАН, Уфа

Георгиева С.Г. Институт биологии гена РАН, Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва

Герасименко Ю.П. Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН, Санкт-Петербург

Гехт А.Б. Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова, Москва

Гилязова И.Р. Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра РАН, Уфа

Глухих Д.О. Институт медико-биологических проблем РАН, Москва

Годухин О.В. Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино

Горайнов С.А. НИИ нейрохирургии им. Н.Н. Бурденко РАМН, Москва

Грачев П.В. Институт общей физики им. А.М. Прохорова РАН, Москва

Грецькая Н.М. Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва

Григорьев П.Н. Казанский государственный медицинский университет, Казань

Григорян Г.А. Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН, Москва

Гудкова А.А. Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова, Москва

Гуляев М.В. Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН, Москва

Гуляева Н.В. Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН, Москва

Гуревич И.Б. Вычислительный центр им. А.А. Дородницына РАН, Москва

Гусев Е.И. Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова, Москва

Дадаян А.К. Институт молекулярной генетики РАН, Москва

Дильмухаметова Л.К. Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, Москва

Дорохов В.Б. Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН, Москва

Дубровская Н.М. Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН, Санкт-Петербург

Евгеньев М.Б. Институт биофизики клетки РАН, Пущино

Евсеев О.В. Институт радиотехники и электроники им. В.А. Котельникова РАН, Москва

Екимова И.В. Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН Санкт-Петербург

Екимовский Г.А. Институт медико-биологических проблем РАН, Москва

Емельянов А.К. Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова, Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт», Гатчина, Санкт-Петербургский государственный университет им. акад. И.П. Павлова Минздрава России, Санкт-Петербургский академический университет — научно-образовательный центр нанотехнологий РАН, Санкт-Петербург

Жмак М.Н. Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва

Журавин И.А. Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН, Санкт-Петербург

Завалко И.М. Федеральный медико-биофизический центр им. А.И. Бурназяна ФМБА, Москва

Зайцев А.В. Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН, Санкт-Петербург

Залялова З.А. Казанский государственный медицинский университет, Казань

Зеленков П.В. НИИ нейрохирургии им. Н.Н. Бурденко РАМН, Москва

Земскова С.Н. Казанский государственный медицинский университет, Казань

Зефирова А.Л. Казанский государственный медицинский университет, Казань

Зинченко В.П. Институт биофизики клетки РАН, Пущино

Золотарев Ю. А. Институт молекулярной генетики РАН, Москва

Иваницкий А.М. Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН, Москва

Ивченко И.М. Институт мозга человека им. Н.П. Бехтеревой РАН, Санкт-Петербург

Иллариошкин С.Н. Научный центр неврологии РАМН, Москва

Иоффе М.Е. Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН, Москва

Исаев М.А. Институт общей физики им. А.М. Прохорова РАН, Москва

Исламов Р.Р. Казанский государственный медицинский университет, Казань

Казимирова Е.А. Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН, Москва

Казначеева Е.В. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург
Каламкаров Г.Р. Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, Москва
Карабанов А.В. Научный центр неврологии РАМН, Москва
Каримова Е.Д. Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН, Москва
Кашеверов И.Е. Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва
Ким К.Х. Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН, Санкт-Петербург
Киреева Т.Б. Институт проблем передачи информации им. А.А. Харкевича РАН, Москва
Киселев С.Л. Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, Москва
Ковалёв Г.И. НИИ фармакологии им. В.В. Закусова РАМН, Москва
Ковальзон В.М. Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова РАН, Москва
Козик В.С. Институт молекулярной генетики РАН, Москва
Козина Е.А. Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, Москва
Козлова Д.И. Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН, Санкт-Петербург
Колачева А.А. Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, Москва
Конаков М.В. Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино
Кондрахин Е.А. НИИ фармакологии им. В.В. Закусова РАМН, Москва
Константинова Т.С. Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, Москва
Корнилова Л.Н. Институт медико-биологических проблем РАН, Москва
Коротков А.Д. Институт мозга человека им. Н.П. Бехтеревой РАН, Санкт-Петербург
Королев М.С. Институт радиотехники и электроники им. В.А. Котельникова РАН, Москва
Королева А.В. Институт проблем лазерных и информационных технологий РАН, Шатура
Коришувова Е.С. Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова, Москва
Кочкина Е.Г. Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН, Санкт-Петербург
Красикова Р.Н. Институт мозга человека им. Н.П. Бехтеревой РАН, Санкт-Петербургский государственный университет, химический факультет, Санкт-Петербург
Краснов А.Н. Институт биологии гена РАН, Москва
Крюкова Е.В. Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва
Кудрин В.С. НИИ фармакологии им. В.В. Закусова РАМН, Москва
Кудрявцев Д.С. Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва
Кузнецова Г.Д. Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН, Москва
Кузьмина О.И. Казанский государственный медицинский университет, Казань

- Кулакова О.Г.** Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова, Москва
- Курганская М.В.** Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН, Москва
- Кухарский М.С.** Институт физиологически активных веществ РАН, Черноголовка
- Кучеряну В.Г.** НИИ общей патологии и патофизиологии РАМН, Москва
- Лагарькова М.А.** Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, Москва
- Лебедева Н.Н.** Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН, Москва
- Левик Ю.С.** Институт проблем передачи информации им. А.А. Харкевича РАН, Москва
- Левин С.Г.** Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино
- Леонова Е.И.** Институт физиологически активных веществ РАН, Черноголовка
- Леушина А.В.** Казанский государственный медицинский университет, Казань
- Лимборская С.А.** Институт молекулярной генетики РАН, Москва
- Липкин В.М.** Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва
- Лощенов В.Б.** Институт общей физики им. А.М. Прохорова РАН, Научно-исследовательский ядерный университет «МИФИ», Москва
- Лощенов М.В.** Институт общей физики им. А.М. Прохорова РАН, Научно-исследовательский ядерный университет «МИФИ», Москва
- Лукомская Н.Я.** Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН, Санкт-Петербург
- Луцекин В.С.** Центр психолого-медико-социального сопровождения детей и подростков «Северо-Запад», Москва
- Луцеккина Е.А.** Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН, Москва
- Магазаник Л.Г.** Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН, Санкт-Петербургский государственный университет, медицинский факультет, Санкт-Петербург
- Магжанов Р.В.** Башкирский государственный медицинский университет, Уфа
- Макаровский А.Н.** Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН, Санкт-Петербург
- Мальцев А.В.** Институт белка РАН, Пущино
- Мартынов А.В.** Казанский государственный медицинский университет, Казань
- Медведев С.В.** Институт мозга человека им. Н.П. Бехтерева РАН, Санкт-Петербург
- Мионов А.В.** Институт проблем лазерных и информационных технологий РАН, Шатура
- Митрошина Е.В.** Нижегородская государственная медицинская академия, Нижний Новгород
- Можяева Г.Н.** Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург
- Морозов А.А.** Институт радиотехники и электроники им. В.А. Котельникова РАН, Москва
- Мошонкина Т.Р.** Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН, Санкт-Петербург
- Муганцева Е.А.** Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино
- Мурашов А.Н.** Филиал Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Пущино

Муха Д.В. Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, Москва
Мухамедьяров М.А. Казанский государственный медицинский университет, Казань
Мухина И.В. Нижегородская государственная медицинская академия, Нижний Новгород
Мяжков А.А. Вычислительный центр им. А.А. Дородницына РАН, Москва
Наливаева Н.Н. Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН, Институт молекулярной и клеточной биологии, факультет биологических наук, Университет г. Лидс (Великобритания)
Наумов И.А. Институт медико-биологических проблем РАН, Москва
Некрасов Е.Д. Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, Москва
Нигматуллина Р.Р. Казанский государственный медицинский университет, Казанский институт биофизики и биохимии КазНЦ РАН, Казань
Нинкина Н.Н. Институт физиологически активных веществ РАН, Черноголовка
Новотоцкий-Власов В.Ю. Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН, Москва
Обухов К.Ю. Московский физико-технический институт, Долгопрудный
Обухов Ю.В. Институт радиотехники и электроники им. В.А. Котельникова РАН, Москва
Овчинников Р.К. Институт физиологически активных веществ РАН, Черноголовка
Оджомоко Л.О. Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва
Осипов М.Н. Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва
Островский М.А. Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, биологический факультет, Москва
Павлова Г.В. Институт биологии гена РАН, Москва
Пастухов Ю.Ф. Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН, Санкт-Петербург
Пасюкова Е.Г. Институт молекулярной генетики РАН, Москва
Плеснева С.А. Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН, Санкт-Петербург
Подлубная З.А. Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пушчинский государственный естественно-научный институт, Пушкино
Поминова Д.В. Институт общей физики им. А.М. Прохорова РАН, Москва
Пономаренко Н.А. Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва
Поплинская В.А. Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова, Москва
Попов В.К. Институт проблем лазерных и информационных технологий РАН, Шатура
Попов Г.Р. Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова, Москва
Потапов А.А. НИИ нейрохирургии им. Н.Н. Бурденко РАМН, Москва
Пронина Т.С. Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, Москва
Пчелина С.Н. Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова, Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт», Гатчина, Санкт-Петербургский государственный университет им. акад. И.П. Павлова

Минздрава России, Санкт-Петербургский академический университет — научно-образовательный центр нанотехнологий РАН, Санкт-Петербург

Ризванов А.А. Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань

Романов С.П. Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН, Санкт-Петербург

Рощина И.Ф. Научный центр психического здоровья РАМН, Москва

Рощина Н.В. Институт молекулярной генетики РАН, Москва

Рябова А.В. Институт общей физики им. А.М. Прохорова РАН, Научно-исследовательский ядерный университет «МИФИ», Москва

Рязанцева М.А. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург

Савельева Т.А. Институт общей физики им. А.М. Прохорова РАН, Научно-исследовательский ядерный университет «МИФИ», Москва

Савина Т.А. Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино

Сагалович В.Н. Институт медико-биологических проблем РАН, Москва

Саложин С.В. Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН, Москва

Саранцева С.В. Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова, Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт», Гатчина

Сахарнова Т.А. Нижегородская государственная медицинская академия, Нижний Новгород

Свинов М.М. Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН, Москва

Селезнева Н.Д. Научный центр психического здоровья, Москва

Семенова Н.А. Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, Москва

Симоненко А.В. Институт молекулярной генетики РАН, Москва

Сломинский П.А. Институт молекулярной генетики РАН, Москва

Сошникова Н.В. Институт биологии гена РАН, Москва

Степаничев М.Ю. Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН, Москва

Стрелец В. Б. Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН, Москва

Сушкова О.С. Институт радиотехники и электроники им. В.А. Котельникова РАН, Москва

Тернер Э. Дж. Институт молекулярной и клеточной биологии, факультет биологических наук, Университет г. Лидс (Великобритания)

Тимашев П.С. Институт проблем лазерных и информационных технологий РАН, Шатура

Тронов В.А. Институт химической физики им. Н.Н. Семенова РАН, Москва, Объединенный институт ядерных исследований, Дубна

Тросников М.В. Институт молекулярной генетики РАН, Москва

Трусова Ю.О. Вычислительный центр им. А.А. Дородницына РАН, Москва

Туманова Н.Л. Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН, Санкт-Петербург

Туровский Е.А. Институт биофизики клетки РАН, Пущино

Туровская М.В. Институт биофизики клетки РАН, Пущино

Тухбатова Г.Р. Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН, Москва

- Туховская Е.А.** Филиал Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Пущино
- Ублинский М.В.** Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, Москва
- Угрюмов М.В.** Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, Москва
- Усенко Т.С.** Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова, Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт», Гатчина, Санкт-Петербургский государственный университет им. акад. И.П. Павлова Минздрава России, Санкт-Петербург
- Устюгов А.А.** Институт физиологически активных веществ РАН, Черноголовка
- Уткин Ю.Н.** Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва
- Фаворова О.О.** Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова, Москва
- Фёдорова В.И.** Российский кардиологический научно-производственный комплекс Минздрава РФ, Москва
- Федорова Я.Б.** Научный центр психического здоровья, Москва
- Федосеева Т.С.** Казанский государственный медицинский университет, Казань
- Фельдман Т.Б.** Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, биологический факультет, Москва
- Филатова Е.В.** Институт молекулярной генетики РАН, Москва
- Филатова Е.Г.** Первый московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова, Клиника головной боли и вегетативных расстройств им. Александра Вейна, Москва
- Фролов А.А.** Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН, Москва
- Фролова М.С.** Институт биофизики клетки РАН, Пущинский государственный естественно-научный институт, Пущино
- Хабарова Е.В.** Институт медико-биологических проблем РАН, Москва
- Хаердинова О.Ю.** Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН, Центр психолого-медико-социального сопровождения детей и подростков «Северо-Запад», Москва
- Хакимова Г.Р.** Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, Москва
- Хидиятова И.М.** Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра РАН, Башкирский государственный университет, Уфа
- Холмогорова Н.В.** Московский государственный педагогический университет, Москва
- Хуснутдинова Э.К.** Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра РАН, Башкирский государственный университет, Уфа
- Хуторская О.Е.** Институт проблем управления им. В.А. Трапезникова РАН, Москва
- Цетлин В.И.** Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва
- Чеснокова А.Ю.** Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН, Санкт-Петербург
- Честков И.В.** Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, Москва
- Чичков Б.Н.** Институт проблем лазерных и информационных технологий РАН, Шатура

Шадрина М.И. Институт молекулярной генетики РАН, Москва
Шварцман А.Л. Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова, Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт», Гатчина
Шевченко Т.Ф. Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, Москва
Шелковникова Т.А. Институт физиологически активных веществ РАН, Черноголовка
Шелухина И.В. Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва
Шишкина Т.В. Нижегородская государственная медицинская академия, Нижний Новгород
Шлыков В.Ю. Институт проблем передачи информации им. А.А. Харкевича РАН, Москва
Щербакова Н.А. Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН, Санкт-Петербург
Щипакина Т.Г. Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино
Юсубалиева Г.М. Государственный научный центр социальной и судебной психиатрии им. В.П. Сербского Минздравсоцразвития РФ, Москва
Яковлева М.А. Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, Москва
Яшина В.В. Вычислительный центр им. А.А. Дородницына РАН, Москва

ПРЕДИСЛОВИЕ

Коллективная монография «Нейродегенеративные заболевания: от генома до целостного организма» посвящена одной из наиболее актуальных проблем современных нейронаук – нейродегенеративным заболеваниям. Для написания этой монографии впервые в России привлечен широкий круг специалистов практически всех направлений нейронаук – неврологии, психиатрии, физиологии, патофизиологии, нейрофизиологии, нейробиологии, нейроморфологии, молекулярной биологии, нейроэндокринологии, а также физики, химии и математики, которые изложили современные представления о причинах, механизмах развития, диагностике и лечении нейродегенеративных заболеваний. К этим социально значимым и до настоящего времени фатальным заболеваниям в первую очередь относятся болезнь Паркинсона и болезнь Альцгеймера, которые не только мучительны для больных, но и ложатся тяжелым финансовым бременем на общество.

Особое внимание в монографии уделено проблеме, которая волнует весь мир – действительно ли нейродегенеративные заболевания являются неизлечимыми или их фатальность обусловлена нашим недостаточным знанием их патогенеза и вследствие этого использованием малоэффективных методов диагностики и лечения. Учитывая то обстоятельство, что нейродегенеративные заболевания за счет включения механизмов пластичности мозга длительное время развиваются бессимптомно, важнейшей задачей, решаемой в развитых странах, является разработка доклинической (досимптомной) диагностики нейродегенеративных заболеваний и их превентивного лечения с целью замедления гибели нейронов и, таким образом, продления периода комфортной (бессимптомной) жизни потенциального больного.

Особенностью этой монографии является то, что ее авторы – высококвалифицированные сотрудники почти тридцати институтов РАН, которые являются участниками виртуального мультидисциплинарного консорциума и в течение почти десяти лет проводят совместные исследования по Программе Президиума РАН «Фундаментальные науки – медицине».

Созданная в 2002 году Программа «Фундаментальные науки – медицине» явилась практической реализацией идеи наших предшественников – крупных ученых, организаторов науки и здравоохранения – академиков А.П. Александрова, Б.В. Петровского и Н.Н. Блохина, которые перед «перестройкой» возглавляли АН СССР, МЗ СССР и АМН СССР. Предполагалось, что основной задачей такого рода программы будет привлечение широкого круга ученых к решению актуальных задач здравоохранения.

Однако сложная экономическая ситуация в стране позволила претворить эту идею в жизнь только в начале нового столетия. Одним из инициаторов создания

Программы, ее идеологом и бессменным председателем Научного Совета до конца своей жизни был академик О.Г. Газенко (1918–2007).

За более чем десятилетний период существования Программа претерпела существенную эволюцию на пути поиска оптимальных механизмов организации сотрудничества ученых различных дисциплин. В первые годы Программа финансировала разрозненные проекты, в которых принимали участие ученые трех из девяти отделений РАН. Со временем руководителями программы была предпринята попытка сгруппировать разрозненные проекты по наиболее приоритетным направлениям развития медико-биологических наук в интересах здравоохранения. Так, например, было сформировано направление «Исследования мозга – фундаментальные и прикладные аспекты» (координатор – академик М.В. Угрюмов). К реализации крупных проектов были привлечены ученые из восьми отделений РАН. При этом наряду с биологами в Программу вошли физики, химики, математики и специалисты в области информационных технологий. Для отбора проектов на конкурсной основе и их реализации наряду с учеными РАН были привлечены ведущие специалисты других ведомств, которые по существу являются заказчиками и потребителями продукции Программы – новых технологий диагностики и лечения, новых лекарственных средств и др.

Целью данной коллективной монографии участников Программы «Фундаментальные науки – медицине» являются обобщение и анализ имеющихся данных, обсуждение новых идей и совместных достижений авторов одного из приоритетных направлений современной медицины – нейродегенеративных заболеваний.

Вице-президент
Российской академии наук,
Координатор Программы Президиума РАН
«Фундаментальные науки – медицине»

академик РАН А.И. Григорьев

ПРЕДИСЛОВИЕ

Коллективная монография «Нейродегенеративные заболевания: от генома до целостного организма» посвящена одной из наиболее актуальных проблем современной нейронауки – неврологии, нейрохирургии и психиатрии – изучению и борьбе с хроническими нейродегенеративными заболеваниями на основе последних достижений трансляционной, персонализированной и профилактической медицины. В монографии в основном речь идет о наиболее тяжелых нейродегенеративных заболеваниях – болезни Паркинсона и болезни Альцгеймера. Несмотря на огромные усилия и средства, затрачиваемые на лечение и реабилитацию больных, оба заболевания приводят к инвалидизации и летальному исходу. Действительно, несмотря на то что болезнь Паркинсона была впервые описана как нозологическая форма почти двести лет назад, а болезнь Альцгеймера немного более ста лет назад, они до сих пор остаются фатальными.

Уже сейчас число больных, страдающих только болезнью Паркинсона и болезнью Альцгеймера, в мире равняется примерно 40 млн., а через 10–15 лет, по прогнозу ВОЗ, превысит 100 млн. Поэтому неслучайно на ведущих научных, клинических и даже политических форумах эта проблема представляется как одна из наиболее приоритетных, а для ее решения созданы национальные и международные мультидисциплинарные программы в США, в Евросоюзе, КНР. В России уже почти десять лет изучение нейродегенеративных заболеваний проводится в рамках программы Президиума Российской академии наук «Фундаментальные науки – медицине». В состав российского консорциума входит широкий круг высококвалифицированных специалистов – неврологи, психиатры, нейрофизиологи, физиологи, биохимики, молекулярные биологи и генетики, генные инженеры, фармакологи, химики, физики и математики – специалисты в области информационно-компьютерных технологий, которые работают более чем в 35 организациях РАН, РАМН и МЗ РФ.

В монографии дается глубокий анализ последних достижений, в том числе и участников российского консорциума, в области познания факторов риска возникновения нейродегенеративных заболеваний и молекулярных механизмов их патогенеза. Эти данные позволяют объяснить малую эффективность современных методов лечения нейродегенеративных заболеваний тем, что они диагностируются на основе появления характерных драматических симптомов – нарушения двигательной функции при болезни Паркинсона, потере памяти и нарушения социальной адаптации при болезни Альцгеймера – только через много лет после начала патологического нейродегенеративного процесса. К этому моменту погибает большая часть регуляторных нейронов, т.е. уже практически отсутствуют мишени для лечения.

Исходя из современных представлений о молекулярных механизмах и динамике патогенеза нейродегенеративных заболеваний, создана принципиально новая концепция развития данного направления, в основе которой лежит создание доклинической диагностики – задолго до появления характерных драматических симптомов, и превентивного нейропротекторного лечения, направленного на значительное замедление гибели специфических нейронов. В случае успеха доклиническую стадию, т.е. период комфортной жизни больного, удастся продлить на многие годы.

Особое внимание авторы монографии обращают на то, что наряду с нейропротекторной фармакотерапией в отдаленной перспективе, возможно, могут быть разработаны и принципиально новые технологии, основанные на использовании генно-инженерных конструкций, несущих гены нейропротекторов, или клеточные технологии, предполагающие использование стволовых или генно-модифицированных клеток. При этом доставку генно-инженерных конструкций и модифицированных клеток будут обеспечивать нейрохирурги – специалисты в области функциональной хирургии.

Таким образом, данная коллективная монография является уникальным трудом, обобщающим современные достижения – мировые и самих авторов, в области разработки принципиально новых подходов к диагностике и лечению нейродегенеративных заболеваний и вселяет надежду на то, что эти заболевания в скором времени перейдут из разряда фатальных в разряд излечиваемых.

Директор Института нейрохирургии
им. академика Н.Н. Бурденко РАМН

академик РАН *А.Н. Коновалов*

Трансляционная, персонализированная и профилактическая медицина как основа для борьбы с нейродегенеративными заболеваниями

М.В. Угрюмов

Содержание

1. Эпидемиология и фармакоэкономика нейродегенеративных заболеваний
2. Этиология и патогенез нейродегенеративных заболеваний
3. Создание доклинической диагностики нейродегенеративных заболеваний
 - 3.1. Клинические исследования
 - 3.1.1. Перспективы использования неинвазивных нейровизуализационных методов для доклинической диагностики нейродегенеративных заболеваний
 - 3.1.2. Перспективы использования клинических показателей и периферических биомаркеров для создания комплексной доклинической диагностики нейродегенеративных заболеваний
 - 3.2. Использование экспериментального моделирования для создания доклинической диагностики нейродегенеративных заболеваний
4. Разработка превентивной терапии на доклинической стадии нейродегенеративных заболеваний
5. Заключение

1. Эпидемиология и фармакоэкономика нейродегенеративных заболеваний

Десятки миллионов людей в мире и миллионы в России страдают хроническими нейродегенеративными заболеваниями (НДЗ), к которым относятся болезнь Паркинсона (БП), болезнь Альцгеймера (БА), хорея Гентингтона, гиперпролактинемия и многие другие (Голубев и др., 1999; Шток и др., 2002; Гусев и др., 2004; Левин, Федорова, 2006; Гаврилова, 2007; Тиганов, 2008; Гусев, Гехт, 2010; Угрюмов, 2010а; Федорова, Никитина, 2012; Гехт, Попов, 2014; Selkoe, 2001; Serry et al., 2003; Marras, Tanner, 2004). Ключевым звеном патогенеза этих заболеваний является гибель специализированных нейронов, что со временем приводит к нарушению функций, в регуляции которых они участвуют. Так, при БП дегенерируют

Сокращения: БА – болезнь Альцгеймера; БП – болезнь Паркинсона; ДА – дофамин, ДА-ергические, дофаминергические; L-ДОФА, L – диоксифенилаланин; МРТ – магнитнорезонансная томография; МФТП – 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридин; МФП+ – 1-метил-4-фенилпиридиний; НДЗ – нейродегенеративное заболевание; ПЭТ – позитронно-эмиссионная томография; ЧС – черная субстанция.

дофаминергические (ДА-ергические) нейроны nigrostriatной системы мозга, что приводит к нарушению двигательной функции, при БА в первую очередь погибают холинергические нейроны гиппокампа и коры, и это сопровождается нарушением памяти, потерей способности к обучению и социальной дезадаптацией, при гиперпролактинемии погибают ДА-ергические нейроны гипоталамуса и при этом в молодом возрасте нарушается репродуктивная функция (Иллариошкин, 2003; Угрюмов, 2010а,б; Fahn, 2008; Raff et al., 2002; Sandyk et al., 1987). Несмотря на огромные усилия, направленные на повышение эффективности лечения больных при НДЗ, до сих пор ни одного больного в мире не было вылечено.

НДЗ быстро прогрессируют, что заканчивается инвалидизацией и летальным исходом. По данным Всемирной Организации Здравоохранения, в 2009 г. только БП и БА в мире страдало более 40 миллионов человек, а к 2040 г. их число может превысить 100 миллионов. Только в США насчитывается 5,2 млн. человек с БА и 1,2 млн. с БП (Sharma et al., 2013; Thies, Bleiler, 2013; Overk, Masliah, 2014). Быстрый рост числа больных объясняется в первую очередь увеличением продолжительности жизни населения развитых стран. Так, например, число больных с БА увеличивается с возрастом по экспоненте от 3% среди населения в возрасте 65–74 года, до 19% в возрасте 75–84 года и до 47 % среди населения старше 85 лет (Han, Han, 2014). Считается, что быстрый рост числа больных обусловлен не только увеличением продолжительности жизни, но и другими факторами, например повышением уровня загрязнения окружающей среды (химические токсины, возбудители инфекций), хроническим стрессом, в первую очередь социальным, а также по непонятным причинам «омоложением» НДЗ (Chen et al., 2013).

Не только БА, но и большинство других НДЗ на определенном этапе развития сопровождаются появлением деменции, характеризующейся нарушением памяти и социальной дезадаптацией (Успенская и др., 2010; Яхно и др., 2012). По данным Всемирной Организации Здравоохранения и Международной ассоциации обществ по болезни Альцгеймера («Alzheimer's Disease International»), общее число больных в мире, страдающих деменцией, в 2013 г. составило 44,5 млн. чел., причем по прогнозу к 2030 г. возрастет до 75,5 млн. чел., а к 2050 г. до 135,5 млн. чел. (Bekris et al., 2010; Carrillo et al., 2013). В России число больных, страдающих деменцией, колеблется от 1,4 до 1,8 млн. чел. (Гаврилова, 2003).

Лечение и реабилитация больных ложатся тяжелым финансовым бременем на общество и государство. Так, в развитых странах на лечение и реабилитацию одного больного в год расходуется до 38 тыс. долларов, а общие ежегодные затраты на больных, страдающих деменцией, только в США превышают 200 млрд. долларов (Holmes, Diamond, 2014), что, к примеру, сопоставимо с расходной частью бюджета ряда развитых стран. Несмотря на огромные инвестиции в лечение БП и БА, продолжительность жизни больных после постановки диагноза обычно не превышает 10 лет (Bekris et al., 2010; De Munter et al., 2014).

Борьба с нейродегенеративными заболеваниями включена в список глобальных «вызовов», стоящих перед человечеством в XXI веке, на наиболее авторитетных научных и научно-политических форумах, таких как ежегодный форум в Киото (Япония) «Науки и технологии в обществе» (2012–2014 гг.), на последних саммитах

(2013 г.) с участием России министров образования и науки, министров здравоохранения и президентов Академий наук, стран «большой восьмерки». Для решения этой задачи были созданы финансируемые мультидисциплинарные программы в США («Национальные Институты Здоровья»), в Евросоюзе и в России (программа Президиума РАН «Фундаментальные науки – медицине») и созданы специализированные мультидисциплинарные Центры мозга – во Франции, США, Германии и других развитых странах. Есть все основания полагать, что бурное развитие трансляционной, персонализированной и профилактической медицины позволит в ближайшей перспективе определить новые молекулярные мишени для лечения НДЗ на основе изучения механизмов патогенеза, оценить индивидуальные особенности развития заболеваний и внести соответствующие коррективы в патогенетическую терапию на основе генетического анализа, а также в случае создания ранней – доклинической диагностики разработать превентивное нейропротекторное лечение вскоре после начала патологического процесса.

2. Этиология и патогенез нейродегенеративных заболеваний

Вопрос об этиологии НДЗ до сих пор остается нерешенным, хотя считается, что к факторам риска относятся генетическая предрасположенность, обусловленная мутациями генов белков, играющих важную роль в нормальном функционировании нейронов. Это может приводить к нарушению их метаболизма, например, в результате увеличения синтеза, нарушения ферментативной деградации, изменения конформации, а в конечном счете – к накоплению и агрегации растворимых олигомерных фибриллярных комплексов, оказывающих токсическое влияние на нейроны (Jack et al., 2014; Overk, Masliah, 2014). При этом мутации в генах α -синуклеина, паркина и убиквитин карбоксил-терминальной гидролазы при определенных условиях могут приводить к развитию БП, а мутации в генах предшественника амилоидного пептида, пресенилинов 1 и 2, аполипопротеина Е и тау-белка – к развитию БА (Сломинский и др., 2003; Ross et al., 2008; Williamson et al., 2009; Bekris et al., 2010; Over, Masliah, 2014). Важно подчеркнуть, что подавляющее большинство НДЗ являются полигенными. В последние годы показано, что патологические белки, образующиеся в нейронах при НДЗ, в первую очередь агрегированные альфа-синуклеин и тау-белок, могут секретироваться одними нейронами и захватываться в другие. Это приводит к распространению нейродегенеративного процесса по мозгу прионоподобным способом (Kalia et al., 2013; Holmes, Diamond, 2014).

Патогенез НДЗ характеризуется рядом принципиально важных особенностей. Во-первых, они развиваются в течение длительного времени (до тридцати лет) без проявления драматических симптомов, характерных для каждого конкретного заболевания, т.е. на доклинической (асимптомной или досимптомной) стадии (Carrillo et al., 2013; Sutphen et al., 2014). Во-вторых, характерные для НДЗ симптомы появляются только при определенной «пороговой» потере специфических нейронов, обычно после гибели большей части нейронов. При этом заболевание переходит в клиническую стадию. Пока точные пороговые значения определены только

для БП – потеря 50–60% тел ДА-ергических нейронов в черной субстанции (ЧС), 70–80% их аксонов и ДА в стриатуме (Bernheimer et al., 1973). В третьих, нейродегенеративный процесс не ограничивается областями мозга, деградация которых приводит к специфическим драматическим последствиям, например к нарушению двигательной функции при БП, памяти и социальной адаптации при БА. Так, при БП, наряду с нигростриатными ДА-ергическими нейронами, участвующими в регуляции двигательной функции, возникает функциональная недостаточность и ДА-ергических нейронов в других отделах мозга, в частности в тубероинфундибулярной системе гипоталамуса – центре нейроэндокринных регуляций (Sandyk et al., 1987). Дегенерации также подвержены нейроны, вырабатывающие и другие классические нейротрансмиттеры – норадренергические нейроны в голубом пятне ствола мозга и серотонинергические нейроны в ядре шва (Halliday et al., 1990; Jellinger, 1991; Petrucelli, Dickson, 2008; Allen et al., 2013; Bezard et al., 2013). Четвертой особенностью патогенеза НДЗ является то, что гибель нейронов начинается за пределами отделов мозга, ответственных за регуляцию функций, нарушение которых приводит к драматическим последствиям (Magen, Chesselet, 2010). При этом обнаружен определенный временной градиент распространения нейродегенеративного процесса по мозгу. Так, при БП он начинается одновременно в ростральном и каудальном отделах мозга – соответственно в обонятельных луковицах и в дорсальном моторном ядре вагуса (Mahlknecht, Poewe, 2013). Далее этот патологический процесс распространяется последовательно на переднее обонятельное ядро, латеральный промежуточный столб спинного мозга, голубое пятно, и только после этого погибают ДА-ергические нейроны нигростриатной системы, ответственные за регуляцию двигательной функции. При этом процесс гибели нейронов мозга не останавливается – он продолжает распространяться на базальные отделы переднего мозга (гипоталамус и др.), неокортекс, особенно лимбическую кору и мультимодальную ассоциативную кору лобной и височной долей (Braak et al., 2004; Klos et al., 2006; Akhtar, Stern, 2012; Bezard et al., 2013). Пятой особенностью патогенеза НДЗ является то, что нейродегенеративный процесс не ограничивается мозгом, а распространяется на периферическую нервную систему. Так, при БП погибают нейроны, иннервирующие сердце, желудочно-кишечный тракт, слюнные железы, надпочечники и ряд других внутренних органов (Perkin, 1981; Hague et al., 1997; Goldstein et al., 2000; Braak et al., 2004; Chen et al., 2013; Mahlkecht, Poewe, 2013). И наконец, к шестой особенности патогенеза НДЗ следует отнести появление клинических признаков-предвестников НДЗ на доклинической стадии, т.е. до того как появляются симптомы, характерные для данного НДЗ. Появление этих предвестников является следствием нейродегенеративного процесса в центральной и периферической нервной системе, предшествующего гибели нейронов в тех отделах мозга, которые являются ключевым звеном патогенеза НДЗ, например, нигростриатных ДА-ергических нейронов при БП и холинергических нейронов гиппокампа при БА (подробнее см. «Маркеры доклинической стадии НДЗ»; Halliday et al., 2011; Siderowf, 2012; Sharma et al., 2013).

В основе патогенеза НДЗ лежат два сопряженных процесса – прогрессирующая гибель нейронов и компенсация их функциональной недостаточности. Нейродеге-

неративный процесс в мозге запускается эндогенными токсическими факторами, причем одни из них неспецифичны, т.е. оказывают токсическое влияние на многие популяции нейронов, а другие – специфичны, т.к. обладают высоким сродством к строго определенным популяциям нейронов. Предполагается, что дегенерация нейронов под влиянием эндогенных нейротоксинов при НДЗ начинается с деградации синаптических терминалей и нарушения межнейрональной сигнализации – нейротрансмиссии (Jack et al., 2014; Overk, Masliah, 2014). За этим следует деградация постсинаптических структур – шипиков, и ретроградная деградация аксонов, которая заканчивается деградацией тел нейронов (Carrillo et al., 2013; Overk, Masliah, 2014).

К основным неспецифическим нейротоксинам относятся растворимые агрегированные олигомерные фибриллярные белки, в первую очередь альфа-синуклеин при БП и бета-амилоид при БА (McKeith et al., 2004; Petrucelli, Dickson, 2008; Carrillo et al., 2013). Существенную роль в дегенерации нейронов при БП и БА играет также тау-белок в олигомерной форме (Overk, Masliah, 2014). Специфичные эндогенные нейротоксические факторы выделены пока только при БП. К ним относится N-метил(R)салсолинол, образующийся с помощью фермента N-метилтрансферазы из (R)салсолинола, а тот, в свою очередь, образуется из ДА и ацетальдегида (Maruyama et al., 1992). Обладая структурным сходством с ДА, N-метил(R)салсолинол захватывается в ДА-ергические нейроны с помощью мембранного переносчика ДА, вызывая разобщение окислительного фосфорилирования и оксидативный стресс, что и приводит к гибели нейронов (Maruyama et al., 1992; Scheider et al., 2008). Косвенным доказательством участия этого токсина в дегенерации нигростриатных ДА-ергических нейронов является его высокое содержание в ликворе и в нигростриатной системе у пациентов при БП (Naoi et al., 1997).

Нейродегенерация сопровождается и усиливается локальным воспалительным процессом в мозге, в который вовлечены глиальные клетки – микроглия и астроглия. Однако пока остается невыясненным, развивается ли воспалительный процесс в ответ на гибель нейронов или сам воспалительный процесс провоцирует гибель нейронов. Скорее всего, происходит и то, и другое (Hirsch et al., 2012; Perry, Holmes, 2014).

При НДЗ в ответ на начавшуюся нейродегенерацию включаются новые или активируются постоянно функционирующие механизмы пластичности мозга, направленные в первую очередь на компенсацию функциональной недостаточности погибших нейронов. Именно включение этих механизмов обуславливает длительное развитие НДЗ без проявлений специфических симптомов, т.е. на доклинической стадии (Zigmond, 1997; Bezard, Gross, 1998; Bergstrom, Garris, 2003; Bezard et al., 2003; Ugrumov, 2008). Так, при БП, несмотря на прогрессирующую дегенерацию ДА-ергических нейронов, еще долгое время сохраняется нормальный дофаминовый ингибиторный контроль холинергических нейронов и гамма-аминомасляная кислота-продуцирующих нейронов в стриатуме, опосредованный постсинаптическими D2 рецепторами (Zigmond, 1997). Это обеспечивается включением двух последовательных, пока еще в определенной степени гипотетических каскадов компенсаторных процессов. Первый каскад в течение некоторого времени

приводит к поддержанию межклеточной концентрации ДА в стриатуме на уровне нормы за счет: (а) увеличения синтеза и выделения ДА в сохранившихся нейронах, (б) снижения экспрессии мембранного переносчика ДА и обратного захвата ДА, (в) снижения активности ферментов деградации (Zigmond, 1997; Bezard, Gross, 1998; Bezard et al., 2003). Кроме того, нами был открыт еще один механизм нейропластичности – совместный синтез ДА недофаминергическими нейронами, экспрессирующими по одному из ферментов синтеза этого нейротрансмиттера – тирозингидроксилазу или декарбоксилазу ароматических L-аминокислот (Ugrumov, 2013). В этом случае L-тирозин в нейронах, содержащих только тирозингидроксилазу, превращается в L-диоксифенилаланин (L-ДОФА), который выделяется в межклеточную среду и захватывается с помощью мембранного переносчика крупных нейтральных L-аминокислот в нейроны, содержащие только декарбоксилазу ароматических L-аминокислот, где и синтезируется ДА (Ugrumov et al., 2004, 2014; Ugrumov, 2008, 2009, 2013).

По мере дегенерации ДА-ергических нейронов наступает момент, когда, несмотря на компенсаторные процессы первого каскада, концентрация ДА в межклеточной среде снижается до уровня, при котором он уже не в состоянии оказывать физиологическое влияние на нейроны-мишени. В этом случае включается второй каскад компенсаторных процессов – повышается чувствительность нейронов-мишеней стриатума к ДА за счет увеличения экспрессии D₂ рецепторов («up regulation»). При этом нейроны продолжают адекватно реагировать на нейротрансмиттер, несмотря на его относительно низкую концентрацию (Bezard, Gross, 1998; Bezard et al., 2003).

Наряду с описанными специфическими компенсаторными процессами, направленными на поддержание нейротрансмиссии на уровне нормы, существуют и неспецифические компенсаторные процессы. К первому типу относится усиление секреции эндогенных нейропептидов – ростовых или нейротрофических факторов, действие которых направлено на предотвращение гибели нейронов и на стимуляцию репаративных процессов, в частности – разрастание аксональных отростков сохранившихся нейронов и увеличение числа синаптических контактов (Allen et al., 2013; Jack et al., 2014).

Ко второму типу компенсаторных процессов относится активация эндогенных антиоксидантных систем. Их действие направлено на предотвращение или минимизацию оксидативного стресса – конечной причины гибели любой клетки, включая нейроны (Danta, Piplani, 2014). К третьему типу относится захват из межклеточного пространства в глиальные клетки – микроглию и астроглию и ферментативное разрушение агрегированных патологических белков (Holmes, Diamond, 2014).

3. Создание доклинической диагностики нейродегенеративных заболеваний

Из современных представлений о патогенезе НДЗ следует, что драматические симптомы, характерные для каждого из заболеваний, появляются только после почти

полной деградации ключевых регуляторных нейронов и «истощения» компенсаторных резервов мозга. Это означает, что лечение больного начинается на той стадии заболевания, когда уже практически отсутствуют мишени для фармакотерапии (Sharma et al., 2013). Неудивительно, что на этом фоне все попытки лечения не приводят к излечиванию больных. Отсюда следует необходимость создания доклинической диагностики – задолго до появления характерных для каждого НДЗ драматических симптомов, и разработки нейропротекторной терапии, направленной на остановку или хотя бы на значительное замедление гибели нейронов (Ugumov, 2008; Lang et al., 2012; Carrillo et al., 2013). Если период гибели нейронов до порогового уровня, после которого появляются характерные симптомы, удастся продлить на многие годы, заболевание будет протекать на доклинической стадии и больные не будут испытывать дискомфорта до конца жизни, умирая от причины, не зависящей от НДЗ. Специальные расчеты показали, что если удалось бы продлить доклиническую стадию БА всего на пять лет, то число больных, страдающих деменцией, сократилось бы на 57%, а расходы на лечение и реабилитацию почти вдвое (Sperling et al., 2011).

3.1. Клинические исследования

3.1.1. Перспективы использования неинвазивных нейровизуализационных методов для создания комплексной доклинической диагностики нейродегенеративных заболеваний

В настоящее время уже имеются технические возможности для диагностирования НДЗ на доклинической стадии с помощью неинвазивных нейровизуализационных методов – позитронно-эмиссионной томографии (ПЭТ) и однофотонной эмиссионной компьютерной томографии. Эти методы позволяют оценить функциональное состояние специфических нейронов и уровень нейротоксинов в строго определенных отделах мозга, деградация которых приводит к развитию НДЗ (Niethammer et al., 2012). Для этого используют специфичные или относительно специфичные короткоживущие радиоактивно меченные молекулярные маркеры. К специфичным маркерам относятся предшественники синтеза дефицитных нейротрансмиттеров, например ДА при БП или ацетилхолина при БА, лиганды мембранных переносчиков моноаминовых нейротрансмиттеров и рецепторов. К относительно специфичным маркерам относятся предшественники молекул альфа-синуклеина при БП и бета-амилоида при БА, которые в агрегированном состоянии являются нейротоксинами (DeKosky, Marek, 2003; Fahn, 2008; Mosconi et al., 2010; Nelson et al., 2012; Niethammer et al., 2012; Kalia et al., 2013; Sperling, Johnson, 2013). Постепенное снижение функциональной активности нейронов, регистрируемое по специфичным маркерам, и накопление патологических белков, регистрируемое по относительно специфичным маркерам, могут рассматриваться как убедительное доказательство развития НДЗ. Некоторые особенности патогенеза НДЗ могут существенно повысить достоверность диагностики с помощью нейровизуализационных

методов. Так, при БП ДА-ергическая денервация стриатума асимметрична, потому что объясняется либо тем, что нейродегенеративный процесс в одном полушарии мозга начинается раньше, чем в другом, либо тем, что нейродегенерация в одном полушарии развивается быстрее, чем в другом (Niethammer et al., 2012).

В меньшей степени, чем ПЭТ, для доклинической диагностики НДЗ может быть использована магнитно-резонансная томография (МРТ), позволяющая, в первую очередь, количественно оценивать размеры структур мозга. Так, на доклинической стадии БА – за четыре года до появления характерных симптомов, с помощью МРТ была обнаружена атрофия базальных отделов переднего мозга и энторинальной области коры мозга (Hall et al., 2008). Кроме того, с помощью функциональной МРТ при НДЗ по гемодинамике удастся определить снижение функциональной активности отделов мозга, участвующих в регуляции специфических функций, а в сочетании со спектроскопией – накопление железа в ЧС при БП (Sharma et al., 2013; Sutphen et al., 2014). Помимо ПЭТ и МРТ существуют и другие неинвазивные методы, например транскраниальная сонография, с помощью которой при БП обнаружена повышенная эхогенность черной субстанции за счет накопления железа (Agarwal, Stoessl, 2013). Однако, в отличие от ПЭТ и МРТ, другие подходы не являются универсальными и характеризуются более низкой чувствительностью.

Учитывая необходимость больших финансовых затрат на приобретение и эксплуатацию ПЭТ, создания специальных технических условий для их использования (радиохимическая лаборатория, циклотрон и др.), очевидно, что неинвазивные нейровизуализационные методы даже в самых развитых и богатых странах не могут быть использованы при диспансеризации здорового населения, а доступны для обследования лишь ограниченного числа людей (Sharma et al., 2013). Поэтому необходимым условием разработки диагностики НДЗ на доклинической стадии является поиск клинических признаков-предвестников и периферических эндогенных биомаркеров, легко доступных для анализа, в процессе диспансеризации здорового населения. При обнаружении таких биомаркеров может быть создана группа риска для окончательного диагностирования НДЗ на доклинической стадии с помощью ПЭТ и МРТ. Перспективность использования описанной идеологии и методологии разработки комплексной доклинической диагностики была отчасти продемонстрирована на обезьянах при моделировании у них паркинсонизма с помощью нейротоксина ДА-ергических нейронов. У этих животных в отсутствие нарушений моторного поведения в стриатуме с помощью ПЭТ было обнаружено снижение функциональной активности нигростриатной ДА-ергической системы (Prunier et al., 2003).

3.1.2. Перспективы использования клинических показателей и периферических биомаркеров для создания комплексной доклинической диагностики нейродегенеративных заболеваний

Патологический процесс при НДЗ распространяется на многие отделы головного мозга и на периферическую нервную систему, что приводит к нарушению

функционирования внутренних органов – эндокринных желез, сердечно-сосудистой системы, желудочно-кишечного тракта, к изменению экспрессии генов и фенотипа клеток крови, а также к изменению состава гуморальных сред организма – ликвора и плазмы крови. Все эти изменения при количественной оценке могут использоваться в качестве клинических показателей и периферических биомаркеров развития НДЗ. Учитывая то, что до сих пор НДЗ невозможно диагностировать на доклинической стадии, поиск этих биомаркеров осуществляется у больных на ранней клинической стадии, т.е. сразу же после появления специфических симптомов, но до начала специфического лечения. Предполагается, что по крайней мере часть маркеров, выявленных на ранней клинической стадии НДЗ, также характерна и для доклинической стадии.

Выявленные биомаркеры НДЗ можно подразделить на три типа – клинические, биохимические и молекулярно-биологические.

Клинические показатели. К клиническим показателям, которые в перспективе могут быть использованы в комплексной диагностике НДЗ на доклинической стадии, относятся нарушения функций, не характерные для НДЗ и развивающиеся в соответствии с временным и пространственным градиентами распространения нейродегенеративного процесса в пределах центральной и периферической нервной системы. Часть таких показателей можно выявить при анализе истории болезни (сбор анамнеза), предшествующей появлению характерных симптомов, т.е. на доклинической стадии. Часть показателей можно идентифицировать при обследовании больного на ранней клинической стадии до начала лечения. Так, при БП уже за много лет до появления нарушений двигательной функции, т.е. на доклинической стадии, наблюдаются такие клинические признаки-предвестники, как замедленная походка, сгорбленность, тихая речь, бедная мимика, ухудшение почерка, депрессия, чувство тревоги, утомляемость, запоры, нарушения сна, обоняния и терморегуляции, ортостатическая гипотония, ослабление потенции и, наконец, болевая симптоматика, которая обычно ошибочно принимается за дисфункционально-болевой мышечно-лицевой синдром, радикулопатии или периферические нейропатии (Perkin, 1981; Tetrud, 1991; Doty et al., 1995; Hawkes et al., 1997; Goldstein et al., 2000; Abbott et al., 2001; Braak et al., 2006; Langston, 2006; Goldstein, Sewell, 2009; Mahlknecht, Poewe, 2013; Sharma et al., 2013). К клиническим признакам БА на доклинической и ранней клинической стадии относят: затруднение в получении новых знаний и в овладении новыми навыками, затруднение в воспроизведении имен или названий, в запинке в начале слова, в ухудшении подчерка и в целом в депрессивном состоянии – апатии и тревожности (Adler, 2011; Sperling et al., 2011; Carrillo et al., 2013).

Поскольку патологические процессы при НДЗ, предшествующие или развивающиеся одновременно с дегенерацией специфических нейронов, охватывают многие отделы нервной системы, далеко не все патогенетические механизмы пока изучены. Тем не менее, некоторые из них можно объяснить, например, быстрое движение глазных яблок в фазе сна – маркер доклинической стадии БП (Schenk et al., 1996), обусловлено патологией ядер нижнего отдела ствола мозга (Boeve et al.,

2007); гибель нейронов в области обонятельных луковиц мозга приводит к нарушению обоняния на доклинической стадии при БП и БА (Adler, 2011).

Перспективность использования клинических показателей для создания комплексной диагностики НДЗ на доклинической стадии подтверждается пока еще единичными примерами, например диагностирования БП на доклинической стадии на основе выявления функциональной недостаточности нигростриатных ДА-ергических нейронов с помощью ПЭТ в сочетании с нарушением обоняния и наличием синдрома десимпатизации сердца (Berendse et al., 2001; Goldstein, 2003). Важно отметить, что клинические признаки НДЗ являются несколько специфичными (DeKosky, Marek, 2003), т.к. каждый из них может проявиться не только при данном НДЗ, но и при других неврологических или психических заболеваниях. Так, например, быстрое движение глазных яблок в фазе сна может служить показателем доклинической стадии не только при БП, но и при других НДЗ, сопровождающихся деменцией (Boeve et al., 2007). Другим примером является гиперпролактинемия, возникающая у больных при БП в результате функциональной недостаточности ДА-ергических нейронов тубероинфундибулярной системы гипоталамуса. Однако гиперпролактинемия может возникать и при других видах патологии, например при нарушении чувствительности лактотрофов к ДА. Поэтому группы риска могут создаваться только на основе совокупности нескольких относительно специфичных клинических признаков.

Периферические биомаркеры. Важнейшей составляющей комплексной диагностики НДЗ на доклинической стадии являются эндогенные периферические биомаркеры в виде изменения: электрической активности мозга и мышц (при БП), которые удастся идентифицировать только с помощью специального математического аппарата (см. с. 177–193, 194–202). К биомаркерам также относятся изменения экспрессии генов и фенотипа клеток крови, а также компонентов плазмы крови и ликвора, включая физиологически активные вещества и их метаболиты. Хотя поиск этих биомаркеров может осуществляться только на ранней клинической стадии, полагают, что, по крайней мере отчасти, они также характерны и для доклинической стадии. Наиболее перспективным является поиск эндогенных биомаркеров в гуморальных средах – в ликворе и в крови (Naoi et al., 1997; DeKosky, Marek, 2003; Formichi et al., 2006; Bailey, 2007; Eller, Williams, 2009), поскольку изменения в их составе отражают патологические процессы, происходящие в мозге, в периферической нервной системе и во внутренних органах. Наиболее перспективным направлением поиска биомаркеров НДЗ в рамках трансляционной медицины является так называемая стратегия «омикс», которая направлена на идентификацию сотен высокомолекулярных и низкомолекулярных веществ в биологических средах (кровь, ликвор) с помощью масс-спектрометрии на основе протеомики и метаболомики, а также на оценку в клетках экспрессии сотен или даже тысяч генов с помощью чипов на основе транскриптомики (Bazenet, Lovestone, 2012; Cummings et al., 2013).

Наиболее информативными являются биомаркеры в виде изменения содержания физиологически активных веществ и их метаболитов (нейропептиды, мо-

ноамины и др.) в ликворе, куда они свободно поступают из мозга. Однако взятие ликвора при диспансеризации здорового населения не рекомендуется ввиду возможных, хотя и маловероятных, осложнений. Гораздо легче получить для анализа кровь, однако следует иметь в виду, что поступлению нейропептидов и классических нейротрансмиттеров из мозга в кровь в норме препятствует гемато-энцефалический барьер, хотя и возможно увеличение его проницаемости при НДЗ (Zlokovic, 2005). В ликворе и/или в крови можно выделить четыре типа биомаркеров в виде изменения содержания по сравнению с нормой: (1) патологических белков и специфических нейротоксинов; (2) классических нейротрансмиттеров и их метаболитов; (3) гормонов эндокринных желез; (4) продуктов оксидативного стресса (Угрюмов, 2010б; Sutphen et al., 2014).

Несмотря на то что уже существуют значительное число работ, направленных на поиск биомаркеров в ликворе и в крови, результаты этих исследований нередко носят противоречивый характер (Bazenet, Lovestone, 2012). Что касается маркеров 1-го и 2-го типа, то в большинстве работ при БП показано снижение содержания альфа-синуклеина в ликворе, а также снижение содержания ДА и метаболитов – L-ДОФА и 3, 4-диоксифенилуксусной кислоты в ликворе и в крови (Tuszynski, 2002; Goldstein et al., 2008; Eller, Williams, 2009; Mahlknecht, Poewe, 2013). При этом увеличено содержание N-метил(R)салсолинола – специфического токсина ДА-ергических нейронов (Naoi et al., 1997). В ряде случаев в качестве показателя развития НДЗ предлагается использовать не концентрацию патологических белков в ликворе, а соотношение между ними. Так, при БА предлагается использовать отношение концентрации бета-амилоида, которая при БА понижена, к концентрации обычного или фосфорилированного тау-белка, которая у больных повышена (Cummings et al., 2013). Снижение концентрации в ликворе α -синуклеина при БП и β -амилоида при БА объясняется превращением агрегированных белков из растворимых в нерастворимые, что сопровождается их отложением в нервной ткани в виде бляшек (Sutphen et al., 2014). Исследования содержания бета-амилоида в крови при БА носят противоречивый характер, однако в большинстве работ изменения концентрации бета-амилоида в крови у больных не обнаружено (Sutphen et al., 2014).

К третьему типу маркеров относятся гормоны гипофиза и периферических эндокринных желез, в регуляции секреции которых участвуют серотонинергическая и катехоламинергическая системы среднего мозга и ствола мозга, включая эндокринный гипоталамус, т.е. тех отделов мозга, которые вовлечены в патологический процесс при БП. Так, при БП возникает функциональная недостаточность ДА-ергических нейронов тубероинфундибулярной системы гипоталамуса, сопровождающаяся развитием гиперпролактинемии (Ferrari et al., 1982; Sandyk et al., 1987), а также дегенерируют норадренергические нейроны ствола мозга, участвующие в регуляции нейроэндокринной оси кортиколиберин гипоталамуса – адренокортикотропный гормон гипофиза – гормонов коры надпочечников, что приводит к нарушению секреции гормонов коры надпочечников, в частности кортизола (Bellomo et al., 1991).

К четвертому типу относятся биомаркеры оксидативного стресса (Danta, Piplani, 2014). При НДЗ в крови и в ликворе повышен уровень окисления липопротеинов, в плазме увеличен уровень белков, обогащенных сульфгидрильными группами, а в ликворе снижен уровень α -токоферола (Parker, 1991; Buhmann et al., 2004; Agarwal, Stoessel, 2013). Следует отметить, что, как и в случае клинических признаков, маркеры плазмы крови только относительно специфичны, поскольку могут проявляться не только при НДЗ, но и при других неврологических и психических заболеваниях (DeKosky, Marek 2003). Так, например, гиперпролактинемия может развиваться как при БП в результате возникновения функциональной недостаточности DA-ергических нейронов тубероинфундибулярной системы гипоталамуса, так и при первичной патологии гипофиза – нарушении экспрессии рецепторов к DA на лактотрофах (Sergi et al., 2003).

Наряду с компонентами плазмы к важнейшим биомаркерам НДЗ относится изменение экспрессии специфических генов и синтезов в клетках крови, обладающих частично или полностью химическим фенотипом специфических нейронов мозга, дегенерирующих при НДЗ. Примером могут служить лимфоциты, обладающие химическим фенотипом DA-ергического нейрона – в них содержатся оба фермента синтеза DA, мембранный переносчик DA и экспрессируется ряд рецепторов к DA (Nagai et al., 1996; Barbanti et al., 1999; Zaffaroni et al., 2008; Buttarelli et al., 2009). Пока только в единичных работах показано, что в лимфоцитах при БП увеличивается экспрессия D1 и D2 рецепторов, снижается экспрессия D3 рецепторов, а экспрессия D5 рецепторов не изменяется (Nagai et al., 1996; Barbanti et al., 1999; см. также стр. 203–232). Кроме того, при БП снижается уровень экспрессии мембранного переносчика DA (Zaffaroni et al., 2008). Особый интерес представляют данные о том, что в лимфоцитах у нелеченых больных при БП повышена активность N-метилтрансферазы – фермента, с помощью которого образуется N-метил(R)салсолин – нейротоксин DA-ергических нейронов (Mizuno et al., 2004).

Генетический анализ клеток крови позволяет определить наличие мутаций генов, обуславливающих предрасположенность к развитию НДЗ (альфа-синуклеин, тау-белок, бета-амилоид и др.). Отсюда следует, что обнаружение мутаций этих генов хотя и не является показателем развития НДЗ, может служить дополнительным аргументом при включении человека в «группу риска» (DeKosky, Marek, 2003).

Относительно недавно стали использовать новый подход к разработке доклинической диагностики НДЗ, основанный на обнаружении признаков нейродегенерации в симпатической нервной системе. К ним относятся отложения по ходу нервов бляшек, содержащих нерастворимые агрегированные патологические белки, в случае α -синуклеинопатии так называемые тельца Леви. Такие бляшки-биомаркеры НДЗ, можно обнаружить при прижизненной биопсии в коже, в желудочно-кишечном тракте, в сердце и в ряде других внутренних органов, получающих симпатическую иннервацию (Akhtar, Stern, 2012; Mahlkecht, Poewe, 2013).

Таким образом, важнейшей задачей в рамках борьбы с НДЗ является создание их комплексной диагностики на доклинической стадии.

3.2. Использование экспериментального моделирования для создания доклинической диагностики нейродегенеративных заболеваний

Поскольку из-за невозможности доклинической диагностики НДЗ поиск периферических биомаркеров осуществляется у больных на ранней клинической стадии, исключительно важное значение приобретает экспериментальное моделирование НДЗ на доклинической стадии, причем в первую очередь на грызунах и обезьянах (Bezard, 2008; Bezard et al., 2013). Такие модели могут быть использованы для поиска периферических биомаркеров. Однако, учитывая то, что ни одна из экспериментальных моделей *in vivo* не может полностью воспроизвести патогенез ни одного из заболеваний человека, далеко не все биомаркеры, обнаруженные на экспериментальных моделях доклинической стадии НДЗ, также окажутся присутствующими больным на доклинической стадии. В конечном итоге, значительная часть биомаркеров доклинической стадии НДЗ может оказаться в области пересечения двух множеств – биомаркеров, обнаруженных у больных на ранней клинической стадии НДЗ, и биомаркеров, обнаруженных у животных при моделировании доклинической стадии НДЗ.

Несмотря на то что до последнего времени были опубликованы сотни, если не тысячи работ по экспериментальному моделированию НДЗ, только в единичных исследованиях предпринимаются попытки их моделирования на доклинической стадии. При этом чаще всего используются нейротоксические модели терминальной клинической стадии НДЗ, воспроизводящие дегенерацию большинства специфических нейронов, или генетические модели, имитирующие повышенный синтез патологических белков, например альфа-синуклеина или бета-амилоида, но, как правило, не воспроизводящие избирательной гибели специфических нейронов и специфических нарушений поведения (Levine et al., 2004; Scheider et al., 2008; Antony et al., 2011; Chen et al., 2013). В последнее время разрабатывается принципиально новый тип моделей НДЗ путем введения в определенные отделы мозга генно-инженерных конструкций, несущих мутантные гены человека. В качестве примера может служить введение лентивирусного вектора, несущего мутантный ген α -синуклеина человека, в ЧС обезьян (Bezard et al., 2013).

Наиболее адекватная и детально охарактеризованная модель доклинической стадии БП в последнее время получена в рамках программы Президиума РАН «Фундаментальные науки – медицине» на мышах с помощью 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридина (МФТП) (Козина и др., 2010; Хаиндрава и др., 2010; Ugrumov et al., 2011; Kozina et al., 2014). Этот пронеуротоксин после поступления в мозг превращается в глиальных клетках в 1-метил-4-фенилпиридин (МФП⁺) – специфический токсин ДА-ергических нейронов. Важнейшими особенностями такого рода модели, обуславливающими ее сходство с патогенезом БП у человека, является специфическая дегенерация нигростриатных ДА-ергических нейронов и системный характер патологического процесса. Использование различных схем введения МФТП позволило смоделировать на мышах доклиническую стадию, на

которой дегенерация nigrostriatalных нейронов не достигает порога, при котором у человека и у животных появляются нарушения моторного поведения. Этот порог соответствует потере 45–60% тел DA-ергических нейронов в ЧС, 65–75% аксонов DA-ергических нейронов и DA в стриатуме. Кроме того, создана и модель ранней клинической стадии, на которой у мышей под действием МФТП дегенерирует пороговое число nigrostriatalных DA-ергических нейронов и возникает пороговый дефицит DA в стриатуме (Ugrumov et al., 2011).

В настоящее время на обеих моделях физиологами, молекулярными биологами, молекулярными генетиками, биохимиками и нейрофизиологами в рамках программы «Фундаментальные науки – медицине» проводятся многопрофильные исследования молекулярных механизмов патогенеза, а также осуществляется поиск биомаркеров упомянутых стадий паркинсонизма в виде изменения: немоторных функций мозга и внутренних органов, экспрессии генов и фенотипа nigrostriatalных нейронов и клеток крови, состава плазмы крови. В этом направлении уже получены важные результаты, показывающие поразительное сходство спектра биомаркеров, обнаруженных у больных на ранней клинической стадии БП и у мышей на экспериментальной модели этой стадии. Так, в обоих случаях были обнаружены сходные немоторные изменения в функционировании мозга в виде нарушения сна и возникновения функциональной недостаточности тубероинфундибулярной системы гипоталамуса, повышенной экспрессии в нейронах гена α -синуклеина (Дегтярева и др., 2012; Манолов и др., 2014; см. также с.151–176, 203–232, 356–422; т. 2. с. 555–569).

Сходные изменения были обнаружены у больных на ранней клинической стадии БП и на модели доклинической стадии в симпатической нервной системе, которые проявляются в виде десимпатизации сердца, а также в однонаправленном изменении содержания, моноаминов, их метаболитов и гормонов в плазме крови (см. с. 357–423). Важно подчеркнуть, что лишь незначительная часть биомаркеров, характерных для ранней клинической стадии у больных и для ранней симптомной стадии у мышей, выявляется на экспериментальной модели доклинической стадии БП. Отсюда следует, что, скорее всего, лишь незначительная часть биомаркеров, выявленных у больных на ранней клинической стадии БП, также характерна и для больных на доклинической стадии.

Таким образом, параллельный поиск и сравнительный анализ биомаркеров у больных на ранней клинической стадии и на экспериментальных моделях доклинической и ранней клинической стадий БП позволяют идентифицировать спектр биомаркеров, который в значительной степени может быть присущ больным на доклинической стадии БП.

4. Разработка превентивной терапии на доклинической стадии нейродегенеративных заболеваний

Основной причиной возникновения характерных драматических симптомов НДЗ, в частности – нарушения двигательной функции при БП, ухудшение памяти

ти, обучения и социальной адаптабельности при БА, является гибель нейронов, обеспечивающих регуляцию этих функций с гораздо большей скоростью, чем в норме. Действительно, в норме нейроны мозга погибают в течение всей жизни со скоростью примерно 4,7% в течение десяти лет (Mahlknecht, Roewe, 2013), т.е. потеря нейронов может гипотетически достичь порога, при котором возникает специфическая симптоматика, в возрасте 120 лет. Отсюда следует, что превентивное лечение должно быть направлено на снижение скорости гибели нейронов до такой степени, чтобы их потеря не достигла порога до 90–100 лет.

С учетом особенностей патогенеза НДЗ, превентивная нейропротекторная терапия должна быть направлена на предотвращение: (а) оксидативного стресса путем использования антиоксидантов; так, использование витамина Е показало хорошие клинические результаты при лечении БА и БП, а использование депренила и токоферола – при лечении БП (Lang et al., 2012; Danta, Piplani, 2014); (б) накопления олигомерных α -синуклеина, β -амилоида и других нейротоксинов, путем предотвращения агрегирования монофибрилл, снижения уровня синтеза этих белков и усиления их ферментативной деградации (Carrillo et al., 2013; Kalia et al., 2013); (в) воспаления путем использования противовоспалительных средств (Коломин и др., 2011; Perry, Holmes, 2014), (г) апоптоза путем использования антиапоптотических средств, (д) снижения уровня эндогенных нейротрофических факторов путем введения в мозг экзогенных нейротрофических факторов (Мясоедов и др., 2013; Dolotov et al., 2006), генных конструкций или синтезирующих их генно-модифицированных клеток. Известно, что нейротрофические факторы, с одной стороны, предотвращают гибель клеток, и в частности нейронов, а с другой, стимулируют репаративные процессы (Yacoubian, Standaert, 2009; Allen et al., 2013). Кроме того, в последнее время все большее внимание уделяется разработке иммунотерапии НДЗ, обеспечивающей иммунонейтрализацию патологических белков – нейротоксинов, что приводит к ингибированию их токсического влияния на нейроны и препятствует распространению нейродегенеративного процесса прионоподобным способом. Этот способ лечения уже прошел доклинические испытания и находится на стадии клинических испытаний при лечении БА (Kalia et al., 2013; Valera, Masliah, 2013; Yu, Watts, 2013; Holmes, Diamond, 2014; Relkin, 2014).

Согласно современным представлениям, нейропротекторная терапия не приносит положительного результата при применении на клинической стадии НДЗ, однако ее эффективность может быть существенно повышена при использовании на доклинической стадии (Sharma et al., 2013). В настоящее время широко применяются несколько подходов к созданию или поиску лекарственных веществ с нейропротекторными свойствами. Согласно первому подходу, на основе знания молекулярных механизмов патогенеза НДЗ и идентификации молекулярных мишеней с помощью информационно-компьютерных технологий осуществляется направленное конструирование лекарственных веществ – «драг-дизайн». Несмотря на то что этот подход теоретически имеет хорошие перспективы использования, пока с его помощью практически не удается создать принципиально новых молекул эффективных лекарственных веществ. Наиболее широко распространенный второй подход основан на поиске среди уже существующих лекарственных веществ, независимо

от области их применения, тех, которые обладают нейропротекторными свойствами. Третий подход предполагает выделение в основном из нервной, но также и из других тканей организма, физиологически активных веществ с нейропротекторными свойствами, на основе которых создаются новые лекарственные вещества. И наконец, четвертый подход представляет собой комбинацию предыдущих трех. Этот подход предполагает структурную и конформационную оптимизацию молекулы лекарственного вещества, например, сохранение только активной аминокислотной последовательности, которая связывается с рецепторами, или добавление к активной молекуле «хвоста», который предотвращает лекарственное вещество от деградации, а следовательно пролонгирует его действие в организме. В мире широко проводятся клинические испытания новых лекарственных веществ с нейропротекторными свойствами, однако пока с мало обнадеживающими результатами, вероятно, потому, что они проводятся на больных на клинической стадии НДЗ (Smith et al., 2012)

Помимо создания лекарственных веществ с нейропротекторными свойствами разрабатываются принципиально новые технологии, которые в перспективе также могут быть использованы для предотвращения гибели нейронов и компенсации функциональной недостаточности нейротрансмиссии, возникшей при гибели нейронов. Первый подход состоит во введении в мозг генно-инженерных конструкций – носителей генов веществ с нейропротекторными свойствами, в первую очередь нейротрофических или ростовых факторов (Witt, Marks, 2011). Вторым подходом предполагается создание клеток нейрональной или ненейрональной природы с заданными свойствами, которые имплантируются в поврежденные отделы мозга с целью предотвратить сохранившиеся нейроны от гибели, либо с целью компенсации возникшей при нейродегенерации функциональной недостаточности специфической нейротрансмиссии. Использование этих подходов на экспериментальных моделях НДЗ показали их высокую терапевтическую эффективность, в то время как клинические испытания пока не оправдывают ожидания авторов (Witt, Marks, 2011), так же как это было ранее при трансплантации эмбриональных ДА-ергических нейронов в стриатум больных при БП (Ugumov 2001; Угрюмов и др., 2004).

Одним из важнейших условий поиска новых лекарственных веществ с нейропротекторными свойствами и разработки новых терапевтических генно-инженерных и клеточных технологий является использование адекватных моделей для тестирования их эффективности в период дегенерации нейронов. Однако такие модели до последнего времени практически отсутствовали (Antony et al., 2011; Duty, Jenner, 2011; Bezard et al., 2013). Действительно, существуют лишь единичные работы по определению динамики дегенерации специфических нейронов, а тестирование лекарственных веществ на существующих моделях осуществляется путем их введения животным либо до начала дегенерации, либо после завершения этого процесса. Это означает, что эти модели не позволяют осуществить поиск лекарственных веществ, которые могут остановить нейродегенерацию в процессе ее развития. Более того, в подавляющем большинстве работ тестирование лекарственных веществ с нейропротекторными свойствами проводили на моделях терминальной клинической стадии НДЗ, т.е. на фоне потери большинства специфических регуля-

торных нейронов и истощения компенсаторных возможностей мозга (Antony et al., 2011; Bezard et al., 2013).

В рамках программы «Фундаментальные науки – медицине» впервые была создана тест-система для поиска лекарственных веществ с нейропротекторными свойствами на основе оригинальной модели ранней клинической стадии БП (мышши, МФТП) (Колачева и др., 2014а,б). На этой модели впервые была определена динамика деградации нигростриатных ДА-ергических нейронов – отдельно тел нейронов в ЧС и аксонов – в стриатуме, в ответ на системное введение МФТП. При этом было показано, что при четырехкратном введении МФТП в однократной дозе 12 мг/кг с интервалом 2 часа между инъекциями деградация терминалей аксонов в стриатуме начинается сразу же после первой инъекции МФТП, а деградация тел нейронов ЧС начинается только через 3 часа после последней инъекции МФТП. Оканчивается деградация аксонов и тел нейронов в одно и то же время – через 12 часов после последней инъекции МФТП. В ближайшее время эта модель будет широко использована для оценки возможности остановки или замедления гибели нейронов путем воздействия на животное лекарственными веществами с нейропротекторными свойствами в разгар процесса нейродегенерации.

5. Заключение

Нейродегенеративные заболевания –БП,БА и многие другие, относятся к тяжелейшим фатальным неврологическим и психическим заболеваниям, которые после появления характерных драматических симптомов относительно быстро приводят к полной инвалидизации и к летальному исходу. При этом все попытки лечения больных с помощью традиционной фармакотерапии, нейрохирургии, клеточных и генно-инженерных технологий не приводят к вылечиванию больных. Однако в последние два десятилетия на основе трансляционной, персонализированной и профилактической медицины получены новые фундаментальные знания о факторах риска развития НДЗ и молекулярных механизмах патогенеза, которые вселяют определенный оптимизм в отношении перспективы вылечивания больных. Так, стало ясно, что ускоренный процесс гибели нейронов, являющийся основной причиной возникновения НДЗ, начинается задолго до появления характерных драматических симптомов. Это объясняется включением механизмов нейропластичности, обеспечивающих компенсацию функциональной недостаточности мозга, возникающей в результате гибели нейронов. Более того, оказалось, что первые симптомы появляются только после гибели большинства специфических регуляторных нейронов и исчерпания компенсаторных резервов мозга. Только в это время, фактически уже при отсутствии мишеней для фармакотерапии, можно поставить диагноз и начать традиционное лечение больных, что и объясняет его крайне низкую эффективность.

Приведенные данные позволили создать новую стратегию – разработку доклинической диагностики и превентивного нейропротекторного лечения НДЗ. Предполагается, что создание доклинической диагностики будет двухэтапным.

На первом этапе предполагается с учетом системного характера НДЗ выявить легко доступные для анализа периферические биомаркеры, характерные для доклинической стадии, и по их наличию включать в группу риска людей, проходящих профилактическое обследование (диспансеризацию). На втором этапе будет осуществляться дифференциальная диагностика НДЗ в группе риска с помощью неинвазивных нейровизуализационных методов исследования, в первую очередь с помощью позитронно-эмиссионной томографии. За решением первого вопроса – создания доклинической диагностики, последует решение второго стратегического вопроса – разработки превентивного нейропротекторного лечения на доклинической стадии, которое позволит значительно замедлить гибель нейронов и таким образом продлить доклиническую стадию до смерти больного, по не зависящей от НДЗ причине. На основе трансляционной медицины уже сегодня ясно, что в качестве потенциальных нейропротекторов будут использованы лекарственные вещества, ингибирующие все возможные молекулярные механизмы гибели нейронов и стимулирующие механизмы пластичности мозга. В рамках этой стратегии наряду с традиционной фармакотерапией в гораздо более отдаленной перспективе, возможно, будут использоваться с лечебной целью принципиально новые подходы – клеточные и генно-инженерные технологии.

Таким образом, разработка доклинической диагностики и превентивного лечения НДЗ является стратегической задачей в мире, поскольку ее решение позволит не только лечить, но и впервые с момента описания этих заболеваний начать излечивать этих тяжелейших больных.

Литература

- Гаврилова С.И. Фармакотерапия болезни Альцгеймера. М.: Пульс, 2003. 337 с.
- Гаврилова С.И. Фармакотерапия болезни Альцгеймера. М.: Пульс, 2007. 359 с.
- Гехт А.Б., Попов Г.Р. Медицинские и социальные аспекты болезни Паркинсона и расстройств движений. Ред. С.Н. Иллариошкин, О.С. Левин. М.: Соверо пресс, 2014. С. 221-227.
- Голубев В.Л., Левин Я.И., Вейн А.М. Болезнь Паркинсона и синдром паркинсонизма. М.: МЕДпресс, 1999. 416 с.
- Гусев Е.И., Гехт А.Б. (ред.) Болезни движений: медицинские и социальные аспекты. М.: АПКИППРО, 2010. 355 с.
- Гусев Е.И., Завалишин И.А., Бойко А.Н. Рассеянный склероз и другие демиелинизирующие заболевания. М.: Миклош, 2004. 540 с.
- Дяттерева Е.А., Пронина Т.С., Угрюмов М.В. Нарушения в тубероинфундибулярной дофаминергической системе при моделировании паркинсонизма у мышей // Нейрохимия. 2012. Т. 29. № 4. С. 311-317.
- Иллариошкин С.Н. Конформационные болезни мозга. М.: Янус-К, 2003. 248 с.
- Козина Е.А., Хаиндрава В.Г., Кудрин В.С. и др. Экспериментальное моделирование функциональной недостаточности nigrostriatalной дофаминергической системы у мышей // Рос. физиол. журнал. 2010. Т. 96. № 3. С. 270-82.
- Колачева А.А., Козина Е.А., Волина Е.В., Угрюмов М.В. Дегенерация nigrostriatalных дофаминергических нейронов на экспериментальной модели ранней клинической стадии болезни Паркинсона // Нейрохимия. 2014а. Т. 31. № 3. С. 225-235.

- Колачева А.А., Козина Е.А., Волина Е.В., Угрюмов М.В. Динамика дегенерации дофаминергических нейронов и сопутствующих компенсаторных процессов в nigrostriatalной системе у мышей // Докл. РАН. 2014б. Т. 456. № 2. С. 246-250.
- Коломин Т.А., Шадрин М.И., Сломинский П.А., Лимборская С.А., Мясоедов Н.Ф. Изменение экспрессии генов хемокинов, цитокинов и их рецепторов под действием селанка и его фрагментов // Генетика. 2011. Т. 47. № 5. С. 711-714.
- Левин О.С., Федорова Н.В. Болезнь Паркинсона. М.: Orion Pharma, 2006. 256 с.
- Манолов А.И., Долгих В.В., Украинцева Ю.В. и др. Изменение двигательной активности и цикла бодрствование–сон на МФТП-модели болезни Паркинсона у мышей // Рос. физиол. журнал им. И.М. Сеченова. 2014. Т. 100. № 11 (в печати).
- Мясоедов Н.Ф., Иллариошкин С.Н., Журавлева Е.Ю. Пептидная нейропротекция препаратом «Селанк, капли назальные 0,15%» у пациентов на ранней стадии с болезнью Паркинсона // Вестник неврологии, психиатрии и нейрохирургии. 2013. № 6. С. 86-95.
- Сломинский П.А., Милосердова О.В., Попова С.Н. Анализ делеционных мутаций в гене PARK2 у больных идиопатической формой болезни Паркинсона // Генетика. 2003. Т. 39. С. 223-228.
- Тиганов А.С. Общая психопатология. М.: Медицинское информационное агентство, 2008. 128 с.
- Угрюмов М.В. (ред.) Нейродегенеративные заболевания: фундаментальные и прикладные аспекты. М.: Наука, 2010а, 448 с.
- Угрюмов М.В. Новые представления о патогенезе, диагностике и лечении нейродегенеративных заболеваний // Вестник РАМН, 2010б. № 8. С. 6-19.
- Угрюмов М.В., Коновалов А.Н., Гусев Е.И. Итоги и перспективы использования клеточных технологий в лечении неврологических заболеваний // Вестник РАМН. 2004. № 11. С. 8-17.
- Успенская О.В., Яхно Н.Н., Белушкина Н.Н. Нейрохимические маркеры нейродегенерации в ранней диагностике болезни Альцгеймера, сосудистой и смешанной деменции // Журнал неврол. и псих. им. С.С. Корсакова. 2010. Т. 110. № 8. С. 36-40.
- Федорова Н.В., Никитина А.В. Депрессия, апатия и ангедония при болезни Паркинсона: механизмы развития немоторных проявлений и подходы к коррекции // Нервные болезни. 2012. № 3. С. 31-36.
- Хайндрава В.Г., Козина Е.А., Кучеряну В.Г. и др. Моделирование преклинической и ранней клинической стадий болезни Паркинсона // Журнал неврол. и псих. 2010. Т. 110. № 7. С. 41-47.
- Шток В.Н., Иванова-Смоленская И.А., Левин О.С. (ред.) Экстрапирамидные расстройства. М.: Мед-пресс-информ, 2002, 608 с.
- Яхно Н.Н., Преображенская И.С., Захаров В.В. и др. Распространенность когнитивных нарушений при неврологических заболеваниях // Неврология, нейропсихиатрия, психосоматика. 2012. № 2. С. 30-35.
- Abbott R.D., Petrovich H., White L.R. et al. Frequency of bowel movements and the future risk of Parkinson's disease // Neurology. 2001. Vol. 3. P. 456-462.
- Adler C.H. Premotor symptoms and early diagnosis of Parkinson's disease // Intern. J. of Neuroscience. 2011. Vol. 121. P. 3-8.
- Agarwal P.A., Stoessl A.J. Biomarkers for trials of neuroprotection in Parkinson's disease // Mov. Disord. 2013. Vol. 28. P. 71-85.
- Akhtar R.S., Stern M.B. New concepts in the early and preclinical detection of Parkinson's disease: therapeutic implications // Expert. Rev. Neurother. 2012. Vol. 12. P. 1429-1438.
- Allen S.J., Watson J.J., Shoemark D.K. et al. GDNF, NGF and BDNF as therapeutic options for neurodegeneration // Pharmacol Ther. 2013. Vol. 138. P. 155-175.
- Antony P.M.A., Diederich N.J., Balling R. Parkinson's disease mouse models in translational research // Mamm. Genome. 2011. Vol. 22. P. 401-419.
- Bailey P. Biological markers in Alzheimer's disease // Can. J. Neurol. Sci. 2007. Vol. 34. № 1. P. S72-76.
- Barbanti P., Fabbrini G., Ricci A. et al. Increased expression of dopamine receptors on lymphocytes in Parkinson's disease // Mov. Disord. 1999. Vol. 14. P. 764-771.
- Bazenet C., Lovestone L. Plasma biomarkers for Alzheimer's disease: much needed but tough to find // Biomarkers Med. 2012. Vol. 6. P. 441-454.
- Bekris M.L., Yu Ch.-E., Bird T.D. et al. Genetics of Alzheimer disease // J. Geriatr. Psychiatry Neurol. 2010. Vol. 23. P. 213-227.

- Bellomo G., Santambrogio L., Fiacconi M. et al.* Plasma profiles of adrenocorticotrophic hormone, cortisol, growth hormone and prolactin in patients with untreated Parkinson's disease // *J. Neurol.* 1991. Vol. 238. P. 19-22.
- Berendse H.W., Booij J., Francot C.M. et al.* Subclinical dopaminergic dysfunction in asymptomatic Parkinson's disease patients' relatives with a decreased sense of smell // *Ann. Neurol.* 2001. Vol. 1. P. 34-41.
- Bergstrom B.P., Garris P.A.* «Passive stabilization» of striatal extracellular dopamine across the lesion spectrum encompassing the presymptomatic phase of Parkinson's disease: a voltammetric study in the 6-OHDA-lesioned rat // *J. Neurochem.* 2003. Vol. 87. P. 1224-1236.
- Bernheimer H., Birkmayer W., Hornykiewicz O. et al.* Brain dopamine and the syndromes of Parkinson and Huntington. Clinical, morphological and neurochemical correlations // *J. Neurol. Sci.* 1973. Vol. 20. P. 415-455.
- Bezard E.* Neuroprotection for Parkinson's disease: clinically driven experimental design in non-human primates // *Parkinson's disease: molecular and therapeutic insights from model systems.* Eds. R. Nass, S. Przedborski. Amsterdam: Elsevier, 2008. P. 65-75.
- Bezard E., Gross C.E.* Compensatory mechanisms in experimental and human parkinsonism: towards a dynamic approach // *Prog. Neurobiol.* 1998. Vol. 55. P. 93-116.
- Bezard E., Gross C., Brotchie J.M.* Presymptomatic compensation in Parkinson's disease is not dopamine-mediated // *Trends in Neurosci.* 2003. Vol. 26. P. 215-221.
- Bezard E., Yue Z., Kirik D. et al.* Animal models of Parkinson's disease: limits and relevance to neuroprotection studies // *Mov. Disord.* 2013. Vol. 28. P. 61-70.
- Boeve B.F., Silber M.H., Saper C.B. et al.* Pathophysiology of REM sleep behavior disorder and relevance to neurodegenerative disease // *Brain Pt.* 2007. Vol. 11. P. 2770-2788.
- Braak H., Ghebremedhin E., Rub U. et al.* Stages in the development of Parkinson's disease-related pathology // *Cell Tiss. Res.* 2004. Vol. 318. №1. P. 121-134.
- Braak H., de Vos R.A., Bohl J. et al.* Gastric alpha-synuclein immunoreactive inclusions in Meissner's and Aurbach's plexuses in cases staged for Parkinson's disease-related brain pathology // *Neurosci. Lett.* 2006. Vol. 396. № 1. P. 67-72.
- Buhmann C., Arlt S., Kontush A. et al.* Plasma and CSF markers of oxidative stress are increased in Parkinson's disease and influenced by antiparkinsonian medication // *Neurobiol. Dis.* 2004. Vol. 15. P. 160-170.
- Buttarelli F.R., Capriotti G., Pellicano C. et al.* Central and peripheral dopamine transporter reduction in Parkinson's disease // *Neurol. Res.* 2009. Vol. 31. P. 687-691.
- Carrillo M.C., Brashear H.R., Logovinsky V. et al.* Can we prevent Alzheimer's disease? Secondary «prevention» trials in Alzheimer's disease // *Alzheimer's & Dementia.* 2013. Vol. 9. P. 123-131.
- Chen H., Burton E.A., Ross G.W. et al.* Research on the premotor symptoms of Parkinson's disease: Clinical and etiological implications // *Environ. Health. Perspect.* 2013. Vol. 121. P. 1245-1252.
- Cummings J.L., Banks S.J., Gary R.K. et al.* Alzheimer's disease drug development: translational neuroscience strategies // *CNS Spectrums.* 2013. Vol. 18. P. 128-138.
- Danta C.C., Piplani P.* The discovery and development of new potential antioxidant agents for the treatment of neurodegenerative diseases // *Expert. Opin. Drug Discov.* 2014. Vol. 9. P. 1205-1222.
- De Munter J.P.J.M., Melamed E., Wolters E.C.* Stem cell grafting in parkinsonism – Why, how and when // *Parkinsonism and Related Disorders.* 2014. Vol. 20S1. P. S150-S153.
- De Kosky S.T., Marek K.* Looking backward to move forward: early detection of neurodegenerative disorders // *Science.* 2003. Vol. 302. P. 830-834.
- Dolotov O.V., Karpenko E.A., Inozemtseva L.S.* Semax, an analog of ACTH (4-10) with cognitive effects, regulates BDNF and TRKB expression in the rat hippocampus // *J. Brain Res.* 2006. Vol. 1117. № 1. P. 54-60.
- Doty R.L., Bromley S.M., Stern M.B.* Olfactory testing as an aid in the diagnosis of Parkinson's disease: development of optimal discrimination criteria // *Neurodegeneration.* 1995. Vol. 4. № 1. P. 93-97.
- Duty S., Jenner P.* Animal models of Parkinson's disease: a source of novel treatments and clues to the cause of the disease // *Br. J. Pharmacol.* 2011. Vol. 164. № 4. P. 1357-1391.
- Eller M., Williams D.R.* Biological fluid biomarkers in neurodegenerative parkinsonism // *Nat. Rev. Neurol.* 2009. Vol. 5. № 10. P. 561-70.
- Fahn S.* Clinical aspects of Parkinson's disease // *Parkinson's Disease: Molecular and Therapeutic Insights from Model Systems.* Eds. R. Nass, S. Przedborski. Amsterdam: Elsevier, 2008. P. 3-8.

- Ferrari C., Rampini P., Benco R. et al.* Functional characterization of hypothalamic hyperprolactinemia // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1982. Vol. 55. P. 897-901.
- Formichi P., Battisti C., Radi E. et al.* Cerebrospinal fluid tau, A beta, and phosphorylated tau protein for the diagnosis of Alzheimer's disease // *J. Cell. Physiol.* 2006. Vol. 208. P. 39-46.
- Goldstein D.S.* Imaging of the autonomic nervous system: focus on cardiac sympathetic innervation // *Semin. Neurol.* 2003. Vol. 23. №4. P. 423-433.
- Goldstein D.S., Sewell L.* Olfactory dysfunction in pure autonomic failure: Implications for the pathogenesis of Lewy body diseases // *Parkinsonism Relat. Disord.* 2009. Vol. 15. P. 516-520.
- Goldstein D.S., Holmes C., Li S.-T. et al.* Cardiac sympathetic denervation in Parkinson disease // *Ann. Intern. Med.* 2000. Vol. 133. P. 338-347.
- Goldstein D.S., Holmes C., Benth O. et al.* Biomarkers to detect central dopamine deficiency and distinguish Parkinson disease from multiple system atrophy // *Parkinsonism Relat. Disord.* 2008. Vol. 14. P. 600-607.
- Hague K., Lento P., Morgello S. et al.* The distribution of Lewy bodies in pure autonomic failure: autopsy findings and review of the literature // *Acta Neuropathol.* 1997. Vol. 94. P. 192-196.
- Hall A.M., Moore R. Y., Lopez O.L. et al.* Basal forebrain atrophy is a presymptomatic marker for Alzheimer's disease // *Alzheimers Dement.* 2008. Vol. 4. P. 271-279.
- Halliday G.M., Blumbergs P.C., Cotton R.G. et al.* Loss of brain stem serotonin- and substance P-containing neurons in Parkinson's disease // *Brain Res.* 1990. Vol. 510. №1. P. 104-107.
- Halliday G., Lees A., Siern M.* Milestones in Parkinson's disease – Clinical and pathologic features // *Mov. Disord.* 2011. Vol. 26. P. 1015-1021.
- Han J.-Y., Han S.-H.* Primary prevention of Alzheimer's disease: Is it an attainable goal? // *J. Korean Med. Sci.* 2014. Vol. 29. P. 886-892.
- Hawkes C.H., Shephard B.C., Daniel S.E.* Olfactory dysfunction in Parkinson's disease // *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry.* 1997. Vol. 62. №5. P. 436-446.
- Hirsch E.C., Vyas S., Hunota S.* Neuroinflammation in Parkinson's disease // *Parkinsonism and Related Disorders.* 2012. Vol. 18S1. P. S210-S212.
- Holmes B.B., Diamond M.I.* Prion-like Properties of tau protein: The importance of extracellular tau as a therapeutic target. published online // *J. Biol. Chem.* 2014. Vol. 289. P. 19855-19861.
- Jack C.R., Wiste H.J., Knopman D.S. et al.* Rates of b-amyloid accumulation are independent of hippocampal neurodegeneration // *Neurology.* 2014. Vol. 82. P. 1605-1612.
- Jellinger K.A.* Pathology of Parkinson's disease. Changes other than nigrostriatal pathway // *Mol. Chem. Neuropathol.* 1991. Vol. 14. №3. P.153-197.
- Kalia L.V., Kalia S.K., McLean P.J. et al.* α -Synuclein oligomers and clinical implications for Parkinson disease // *Ann. Neurol.* 2013. Vol. 73. P. 155-169.
- Klos K.J., Ahlsg J.E., Josephs K.A. et al.* Alpha-synuclein pathology in the spinal cords of neurologically asymptomatic aged individuals // *Neurology.* 2006. Vol. 66. №7. P. 1100-1102.
- Kozina E.A., Khakimova G.R., Khaindrava V.G. et al.* Tyrosine hydroxylase expression and activity in the nigrostriatal dopaminergic neurons of MPTP-treated mice at the presymptomatic and symptomatic stages of parkinsonism // *J. Neurological Sciences,* 2014. Vol. 340. P. 198-207.
- Lang A.E., Melamed E., Poewe W. et al.* Trial designs used to study neuroprotective therapy in Parkinson's disease // *Mov. Disord.* 2012. Vol. 28. P. 86-95.
- Langston J.W.* The Parkinson's complex: Parkinsonism is just the tip of the iceberg // *Ann. Neurol.* 2006. Vol. 4. P. 591-596.
- Levine M.S., Cepeda C., Hickey M.A. et al.* Genetic mouse models of Huntington's and Parkinson's diseases: illuminating but imperfect // *Trends Neurosci.* 2004. Vol. 27. P. 691-697.
- Mahlknecht P., Poewe W.* Is there a need to redefine Parkinson's disease? // *J. Neural Transm.* 2013. Vol. 120. Suppl. 1. P. S9-17.
- Magen I., Chesselet M.-F.* Genetic mouse models of Parkinson's disease: The state of the art // *Progress in Brain Research.* Eds. A. Bjorklund, M.A. Cenci. 2010. Vol. 184. P. 53-87.
- Marras C., Tanner C.M.* Epidemiology of Parkinson's distase // *Movement Disorders. Neurological Principles & Practice.* Eds. R.L. Watts, W.C. Koller. NY.: McGraw-Hill, 2004. P. 177-195.

- Maruyama W., Nakahara D., Ota M. et al.* N-methylation of dopamine-derived 6,7-dihydroxy-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline, (R)-salsolinol, in rat brains: in vivo microdialysis study // *J. Neurochem.* 1992. Vol. 59. P. 395-400.
- McKeith I., Mintzer J., Aarsland D. et al.* Dementia with Lewy bodies // *Lancet Neurol.* 2004. Vol. 1. P. 19-28.
- Mizuno Y., Hattori N., Mochizuki H.* Etiology of Parkinson's disease // *Movement Disorders. Neurological Principals & Practice.* Eds. R.L. Watts, W.C. Koller. NY.: McGraw-Hill, 2004. P. 209-231.
- Mosconi L., Bertia V., Glodzika L. et al.* Pre-clinical detection of Alzheimer's disease using FDG-PET, with or without amyloid imaging // *J. Alzheimers Dis.* 2010. Vol. 20. P. 843-854.
- Nagai Y., Ueno S., Saeki Y. et al.* Decrease of the D3 dopamine receptor mRNA expression in lymphocytes from patients with Parkinson's disease // *Neurology.* 1996. Vol. 46. P. 791-795.
- Naoi M., Maruyama W., Dostert P. et al.* N-methyl-(R)salsolinol as a dopaminergic neurotoxin: from an animal model to an early marker of Parkinson's disease // *J. Neural. Transm.* 1997. Suppl. 50. P. 89-105.
- Nelson P.T., Alafuzoff I., Bigio E.H. et al.* Correlation of Alzheimer disease neuropathologic changes with cognitive status: A review of the literature // *J. Neuropathol Exp. Neurol.* 2012. Vol. 71. P. 362-381.
- Niethammer M., Feigin A., Eidelberg D.* Functional neuroimaging in Parkinson's disease // *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 2012. Vol. 2. №5. P. a009274.
- Overk C.R., Masliah E.* Pathogenesis of synaptic degeneration in Alzheimer's disease and Lewy body disease // *Biochem. Pharmacol.* 2014. Vol. 88. P. 508-516.
- Parker W.D. Jr.* Preclinical detection of Parkinson's disease: biochemical approaches // *Neurology.* 1991. Vol. 41. №5. Suppl. 2. P. 34-36.
- Perkin G.D.* Autonomic Function // *Capildeo Research Progress in Parkinson's Disease.* Eds. F.C. Rose, R. Capildeo. Kent: Pitman Medical, 1981. P. 111-125.
- Perry V.H., Holmes C.* Microglial priming in neurodegenerative disease // *Nat. Rev. Neurol.* 2014. Vol. 10. P. 217-224.
- Petrucelli L., Dickson D.W.* Neuropathology of Parkinson's disease // *Parkinson's Disease: Molecular and Therapeutic Insights from Model Systems.* Eds. R. Nass, S. Przedborski. Amsterdam: Elsevier, 2008. P. 35-48.
- Prunier C., Bézard E., Montharu J. et al.* Presymptomatic diagnosis of experimental Parkinsonism with 123I-PE2I SPECT // *Neuroimage.* 2003. Vol. 19. P. 810-816.
- Raff M.C., Whitmore A.V., Finn J.T.* Axonal self-destruction and neurodegeneration // *Science.* 2002. Vol. 296. P. 868-871.
- Relkin N.* Clinical Trials of Intravenous Immunoglobulin for Alzheimer's Disease // *J. Clin. Immunol.* 2014. Vol. 34. Suppl. 1. P. S74-S79.
- Ross O.A., Braithwaite A.T., Farrer M.J.* Genetics of Parkinson's disease // *Parkinson's Disease: Molecular and Therapeutic Insights from Model Systems.* Eds. R. Nass, S. Przedborski. Amsterdam: Elsevier, 2008. P. 9-33.
- Sandyk R., Iacono R.P., Bamford C.R.* The hypothalamus in Parkinson disease // *Ital. J. Neurol.* 1987. Vol. 8. N 3. P. 227-234.
- Scheider J.S., Anderson D.W., Decamp E.* 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced mammalian models of Parkinson's disease: potential uses and misuses of acute, and chronic models // *Parkinson's Disease: Molecular and Therapeutic Insights from Model Systems.* Eds. R. Nass, S. Przedborski. Amsterdam: Elsevier, 2008. P. 87-103.
- Schenk C.H., Bundlie S.R., Mahowald M.W.* Delayed emergence of a parkinsonian disorder in 38% of 29 older men initially diagnosed with idiopathic rapid eye movement sleep behaviour disorder // *Neurology.* 1996. Vol. 46. №2. P. 388-393.
- Selkoe D.J.* Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy // *Physiol. Rev.* 2001. Vol. 81. P. 741-766.
- Serri O., Chik C.L., Ur E. et al.* Diagnosis and management of hyperprolactinemia // *CMAJ.* 2003. Vol. 169. N 6. P. 575-581.
- Sharma S., Moon C.S., Khogali A. et al.* Biomarkers in Parkinson's disease (recent update) // *Neurochem. Int.* 2013. Vol. 3. P. 201-229.
- Siderowf A.* Pre-motor Parkinson's disease: Concepts and definitions // *Mov. Disord.* 2012. Vol. 27. P. 608-616.

- Smith Y., Wichmann T., Factor S.A. Parkinson's disease therapeutics: New developments and challenges since the introduction of Levodopa // *Neuropsychopharmacology*. 2012. Reviews. Vol. 37. P. 213-246.
- Sperling R., Johnson K. Biomarkers of Alzheimer disease: Current and future applications to diagnostic criteria // *Continuum (Minneapolis Minn)*. 2013. Vol. 19. P. 325-338.
- Sperling R.A., Aisen P.S., Beckett L.A. et al. Toward defining the preclinical stages of Alzheimer's disease: Recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease // *Alzheimers Dement*. 2011. Vol. 7. P. 280-292.
- Sutphen C.L., Fagan A.M., Holtzman D.M. Progress update: Fluid and imaging biomarkers in Alzheimer's disease // *Biol. Psychiatry*. 2014. Vol. 75. P. 520-526.
- Tetrud J.W. Preclinical Parkinson's disease: detection of motor and nonmotor manifestation // *Neurology*. 1991. Vol. 41. Suppl. 2. P. 69-71.
- Thies W., Bleiler L. Alzheimer's disease facts and figures // *Alzheimers Dement*. 2013. Vol. 9. №2. P. 208-245.
- Tuszynski M.H. Growth-factor gene therapy for neurodegenerative disorders // *Lancet Neurol*. 2002. Vol. 1. P. 51-57.
- Ugrumov M.V. Neurotransplantation in treatment of Parkinson's disease // *Basal Ganglia and Thalamus in Health and Movement Disorders*. Eds. K. Kultas-Ilinsky, I.A. Ilinsky. Kluwer Acad. Plenum, 2001. P. 349-363.
- Ugrumov M.V. Brain neurons partly expressing monoaminergic phenotype: distribution, development, and functional significance in norm and pathology // 3rd ed. *Handbook of Neurochemistry and Molecular Neurobiology*. Ed. A. Lajtha. Neurotransmitter Systems. Ed. S. Vizi. Heidelberg: Springer, 2008. P. 21-73.
- Ugrumov M.V. Non-dopaminergic neurons partly expressing dopaminergic phenotype: Distribution in the brain, development and functional significance // *J. Chem. Neuroanatomy*. 2009. Vol. 38. P. 241-256.
- Ugrumov M.V. Brain neurons partly expressing dopaminergic phenotype: location, development and functional significance // *Advances in Pharmacology*. 2013. Vol. 68. P. 37-91.
- Ugrumov M.V., Melnikova V.I., Lavrentyeva A.V. et al. Dopamine synthesis by non-dopaminergic neurons expressing individual complementary enzymes of the dopamine synthetic pathway in the arcuate nucleus of fetal rats // *Neuroscience*. 2004. Vol. 124. №3. P. 629-635.
- Ugrumov M.V., Khaindrava V.G. Modeling of presymptomatic and symptomatic stage of parkinsonis zina EA et alm in mous // *Neuroscience*. 2011. Vol. 181. P. 175-188.
- Ugrumov M., Taxi J., Pronina T. et al. Neurons expressing individual enzymes of dopamine synthesis in the mediobasal hypothalamus of adult rats: functional significance and topographic interrelations // *Neuroscience*. 2014. Vol. 277. P. 45-54.
- Valera E., Masliah E. Immunotherapy for neurodegenerative diseases: focus on α -synucleinopathies // *Pharmacol. Ther.* 2013. Vol. 138. P. 311-322.
- Williamson J., Goldman J., Marder K.S. xGenetic aspects of Alzheimer disease // *Neurologist*. March. 2009. Vol. 15. P. 80-86.
- Witt J., Marks W.J. An Update on Gene Therapy in Parkinson's Disease // *Curr. Neurol. Neurosci. Rep*. 2011. Vol. 11. P. 362-370.
- Yacoubian T.A., Standaert D.G. Targets for neuroprotection in Parkinson's disease // *Biochim. Biophys. Acta*. 2009. Vol. 1792. P. 676-687.
- Yu Y., Watts R.J. Developing therapeutic antibodies for neurodegenerative disease // *Neurotherapeutics*. 2013. Vol. 10. P. 459-472.
- Zaffaroni M., Marino F., Bombelli R. et al. Therapy with interferon-beta modulates endogenous catecholamines in lymphocytes of patients with multiple sclerosis // *Exp. Neurol*. 2008. Vol. 214. P. 315-321.
- Zigmond M.J. Do compensatory processes underlie the preclinical phase of neurodegenerative disease? Insights from animal model of parkinsonism // *Neurobiol. Dis*. 1997. Vol. 4. P. 247-253.
- Zlokovic B.V. Neurovascular mechanisms of Alzheimer's neurodegeneration // *Trends Neurosci*. 2005. Vol. 28. P. 202-208.

Часть I

МОТОРНАЯ ФУНКЦИЯ И ЕЕ РЕГУЛЯЦИЯ В НОРМЕ И ПРИ ПАТОЛОГИИ

Глава 1

РЕГУЛЯЦИЯ МОТОРНОЙ ФУНКЦИИ В НОРМЕ И ПРИ БОЛЕЗНИ ПАРКИНСОНА

Регуляция моторного поведения

А.С. Базян, Г.А. Григорьян, М.Е. Иоффе

Содержание

1. Структурная организация моторного контроля
2. Роль субталамического ядра в регуляции двигательного поведения
3. Нейрохимическая организация структур моторного контроля
 - 3.1. Медиаторные синаптические системы дорзального стриатума и их роль в регуляции моторного поведения
 - 3.2. Дофаминергическая система среднего мозга и ее роль в регуляции моторного поведения
 - 3.3. Роль холинергической системы стриатума в регуляции двигательного поведения
4. Заключение

1. Структурная организация моторного контроля

Основными звеньями системы регуляции моторного поведения являются сенсомоторная кора, мозжечок, красное ядро и система стриатума. Каждая из этих структур имеет свою специфику в анализе периферической афферентации и формировании моторной команды, которая реализуется через кортикоспинальную и другие нисходящие системы мозга. В определенной степени к звеньям системы

Сокращения: АЦХ – ацетилхолин; ВПСП – возбуждающий постсинаптический потенциал; ДА – дофамин; РЯТ – ретикулярное ядро таламуса; СТЯ – субталамическое ядро; ТПСП – тормозной постсинаптический потенциал; AMPA-рецептор – рецептор α -амино-3-гидрокси-5-мутил-4-изоксазолпроприоново́й кислоты; CNBD (cyclicnucleotide – bindingdomain) – локус субъединицы канала, связывающий вторичный посредник; HCN – название субъединицы канала соответствует укороченной аббревиатуре полного названия канала: hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gatedchannel; $I_{Ca^{2+}T}$ – низкопороговый Ca^{2+} -канал Т-типа; I_h -канал – активируемый гиперполяризацией регулируемый вторичными посредниками канал; NMDA-рецептор – рецептор N-метил-D-аспартата.

регуляции моторного поведения также можно отнести четверохолмие, дающее начало тектоспинальной системе и формирующее, в частности, старт-рефлекс на внезапные зрительные и слуховые раздражения, и ретикулоспинальную систему, являющуюся одним из основных непирамидных нисходящих выходов.

Согласно классическим представлениям (Allen, Tsukahara, 1974; Kornhuber, 1974), план движения возникает в ассоциативных областях коры и реализуется через мозжечок, формирующий программу быстрых движений, и базальные ганглии (для медленных движений) и моторную кору. Существенная роль отводится кортико-мозжечковым петлям. При этом считалось, что моторная кора контролирует спинальные мотонейроны по принципу «точка в точку», как система «высших мотонейронов» (Phillips, Porter, 1977; Porter, Lemon, 1993).

Современные исследования существенно изменили эти представления. Показано, что активность нейронов моторной коры коррелирует с разными параметрами движения, включая скорость, силу (Evarts, 1968), направление (Georgopoulos et al., 1982, 1992) движения в суставах, конечное положение конечности (Aflado, Graciano, 2007). Микростимуляция моторной коры может вызывать сложные движения (Graciano et al., 2002). Предполагается, что моторная система использует метод «оптимального контроля» множества параметров при выполнении каждого конкретного движения (Todorov, Jordon, 2002). Показано участие моторной коры в контроле позы (Июффе, 1991; Beloozerova et al., 2005) и в обучении новой позе (Ioffe et al., 1988, 2006).

Существенную роль играет пластичность и изменение функций разных отделов моторной коры и других структур в процессе обучения и при компенсации мозговых повреждений (Nudo et al., 1996, 2001; Plautz et al., 2000; Sanes, Donoghue, 2000; Hallett, 2001). Показано, что при обучении в моторной коре происходит активный синаптогенез (Kawato, Wolpert, 1998).

Мозжечок играет существенную роль в моторном программировании. Латеральный мозжечок получает информацию о плане движения от ассоциативных областей коры и формирует программу движения, которая через зубчатые ядра и ядра таламуса передается на премоторную и моторную кору, где формируется нисходящая моторная программа, копия которой через нижнюю оливу поступает в промежуточную и медиальную области мозжечка, где она сравнивается с афферентной информацией. Корректирующий сигнал передается на спинной мозг через соответствующие ядра мозжечка, красное ядро и вестибулярные ядра. Через последние мозжечок участвует в контроле позы и равновесия. Показана также роль мозжечка в позной подготовке к движению (Diener et al., 1990; Diedrichsen et al., 2005) и в организации ритмических движений (Аршавский и др., 1984).

Роль мозжечка в обучении была теоретически обоснована Г.С. Бриндли, Д. Марром и Дж.С. Олбусом (Brindley, 1964; Marr, 1969; Albus, 1971) и затем показана экспериментально в ряде исследований (Sasaki, Gemba, 1983; Llinas, Welsh, 1993; Houk et al., 1996; Thach, 1996; Ito, 1978, 1984, 2000). Обнаружен синаптогенез в мозжечке при обучении (Blacketal., 1990). Показано участие мозжечка в реорганизации двигательных координаций в процессе обучения (Балезина, 1988; Балезина и др., 1990).

Считается, что мозжечок формирует внутреннюю модель тела и объектов окружающей среды (Gomi, Kawato, 1996; Kawato, Wolpert, 1998; Imamizu et al., 2000), которая используется в процессе обучения. Согласно «вычислительной гипотезе обучения» (Doya, 1999, 2000), существует три вида обучения – обучение «с учителем», т.е. по обратной связи (supervised learning), обучение по подкреплению (reinforcement learning) и обучение по ассоциации (unsupervised learning). Мозжечок играет существенную роль в обучении по обратной связи, оценивая текущую ошибку движения, тогда как функция базальных ганглиев связана, в основном, с выбором реакции для достижения максимума подкрепления (reinforcement learning). Моторная кора, согласно этой гипотезе, вовлечена в обучение по ассоциации. Показано, однако, что мозжечок, базальные ганглии и моторная кора вовлечены «в обучение с учителем» (supervised learning) в ситуации обучения произвольному контролю положения центра тяжести по зрительной обратной связи (Ioffe et al., 2006).

Базальные ганглии, и в частности дофаминергическая система среднего мозга, привлекают наибольшее внимание в аспекте настоящей работы. Согласно современным представлениям, важную роль в функциях базальных ганглиев играет, во-первых, дофаминергический вход из компактной части черной субстанции, нейроны которой, как и дофаминергические нейроны вентральной тегментальной области, реагируют на награду в ситуации обучения (Schultz, 1998), и, во-вторых, сложная организация выхода из стриатума (прямой и не прямой пути), обеспечивающая выбор реакции («принятие решения») и торможение ненужных движений (Redgrave et al., 1999; Hikosaka et al., 2000; Houk, 2001). Стриатум получает также билатеральный кортикальный вход через нейроны переднего мозга и ипсилатеральный вход через коллатерали пирамидных нейронов (Ballionet al., 2008). Показано, что конвергенция кортикального и дофаминового входов в дорзальном стриатуме облегчает организацию поведения, направленного на получение подкрепления, причем D1- и D2-рецепторы на нейронах стриатума могут играть разную роль в зависимости от позитивного или негативного подкрепления (Hikosaka, 2007). Через прямой выход (D1-рецепторы) стриатум тормозит внутренний паллидум и ретикулярную часть черной субстанции, уменьшая их тормозящие влияния на таламо-кортикальные входы (т.е. растормаживает их). Таким образом, прямой выход является активирующим. С другой стороны, через не прямой выход (D2-рецепторы) стриатум тормозит внутренний паллидум и снижает его тормозящее влияние на субталамическое ядро, что приводит к увеличению активирующего влияния последнего на внутренний паллидум и ретикулярную часть черной субстанции и в результате увеличивает их тормозящие влияния на таламо-кортикальные входы и уменьшает растормаживающее влияние прямого пути. Таким образом, не прямой выход является тормозным (рис. 1).

Базальные ганглии являются частью экстрапирамидной системы мозга, участвующей в моторном контроле. Центральной структурой базальных ганглиев является стриатум, состоящий из трех ядер. Прилежащее ядро, или nucleus accumbens, относят к вентральному стриатуму (Mink, 2003). Nucleus caudatus, или хвостатое ядро, и putamen, или скорлупа, относятся к структурам дорзального стриатума и составляют неостриатум.

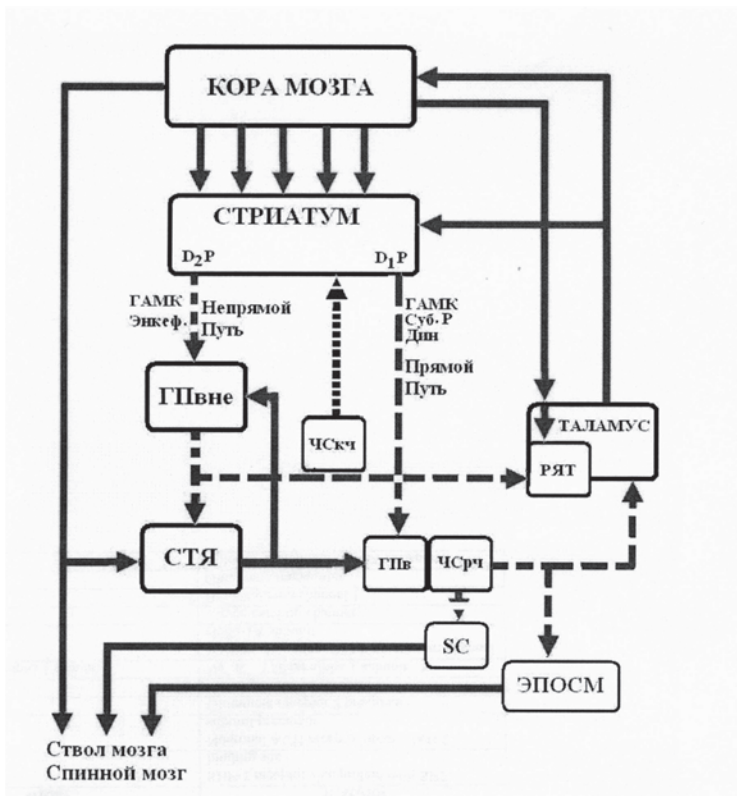


Рис. 1. Связи дорзального стриатума

Сплошные линии – глутаматные связи (активирующие), крупные пунктирные линии – ГАМК-связи (тормозные), мелкий пунктир – дофаминовые связи. ГПвне – globus pallidus внешний. ЧСкч – черная субстанция, компактная часть. СТЯ – субталамическое ядро. ГПв – globus pallidus внутренний. ЧСрч – черная субстанция, ретикулярная часть. РЯТ – ретикулярное ядро таламуса. SC – superior colliculus. ЭПОСМ – экстрапирамидная область среднего мозга. Энкеф – энкефалин. Суб. Р – субстанция Р. Дин – динарфин (Базян и др., 2011)

95% всех нейронов дорзального стриатума – это ГАМКергические средние звездчатые нейроны. Остальные 5% – это интернейроны: большие незвездчатые нейроны составляют 1–2% клеточной популяции стриатума. Они используют ацетилхолин как медиатор. Третий тип нейронов – это средние незвездчатые нейроны. Это также интернейроны, они используют соматостатин как передатчик. Четвертый тип нейронов – это маленькие незвездчатые нейроны, которые используют ГАМК как медиатор (Nikosaka et al., 2000; Mink, 2003). Всего интернейронов 5%, что очень мало для функционирования локальной сети. Нехватка интернейронов в дорзальном стриатуме компенсируется специальным строением аксонов и дендритов средних звездчатых нейронов стриатума, что позволяет им участвовать в функционировании локальной сети. Одиночный аксон средних звездчатых нейронов дорзального стриатума, идущий к нейронам паллидума и ретикулярной части черной субстанции, обладает коллатеральными ветвями у самого основания аксона; они иннервируют

дендритное дерево собственного и соседних средних звездчатых нейронов (Mink, 2003). Следовательно, средние звездчатые нейроны сами участвуют в локальной обработке информации дорзальным стриатумом, используя ГАМК как медиатор.

Иерархические сети дорзального стриатума имеют специфическое строение. Стриатум получает возбуждательный вход практически от всех областей коры головного мозга (см. рис. 1). Кортикальный вход использует глутамат как собственный медиатор и заканчивается в значительной степени на головках дендритных шипиков средних звездчатых нейронов. Проекции от коры головного мозга к стриатуму имеют топографическую организацию. Например, соматосенсорная и моторная кора проецируются к заднему неостриатуму, а префронтальная кора проецируется к переднему хвостатому ядру. Внутри соматосенсорных и моторных проекций к стриатуму сохраняется соматотопия (Mink, 2003). Было предположено, что топографические отношения между корой головного мозга и стриатумом обеспечивают базу для изоляции функционально различных сетей в базальных ганглиях (Alexander et al., 1986; Mink, 2003; Miyachi, 2009) (рис. 2). Эти циркулирующие сети включают соматомоторные, глазодвигательные и лимбические связи. Внутри каждой сети предполагается наличие подсети, причем таким образом, чтобы у первичной моторной коры и премоторной коры были неидентичные связи со структурами базальных ганглий. Аналогично, дорзолатеральные и орбитолатеральные сети обладают особыми соединительными паттернами.

Из рис. 2 видно, что активность из коры приходит к определенным частям хвостатого ядра или неостриатума, отсюда – к определенным частям внутреннего сегмента *globus pallidus* (или эндопендикулярного ядра у грызунов) и ретикулярной части черной субстанции, отсюда – к определенным ядрам таламуса и обратно в соответствующую область коры. Мы полагаем, что наличие параллельных разделенных сетей позволяет также понять механизм стереотипного поведения, который может функционировать наподобие параллельных сетей. Например, стереотипия круговых движений, челночных движения, жевания, лизания, грызения и тому подобное. К такому роду стереотипии можно отнести и реакцию самостимуляции, которая возникает в определенных условиях, при активации префронтальной коры. В эти поведенческие стереотипии вовлекается и *nucleus accumbens* – ядро вентрального стриатума.

Хотя топография и соматотопия подразумевают определенную степень параллельной организации, есть также конвергенция и дивергенция в кортико-стриатных проекциях. Большие дендритные области средних звездчатых нейронов позволяют им получать вход от смежных проекций, которые приходят из различных областей коры. Входы больше чем от одной корковой области перекрываются (Flaherty, Graybiel, 1991; Mink, 2003; Miyachi, 2009), и вход от одиночной корковой области проецируется дивергентно к многочисленным зонам стриатума (Flaherty, Graybiel, 1991), например, сенсорно-двигательные корковые проекции – к стриатуму от областей руки в соматосенсорной коре (области 1, 2, и 3) и моторной коры (область 4). Таким образом, каждая корковая область проецируется к нескольким стриатальным зонам, и несколько функционально связанных корковых областей проецируются к одной стриатальной зоне. Эта сходящаяся и расходящаяся организация



Рис. 2. Предполагаемые параллельные разделенные сети, соединяющие базальные ганглии, таламус и кору головного мозга

Эти пять сетей называют согласно первичной корковой цели для выходов из базальных ганглий: двигательная, глазо-двигательная, дорзолатеральная префронтальная, боковая орбитофронтальная и передняя цингулярная. ДМО – дополнительная моторная область; АПО – аркуатная премоторная область; МК – моторная кора; СК – соматосенсорная кора; ФГО – фронтальные глазные области; ДЛП – дорзолатеральная префронтальная кора; ЗПК – задняя париетальная кора; ЛОФ – латеральная орбитофронтальная кора; ВВГ – верхний височный gyrus; НВГ – нижний височный gyrus; ПЦО – передняя цингулярная область; ГК – гиппокампальная кора; ЭК – энторинальная кора; PUT – putamen; КАУД – каудатус; ВС – вентральный стриатум, ГПв – внутренний сегмент globus pallidus; ЧСр – черная субстанция ретикулярная часть; VLо – передняя часть вентролатерального ядра; VLm – медиальная часть вентролатерального ядра; VAmc – магноцеллюлярная часть передневентрального ядра; MDpl – параламеллярная часть медиодорзального ядра; VArс – парвоцеллюлярная часть передневентрального ядра; MDpc – парвоцеллюлярная часть медиодорзального ядра; MDme – магноцеллюлярная часть медиодорзального ядра; BP – вентральный паллидум; т – тело; г – голова; cl – каудолатеральный; cdm – каудальный дорзомедиальный; dl – дорзолатеральный; l – латеральный; ldm – латеральный дорзомедиальный; m – медиальный; mdm – медиальный дорзомедиальный; pm – постеромедиальный; rd, ростродорзальный; rl – ростролатеральный; gm – ростромедиальный; vm – вентромедиальный; vl – вентролатеральный (Базян и др., 2011)

служит анатомической основой для интеграции и преобразования информации от нескольких областей коры головного мозга, в том числе и при условнорефлекторном обучении. Эти дивергентные и конвергентные связи могут интегрировать разные представительства в коре мозга, в том числе и представительства условного и безусловного раздражителей.

Показано, что холинергическая система стриатума имеет отношение к контролю позного компонента выученного движения (Шаповалова, 1996, 2000). Эти исследования являются развитием классических представлений о роли базальных ганглиев в контроле позы (Martin, 1967). Показана связь дофаминергических и холинергических механизмов стриатума в его интегративной деятельности (Pisani et al., 2001).

При этом обнаружены независимые дофаминергические системы управления позой и движением (Шаповалова, Камкина, 2009). Существенная роль принадлежит также взаимодействию холинергической и серотонинергической систем стриатума (Lehmann et al., 2000). Показаны различия нарушений обучения при поражениях стриатума и мозжечка: мозжечок преимущественно участвует в подготовке к движению, а нарушения функций nigro-стриатной системы при болезни Паркинсона приводят к нарушениям внутренней оценки и выбора (Schugens et al., 1998).

Обнаружена пластичность кортико-стриатных входов. Синаптическая пластичность регулируется дофамином (Calabresi et al., 2007). После денервации стриатума путем ипсилатеральной корковой ишемии происходит мощный рост аксонов контралатеральных кортико-стриатных нейронов (Civellietal, 1993; Carmichael, Chesselet, 2002). В начальной стадии паркинсонизма возникает дефицит стриато-фронтальных проекций, что приводит к активации связей дорзальной премоторной коры с моторной корой (Buhmann et al, 2004).

Согласно современным представлениям, принятие решения и выбор правильной реакции для получения подкрепления обусловлены функциональной активностью дофаминергической системы (Schultzetal, 1997; Schultz, 1998). Показано, что уровень дофамина в нейронах среднего мозга изменяется в соответствии с вероятностью стимула предшествовать подкреплению (Tobler et al., 2005). Физические ответы дофаминергических нейронов возникают при неожиданном подкреплении. После повторных сочетаний условного стимула с подкреплением эти ответы начинают возникать при предъявлении условного стимула. Активность дофаминергических нейронов тормозится при неподкреплении условного стимула. Таким образом, дофаминергическая система кодирует возможную ошибку получения подкрепления и способствует обучению поведению, приводящему к максимуму подкрепления. Это поведение хорошо соответствует вычислительной модели (Suri, 2002). Через рецепторы D1, D2, D3, D4 и D5 дофамин снижает активность непрямого выхода из стриатума и повышает активность прямого выхода.

2. Роль субталамического ядра в регуляции двигательного поведения

Субталамическое ядро (СТЯ) представляет собой структуру двояковыпуклой формы, окруженную плотными пучками миелинизированных волокон. Функционально ядро делится на ростральный и каудальный отделы. Ростральный отдел подразделяется на меньшую медиальную и большую латеральную части. Считается, что медиальная часть связана с лимбическими и частично с ассоциативными функциями, тогда как вентральная область латеральной части рострального отдела имеет отношение к ассоциативным функциям, а дорзальная область латеральной части рострального отдела и каудальный отдел связаны с двигательными функциями (Parent, Hazrati, 1995; Joel, Weiner, 1997). СТЯ получает афферентные волокна из первичной, дополнительной моторной и премоторной коры, префронтальной коры,

поясной извилины, соматосенсорной и инсулярной корковых областей. Корковые проекции являются глутаматергическими. Аfferентные пути к СТЯ идут также из наружной части бледного шара (ГАМК-ергические), из парафасцикулярного и центромедианного ядер таламуса (глутаматергические), черного вещества (дофаминергические), ядер шва (серотонинергические) и покрышки (холинергические). Из эfferентных путей хорошо определены субталамо-паллидарные, идущие к наружной и внутренней частям бледного шара, субталамо-нигральные, оканчивающиеся в компактной и ретикулярной частях черной субстанции, субталамо-стриатные и субталамо-вентральнотеgmentальные.

От 30 до 50% нейронов СТЯ вовлечены в регуляцию движений. Большинство из них располагается в дорзальных отделах ядра и активируется при активных или пассивных движениях одиночных контралатеральных суставов (DeLong et al., 1985). Около 20% нейронов СТЯ участвуют в фиксации взгляда, саккадических движениях и реакциях на зрительные стимулы (Matsumura et al., 1992). Характерной особенностью нейронов СТЯ являются осцилляции. Осцилляторный цикл состоит из медленной деполяризации, потенциала действия и последующей постгиперполяризации (Bevan, Wilson, 1999). Деполяризация вызывается тетродоксин-чувствительными потенциал-зависимыми натриевыми токами или низкопороговыми кальциевыми токами, которые активируются при мембранном потенциале, чуть более отрицательном, чем потенциал покоя. Это приводит к вхождению натрия и кальция в клетки и генерации потенциала действия. Помимо обычной гиперполяризации для осциллирующих клеток характерна активация кальций-зависимых калиевых каналов, которая усиливает гиперполяризацию и вызывает постгиперполяризационные потенциалы. Эти потенциалы обеспечивают активацию новых медленных деполяризационных токов и следующий цикл осцилляции (Bevan, Wilson, 1999).

3. Нейрохимическая организация структур моторного контроля

Нейрональные системы головного мозга млекопитающих можно разделить на две категории: иерархические нейросетевые синаптические системы и паракринные, неспецифические или диффузные несинаптические нейромодуляторные системы (Аршавский и др., 1984; Шепард, 1987; Nicoll et al., 1990; Базян, 2001). Синаптическая информация передается с помощью химической активации постсинаптических ионотропных рецепторов, включающих в свою структуру катионный канал, вызывающий возбуждающий постсинаптический потенциал (ВПСП), или анионный канал, вызывающий тормозной постсинаптический потенциал (ТПСП). Синаптические контакты имеют четкое морфологическое строение: пресинаптическое окончание, синаптическая щель и постсинаптическая мембрана. Основными системами, передающими информацию с помощью ВПСП, являются глутаматергическая (AMPA, каинатный и NMDA-рецепторы) и холинергическая (никотиновый холинорецептор) (Sigma-RBI Handbook..., 2006; Alexander et al., 2011). Постсинаптический ионотропный никотиновый холинорецептор с натриевым каналом

обнаружен только в четырех структурах мозга, в том числе, на промежуточных нейронах стриатума (Шепард, 1987; Nicoll et al., 1990; Базян, 1999, 2001; Mink, 2003). Ионотропных рецепторов с анионными каналами два: ГАМКА рецептор и глициновый рецептор (Sigma-RBI Handbook..., 2006; Alexander et al., 2011). Глициновый ионотропный рецептор обнаружен в ограниченном количестве структур головного мозга млекопитающих, поэтому синаптическая информация в головном мозге передается в основном с помощью глутаматергических и ГАМКергических синапсов. Имеются также пуринергические (АТФ и аденозиновые) ионотропные рецепторы, но их функция в этой работе не анализируется.

Паракринных, неспецифических или диффузных несинаптических нейромодуляторных систем очень много. Особенностью этих систем является морфологическое строение; нейроны паракринных модуляторных систем локально расположены в определенных структурах мозга, а их длинные терминали с варикозными расширениями распространяются очень далеко, иннервируя большое количество структур мозга. Особенностью нейромодуляторных систем является и то, что их рецепторы метаботропные и не включают в свою структуру ионотропный канал (Sigma-RBI Handbook..., 2006; Alexander et al., 2011). Они запускают внутриклеточные метаболические реакции, то есть трансдукционный сигнал, модифицируют активность внутриклеточных функциональных белков и, в конечном счете, модифицируют экспрессию генов клетки (Базян, Хашаев, 2010; Greengard et al., 1999; Bazyan, van Luijtelea, 2013). К паракринным нейромодуляторным системам относятся: моноамины (норадреналин, дофамин, серотонин), мускариновая холинергическая система и нейропептиды. Во многих работах под электронным микроскопом просматриваются элементы, похожие анатомически на синаптические контакты в моноаминергических системах. Но эти синаптоподобные контакты не могут называться синапсами, так как они не генерируют ВПСП или ТПСР вследствие того, что все их рецепторы метаботропные. Здесь мы можем говорить только о физической модуляторной реакции.

Но самое интересное состоит в том, что если модуляторные системы никогда не проявляют синаптических реакций, то у синаптических систем широко представлены модуляторные реакции. Например, глутаматергическая система наряду с тремя ионотропными (AMPA, каинатный и NMDA) рецепторами обладает восьмью метаботропными (mglu1 – mglu8) рецепторами (Sigma-RBI Handbook..., 2006; Alexander et al., 2011). ГАМК-система обладает двумя рецепторами: ионотропным (ГАМКА) и метаботропным (ГАМКВ) (Sigma-RBI Handbook..., 2006; Alexander et al., 2011). Но ГАМКА-рецептор, являясь ионотропным (хлорный канал открывается при взаимодействии ГАМК с ГАМК-сайтом ГАМКА-рецептора), в то же время обладает четырьмя сайтами связывания (бензодиазепиновый, пикротоксиновый, барбитуратный и нейростероидный), которые осуществляют аллостерическую модуляцию ответа ГАМК–хлорный канал. Но, кроме того, нейростероидный и, вероятно, бензодиазепиновый сайт индуцируют трансдукционный сигнал (Базян, Хашаев, 2010). Кроме того, в головном мозге млекопитающих широко представлена холинергическая модуляторная мускариновая система (Шепард, 1987; Николлс и др., 2003).

3.1. Медиаторные синаптические системы дорзального стриатума и их роль в регуляции моторного поведения

Одно из принципиальных различий между физиологической реакцией медиаторной и модуляторной передачи состоит, кроме всего прочего, во времени реакции. Синаптические реакции – очень быстрые, они измеряются миллисекундами, тогда как только латентные периоды модуляторных реакций измеряются сотнями миллисекунд (от 200 до 500 мс, в зависимости от модуляторной системы).

Синаптические системы осуществляют процессы быстрого реагирования. Они представляют группу поведенческих исполнительных реакций или быстро организуемых рефлекторных актов, осуществляемых за очень короткое время. Информация по кортико-стриатным, стриато-таламическим и таламо-кортикальным сетям передается в миллисекундных интервалах (Mink, 2003). Как указывалось выше, одной из ключевых структур, участвующих в реализации поведения, является дорзальный стриатум, или неостриатум. Выше упоминалось, что по сравнению с другими мозговыми областями неостриатум является в высшей степени однородным. Приблизительно 95% его нейронов имеют однотипную морфологию и являются звездчатыми нейронами среднего размера. Это единственные проекционные нейроны в неостриатуме, и их функция связана с интеграцией всех входов в эту мозговую область (Nikosaka et al., 2000; Mink, 2003). Звездчатые нейроны неостриатума получают возбуждающую глутаматергическую синаптическую информацию через AMPA, каинатные и NMDA-рецепторы практически из всех областей неокортекса (Mink, 2003). Сами звездчатые нейроны ГАМК-ергические, то есть используют ГАМК как передающий информацию медиатор, реакция которого осуществляется через постсинаптический ГАМКА-рецептор. Постсинаптические ГАМКА-рецепторы локализованы как на дендритах и соме средних звездчатых стриатных нейронов, так и на нейронах бледного шара, энтопедункулярного ядра и ретикулярной части черной субстанции (Mink, 2003).

Средние звездчатые нейроны хвостатого ядра (*nucleus caudatus*) и скорлупы (*putamen*, или неостриатум) морфологически идентичны, но отличаются нейрохимически. Одна популяция этих нейронов содержит ГАМК, диноρφин, и вещество Р как котрансмиттеры и преимущественно экспрессирует D1-рецепторы. Эти нейроны посылают аксоны во внутренний паллидум (ГПв) и в ретикулярную часть черной субстанции (ЧСрч) (см. рис. 1) и дают начало прямому пути, который, тормозя интернейроны локальной сети таламуса, активирует нейроны таламокортикального входов. Вторая популяция средних звездчатых нейронов содержит ГАМК и энкефалин как котрансмиттер и преимущественно экспрессирует D2-рецепторы. Эти нейроны проецируются к внешнему паллидуму (ГПвне), дают начало не прямому пути и тормозят нейроны таламокортикального входа. Эти две популяции средних звездчатых нейронов, являясь морфологически неразличимыми, также не отделены топографически в пределах стриатума (Mink, 2003). Такое совместное распределение нейронов предполагает, что они получают общий вход и, таким образом, они могут передать сходную информацию своим соответствующим целям.

Однако различие целей и различие типов передатчика этих двух популяций обеспечивают разделение функций в пределах стриатума.

В том случае, когда непрямой ГАМК-ергический путь оканчивается на нейронах ретикулярного ядра таламуса (РЯТ, см. рис. 1), то ингибирование этих нейронов вызывает пачечную активность и осцилляции в таламо-кортикальных нейронах (burstneurons). Это очень интересное явление, так как обычно нейроны активируются с помощью возбуждающих систем. А здесь торможение, или гиперполяризация, вызывает пачечную активность в таламо-кортикальных нейронах. Причиной этой реакции является то, что в нейронах ретикулярного ядра таламуса и соматосенсорной коры локализованы два потенциал-зависимых канала: I_h -канал (Clapham, 1998; Bazyan, van Luijtelaar, 2013) и низкопороговый Ca^{2+} -канал Т-типа ($I_{Ca^{2+T}}$) (Buzsaki et al., 1990; Bazyan, van Luijtelaar, 2013). Активируемый гиперполяризацией катионный I_h -канал, воротный механизм которого зависит от вторичных посредников, или канал Франчески I_f (для периферической системы), названный в честь его первооткрывателя (DiFrancesco, 1985), активируется при гиперполяризации, когда мембранный потенциал достигает -80 мВ (Clapham, 1998). Низкопороговый Ca^{2+} -канал Т-типа $I_{Ca^{2+T}}$ открывается при гиперполяризации, когда мембранный потенциал достигает -90 мВ (Irisawa et al., 1993). Эти два канала взаимосвязаны, так как ингибирование $I_{Ca^{2+T}}$ -канала уменьшает пачечную активность I_f пейсмекерного канала (Hagiwara et al., 1988).

Подробное описание функционирования I_h приведены в двух наших обзорах (Базян, Сегал, 2010; Bazyan, van Luijtelaar, 2013). Активируемые гиперполяризацией и модулируемые цАМФ HCN каналы способствуют непосредственной ритмической активации соматосенсорной коре и в ретикулярном ядре таламуса. Известны 4 изоформы субъединиц этого канала (HCN1–HCN4). Каналы HCN, или иначе I_h -каналы, похожи на потенциал-зависимые K^+ -каналы, они являются тетрамерными и составлены из мономерных субъединиц, состоящих из шести трансмембранных сегментов (S1–S6) с формирующей пору P-петлей между S5- и S6-сегментами или доменами. Различные HCN-субъединицы могут быть совместно объединены друг с другом и формировать гетеромультимерный комплекс, значительно увеличивая разнообразие нативных I_h -каналов. Канал HCN1 показывает минимальное изменение в ответ на связывание цАМФ ($+4$ мВ) со специфическим цАМФ-связывающим участком, тогда как HCN2-канал показывает выраженное изменение ($+17$ мВ). Коэкспрессия HCN1 и HCN2 формирует гетеромультимерный канал и приводит к I_h -токам, которые имеют тенденцию приобретать промежуточные свойства относительно HCN1 и HCN2 гомомерных каналов.

Экспериментальные результаты позволяют предположить, что I_h -канал и низкопороговый Ca^{2+} -канал Т-типа ($I_{Ca^{2+T}}$) работают в тандеме. Гиперполяризация открывает I_h -канал и катионный ток деполяризует мембрану до порогового уровня и вызывает спайк. Гиперполяризация открывает также $I_{Ca^{2+T}}$ канал. Вошедший внутрь Ca^{2+} индуцирует Ca^{2+} -зависимый синтез цАМФ, который, связываясь с CNBD локусом HCN-субъединиц, резко усиливает активность канала. Так как HCN1-субъединица слабо реагирует на связывание цАМФ, то уменьшение HCN1-

субъединиц в составе канала повышает пейсмекерную активность, а увеличение HCN1-субъединиц в составе канала понижает пейсмекерную активность. Анализ приведенных экспериментальных данных показывает, что одним из основных механизмов длительной регуляции активности Ih-пейсмекера является модификация количества HCN1-субъединиц в композиции или в составе пейсмекерного канала. Предполагается, что источником сонных веретен и пик – волновых разрядов в ЭЭГ, является Ih-пейсмекерный канал, локализованный в ретикулярном ядре таламуса и в пирамидных нейронах 3, 4 и 5 слоя соматосенсорной коры. Фармакологические исследования подтверждают это предположение.

Ретикулярное ядро таламуса является структурой, которая получает ГАМК-ергическое торможение из базальных ганглий – ключевых структур, которые участвуют в реализации поведения. Обзор экспериментальных работ показал, что благодаря локализации I_h и $I_{Ca^{2+}_T}$ -каналов в нейронах ретикулярного ядра таламуса, неокортекса гиперполяризация и деполяризации вызывают пачечные разряды в нейронах, которые активируют таламокортикальные сети и способствуют процессам реализации поведения.

Взаимодействие I_h и $I_{Ca^{2+}_T}$ -каналов (рис. 3) описано с помощью схемы и количественной модели (Bazyan, van Luijtelaa, 2013).

Тандем I_h и $I_{Ca,T}$ работает следующим образом.

Гиперполяризация открывает I_h -канал мембрана деполяризуется на величину N. Одновременно гиперполяризация открывает $I_{Ca^{2+}_T}$ -канал. Ca^{2+} входит в клетку, усиливает аденилат циклазу, повышает концентрацию цАМФ. цАМФ связывается с CNBD-доменом и усиливает воротный механизм на величину M.

Общая величина деполяризации $I_{hDep} = N+M$.

Когда I_h -канал состоит из 4 HCN1-субъединиц, при взаимодействии цАМФ с CNBD HCN1-субъединицы воротный механизм усиливается и деполяризация повышается на 4 mV (Chenetal, 2001).

При этом: $4(HCN1); I_{hDep} = N+(4 \times 4) mV = N+16 mV$.

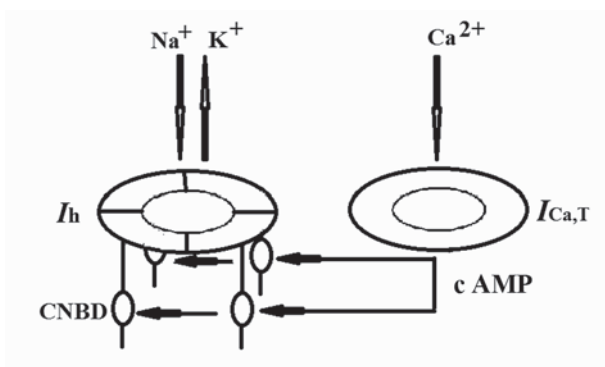


Рис. 3. Схематическое представление взаимодействия I_h и $I_{Ca^{2+}_T}$ -каналов. I_h – активируемый гиперполяризацией, циклический нуклеотид активируемый катионный канал, $I_{Ca,T}$ – низкопороговый Ca^{2+} -каналов T-типа, CNBD (cyclic nucleotide – binding domain) – область связывающая циклический нуклеотид. Объяснения в тексте (Bazyan, van Luijtelaa, 2013)

При взаимодействии цАМФ с CNBD HCN2-субъединицы воротный механизм усиливается и деполяризация повышается на 17 mV (Chen et al., 2001).

Когда уменьшается содержание HCN1-субъединицы в композиции канала, то увеличивается содержание HCN2-субъединицы, то есть за счет кругооборота I_h-канал теряет HCN1-субъединицы и замещает их HCN2-субъединицами

Субъединичные композиции:

$$3(\text{HCN1}) \text{ и } 1(\text{HCN2}); I_{h, \text{Dep}} = N + (3 \times 4)\text{mV} + (1 \times 17)\text{mV} = N + 29 \text{ mV}$$

$$2(\text{HCN1}) \text{ и } 2(\text{HCN2}); I_{h, \text{Dep}} = N + (2 \times 4)\text{mV} + (2 \times 17)\text{mV} = N + 42 \text{ mV}$$

$$1(\text{HCN1}) \text{ и } 3(\text{HCN2}); I_{h, \text{Dep}} = N + (1 \times 4)\text{mV} + (3 \times 17)\text{mV} = N + 55 \text{ mV}$$

$$4(\text{HCN2}); I_{h, \text{Dep}} = N + (4 \times 17)\text{mV} = N + 68 \text{ mV}$$

ГАМК-ергические, поэтому потеря HCN1 субъединиц повышает пейсмекерную активность I_h-канала.

Таким образом, аксоны нейронов неостриатума вызывают пачечную активность в таламических и корковых нейронах и запускают таламо-кортикальные сети, которые участвуют в регуляции моторного поведения. Устойчивый уровень активности нигростриарной дофаминергической (ДА) системы обеспечивает устойчивое торможение стриатных выходов.

3.2. Дофаминергическая система среднего мозга и ее роль в регуляции моторного поведения

Известно, что ДА-нейроны среднего мозга объединены в три группы клеток: А8, А9 и А10 (Roth et al, 1987, 1995). Группа А10 ДА-нейронов (рис. 4) локализована в вентромедиальной области покрывки среднего мозга (ВМО). Несколько латеральнее ДА-ергические нейроны компактной части черной субстанции формируют клеточную группу А9 (см. рис. 4). Нейронная группа А8 занимает более каудальную позицию в ретрорубральном поле среднего мозга (см. рис. 4). Терминали этих групп нейронов формируют проекции, которые образуют нигростриатную и мезокортиколимбическую ДА-ергические системы мозга. Нигростриатная система формируется в основном нейронами группы А9, тела которых расположены в компактной части черной субстанции. Терминали аксонов этих нейронов заканчиваются в области хвостатого ядра, или неостриатума. Мезокортиколимбическая ДА-ергическая система в большей своей части формируется телами нейронов А10. Аксоны мезокортиколимбической ДА-системы оканчиваются в вентральной части стриатума – прилежащем ядре, обонятельных бугорках, центральном и базолатеральном ядрах миндалевидного комплекса, в перегородке, гиппокампе, в префронтальной, передней цингулярной, энторинальной, периформной корковых областях и в глубоких слоях фронтальной коры.

Как указано выше, нигростриатная ДА-система контролирует активность ГАМК и глутаматергических синапсов неостриатума, которые, в свою очередь, активируют таламокортикальные сети и регулируют моторное поведение животных и человека. Подробно, индукция внутриклеточных сигналов ДА-рецепторами и контроль активности ГАМК и глутаматергических синапсов средних звездчатых нейронов неостриатума описаны в работе П. Грингарда и соавторами (Greengard

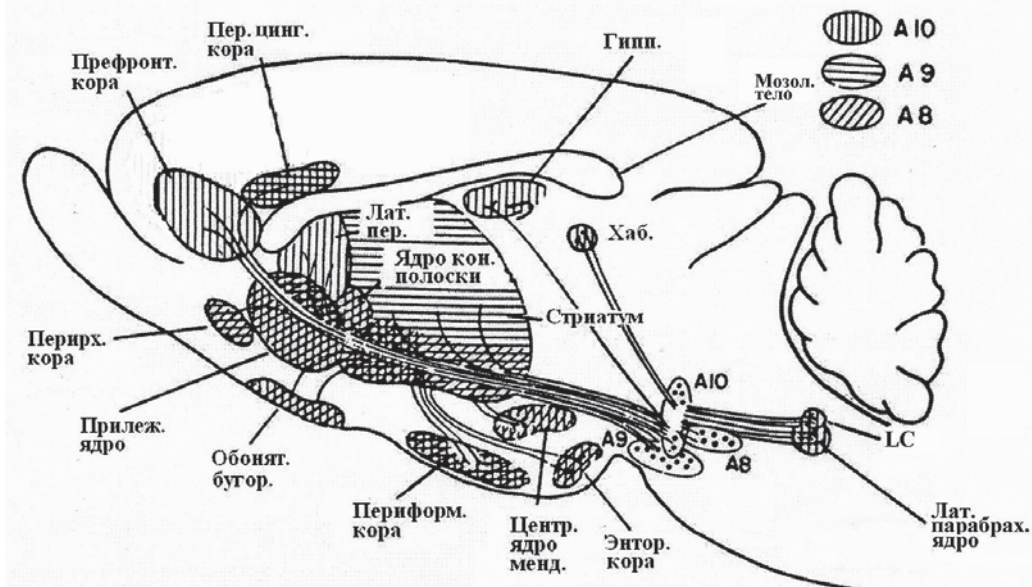


Рис. 4. Схема мезокортиколимбической и nigrostriальной дофаминергических систем мозга крысы. А8, А9, А10 – три группы дофаминергических нейронов среднего мозга

Штриховкой обозначены структуры, к которым адресуются терминалы соответствующих нейронов: А8 – косая штриховка, А9 – горизонтальная штриховка, А10 – вертикальная штриховка. LC – locus coeruleus (голубое пятно), группа норадренергических нейронов среднего мозга. Лат. парабрах. ядро – латеральное парабрахиальное ядро. Энтор. кора – энторинальная кора. Центр. ядро манд. – центральное ядро миндалин. Периформ. кора – периформная кора. Обонят. бугор. – обонятельный бугорок. Прилеж. ядро. – прилежащее ядро. Перирх. кора – перирхинальная кора. Префронт. кора – префронтальная кора. Фронт. кора – фронтальная кора. Пер. цинг. кора – передняя цингулярная кора. Соматосенс. кора – соматосенсорная кора. Лат. пер. – латеральная перегородка. Ядро кон. полоски – ядро конечной полоски. Стриатум – стриатум. Хабу. – хабенула. Гипп. – гиппокамп. Мозол. тело – мозолистое тело (Roth et al., 1987)

et al., 1999). Как следует из предложенной схемы (рис. 5), ДАРФП-32/ФП-1 (ДА регулируемый фосфопротеин 32 килодальтон/фосфопротеин-1) интегрирует информацию от ряда нейротрансмиттеров и вызывает координированные реакции, включающие работу некоторых выходных физиологических эффекторов. Фосфорилирование ДАРФП-32 через протеинкиназу А (ПКА) регулируется действием разных нейротрансмиттеров. ДА действует через D1-рецептор, аденозин действует через аденозиновый A2A-рецептор, вазоактивный интестинальный пептид (ВИП) – через соответствующий ВИП-рецептор. Протеинкиназа G (ПКГ) активирует ответ оксида азота (НО) также фосфорилированием ДАРФП-32. В звездчатых клетках среднего размера, которые экспрессируют D1- и D2-типы ДА-рецепторов, активация D2-рецепторов вызывает уменьшение уровня цАМФ. Опиоиды, действующие или через μ - или через δ -рецепторы, уменьшают уровень цАМФ в стимулируемых D1-агонистами клетках или аденозиновыми A2A-агонистами соответственно. Фос-

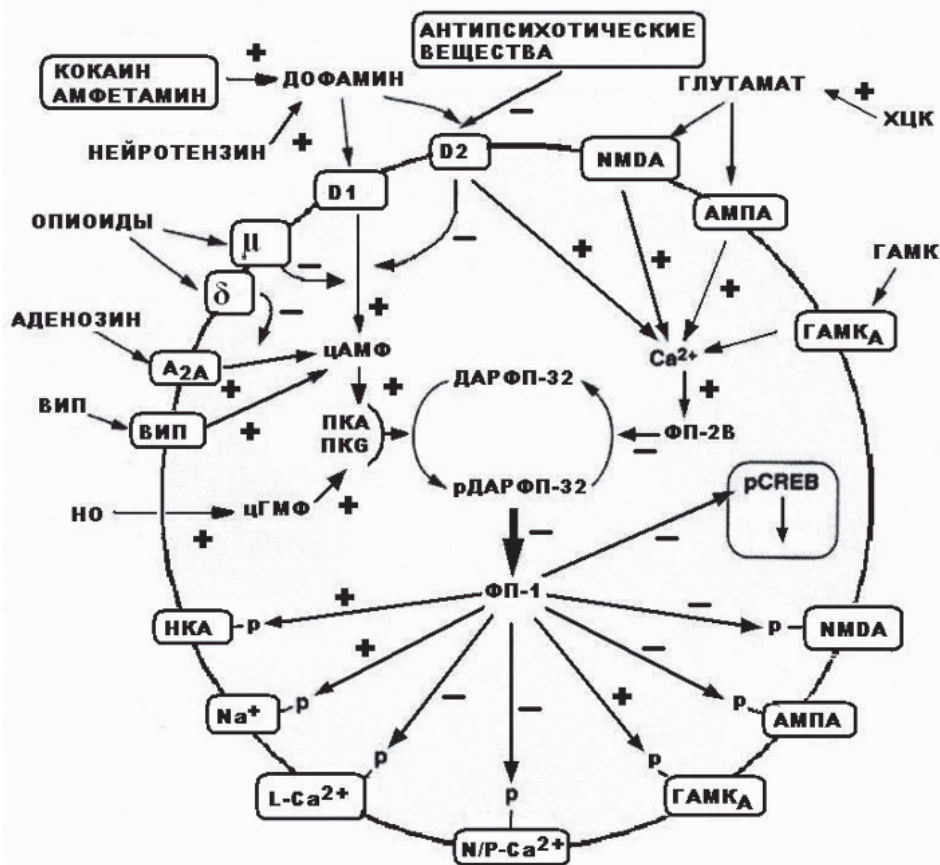


Рис. 5. Центральная роль ДАРФП-32/ФП-1 каскада в индукции внутриклеточной сигнализации в средних звездчатых нейронах неостриатума

ДАРФП-32 – дофамин и циклический аденозин 3', 5' – монофосфат-регулируемый фосфопротеин, 32 kDa. ВИП – вазоактивный интестинальный пептид и рецептор к пептиду. НО – оксид азота. PKA – протеинкиназа А. PKG – протеинкиназа G. ФП-1 – фосфопротеин-1. ФП-2В – фосфопротеин-2В. цАМФ – циклический аденозин 3', 5' монофосфат. цГМФ – циклический гуанозин 3', 5' монофосфат. ХЦК – холицистокинин. ГАМК – гамма-аминомасляная кислота. ГАМК_A – подтип ГАМК-рецептора. NMDA – N-метил-D-аспаратный подтип глутаматного рецептора. АМПА – альфа-амино-3-гидрокси-5-метил-4-изоксазол-пропионатный подтип глутаматного рецептора, D1 и D2 – подтипы дофаминового рецептора. μ и δ – подтипы опиоидных рецепторов. А2А – подтип аденозинового рецептора. L- Ca^{2+} – кальциевый канал L-типа. N/P- Ca^{2+} – кальциевые каналы N- и P-типов. Na^+ – натриевый канал. НКА – натри-калиевая АТФаза. Стрелки – усиление (знак +) или ингибирование (знак -) реакций (Greengard et al., 1999, модифицировано)

форилированный ДАРФП-32 дефосфорилируется ФП-2В и Ca^{2+} -калмодулин-зависимой протеинфосфатазой. Фосфопротеин-2В (ФП-2В) активируется рецепторами нескольких нейротрансмитеров, в основном опосредованных Ca^{2+} -током NMDA-рецептора. Действие глутамата через АМПА-рецептор также стимулирует дефосфорилирование ДАРФП-32 через ФП-2В, который вовлекается деполяризацией нейрона и Ca^{2+} -током. Активация D2-рецепторов также ведет к увеличению

уровня Ca^{2+} через неидентифицированный механизм и увеличивает активность ФП-2В. Наоборот, действие ГАМК через ГАМКА-рецептор стимулирует ДАРФП-32 фосфорилирование гиперполяризацией нейрона, уменьшением Ca^{2+} -тока и инактивацией ФП-2В. Нейротензин усиливает выделение ДА и увеличивает фосфорилирование ДАРФП-32. Холицистокинин (ХЦК) усиливает глутаматергическую передачу и уменьшает фосфорилирование ДАРФП-32. Психомоторная стимуляция кокаином и амфетамином увеличивает фосфорилирование ДАРФП-32 усилением ДА-передачи. Все антипсихотические вещества достигают определенного клинического эффекта через антагонизм D2-рецепторов, ведущий к увеличению фосфорилирования ДАРФП-32. Фосфо-ДАРФП-32 ингибируется активностью ФП-1, действуя в синергической манере с разными протеинкиназами (в основном с PKA и PKC; на рис. 4 не показано), увеличивая уровень фосфорилирования различных эффекторных белков. В результате увеличение фосфорилирования ассоциируется с увеличением активности NMDA и АМПА рецепторов глутамата, L-, N-, и P-типа Ca^{2+} -каналов, и с уменьшением активности ГАМКА-рецепторов, Na^+ -каналов, и Na^+/K^+ -АТФазы. ФП-1 фосфорилирует CREB, который является ранним геном, промотором экспрессии поздних генов. Таким образом, трансдукционный сигнал в конечном счете модифицирует экспрессию генов, которые консолидируют модификации, вызванные модуляторными реакциями.

Предполагается, что ГАМК и глутаматовые рецепторы взаимодействуют через единую интегрирующую систему (Базян, Хашаев, 2010; Bazyan, vanLuijtelaaar, 2013), взаимодействуя через внутриклеточные метаболитные реакции, т.е. через трансдукционный сигнал, что экспериментально показано во многих исследованиях. Так, например, при ПТЗ-индуцируемом киндлинге редукция ГАМК-ергической функции блокируется антагонистом NMDA-рецепторов МК-801 (Corda et al., 1992). NMDA-рецептор вовлекается в процесс формирования киндлинга, индуцируемого FG 7142, обратного агониста БДЗ-рецептора (Stephens, Turski, 1993). Киндлинг, продуцируемый высокочастотной стимуляцией гиппокампа, индуцирует повышение активности NMDA-рецептора (Pratt et al., 1993), также как модификацию ГАМКА-рецептора (Kokaia et al., 1994). В то же время, было обнаружено, что NMDA-индуцируемая долговременная потенция может контролироваться регуляторными системами ГАМКА-рецепторного комплекса, ингибирование агонистами БДЗ-рецепторов (Evans, Viola-McCabe, 1996; Higashima et al., 1998), а также облегчение антагонистами тех же рецепторов (Seabrook et al., 1997; Stackman et al., 1996). И наоборот, NMDA-антагонист CPP может модулировать долговременную модификацию (толерантность) БДЗ-рецептора (Koff et al., 1997). Возможная схема взаимодействия и интеграции ГАМКА и глутаматергических рецепторов на уровне внутриклеточной сигнализации через трансдукционный сигнал приведена на рис. 6.

Возможно, что БДЗ-рецептор – один из сайтов ГАМКА супрамолекулярного рецепторного комплекса, запускает внутриклеточные метаболические реакции (Johnston et al., 1998; Niles et al., 1997), который и является объектом долговременной модификации. Любой долговременно сохраняющийся процесс поддерживается модификацией экспрессии генов (Stanton, Sarvey, 1985; Ito, 1984, 1989, 1993;

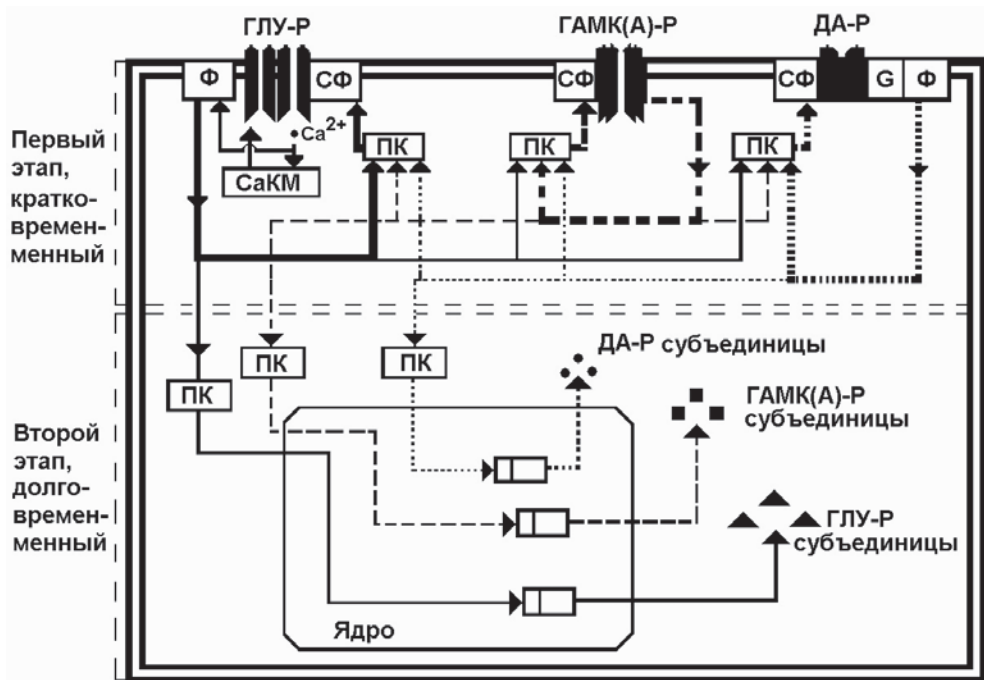


Рис. 6. Схематическая модель внутриклеточной интеграции на уровне трандукционного сигнала
 ГЛУ-Р – глутаматергические рецепторы; ГАМК(А)-Р – ГАМКА-рецептор; ДА-Р – дофаминергические рецепторы; Ф – ферменты, синтезирующие вторичные посредники (подробнее см. рис. 5); СФ – субстрат фосфорилирования (для ГАМК(А)-Р – внутриклеточная петля между 3–4 доменами; для ГЛУ-Р – внутриклеточная С-концевая терминаль 4-го домена и внутриклеточные петли между 3–2 и 2–1 доменами; для ДА-Р – внутриклеточная С-концевая терминаль 7-го домена и внутриклеточные петли между 6–5 и 4–3 доменами); G – G-белок; ПК – протеин киназа; СаКМ – кальций/калмодулин-зависимая протеин киназа. Трансдукционный сигнал, опосредованный глутаматергическими рецепторами, представлен сплошной линией. Трансдукционный сигнал, опосредованный ГАМКА-рецептором, представлен крупными пунктирными линиями. Трансдукционный сигнал, опосредованный дофаминергическими рецепторами, представлены мелкими пунктирными линиями (Bazyan, van Luijcklaar, 2013). Детали см. в тексте

Ito, Karachot, 1992; Prattetal, 1993; Smirnova et al., 1993; Kokaia et al., 1994; Biewenga et al., 1996; Deadwyler et al., 1987; Hicks et al., 1997; Brooks-Kayal et al., 1998). БДЗ-рецептор, действуя через систему вторичных посредников и протеин киназу С, может индуцировать медленные метаболические реакции внутри клетки и модифицировать экспрессию генов в различных структурах мозга крыс (Olsen et al., 1986; Macdonald, Olsen, 1994; Niles et al., 1997; Johnston et al., 1998). В частности, этот процесс в стриатуме приведен на рис. 5. Известно, что ГАМКА-рецепторы регулируются фосфорилированием опосредованном через протеин киназу С и G (Mayse, DeVietti, 1971; Krishek et al., 1994). Когда в нейронах активность протеинкиназных реакций усиливается, то хлорный ток, текущий через ГАМКА-рецептор, редуцируется (Pasqualotto et al., 1993).

Изменение уровня внутриклеточного фосфорилирования протеинкиназой может модифицировать глутаматергические рецепторы (Corda et al., 1992; Stephens, Turski, 1993; Evans, Viola-McCabe, 1996; Stackman et al., 1996; Seabrook et al., 1997; Higashima et al., 1998), повышая их ответ на эндогенные возбуждающие аминокислоты. Метаботропная регуляция глутаматергического синапса (см. рис. 6) идентична описанным процессам, как в нейронах гиппокампа (Mayford et al., 1995), так и в нейронах коры и стриатума. Мы добавили петлю обратной связи для метаботропной регуляции NMDA. Мы предполагаем, что механизм обратной связи метаботропной регуляции или ауторегуляции рецепторов через модуляторные реакции является необходимым условием для поддержания процессов долговременной потенциации или долговременной депрессии. Регуляция AMPA и ауторегуляция NMDA-рецепторов в гиппокампе были исследованы экспериментально (Bayazitov, Kleshchevnikov, 2000).

Хорошо известно (Базян, Григорьян, 2006), что ДА-система мозга является системой поощрения и подкрепления, которая, как предполагается, напрямую вовлекается в процессы обучения и памяти. Кроме того, ДА-система вовлекается в формирование различных эпилептоформных состояний (Buzsaki et al., 1990; Al Tajir, Starr, 1991; Ogren, Pakh, 1993; Amabeoku, Chikuni, 1994; Bazyan, 2011; Bazyan, vanLuijste-laar, 2013). Полученные нами результаты (Bazyan et al., 2001; Базян, Хашаев, 2010) позволили нам предположить, что ДА-рецепторы и ГАМКА-рецепторы мозга взаимодействуют и модифицируют друг друга, интегрируясь и формируя зависимое от воздействий (обучение, судороги и так далее) эмоциональное состояние. Мы также предполагаем, что это взаимодействие и интеграция завершается внутриклеточной метаботропной интеграцией глутамат ГАМКА ДА-рецепторов (см. рис 5, 6).

Функциональное взаимодействие глутаматных и ДА-рецепторов стриатума были описаны в нескольких работах (Amalric et al., 1994; Baunez et al., 1994), в которых было обнаружено реципрокное или антагонистическое взаимодействие. Анализ большого количества результатов позволили Р. Коттеру (Kotter, 1994) предложить концепцию постсинаптической интеграции глутаматергических и ДА-сигналов в стриатуме на основании взаимодействия внутриклеточных вторичных посредников. Было показано (Chen et al., 1996), что индукция долговременной депрессии низкочастотной стимуляцией нейронов поля CA1 гиппокампа находится под влиянием обоих и NMDA- и ГАМК-рецепторов и оба D1- и D2 ДА-рецептора вовлекаются в модуляцию долговременной депрессии; при этом активация D1 ДА-рецептора усиливает долговременную депрессию, а активация D2 ДА-рецептора ингибирует долговременную депрессию. Ингибирование долговременной депрессии блокируется пикротоксином, но этот эффект приостанавливается SKF-38393-агонистом D1-рецепторов. Наши результаты (Базян, Хашаев, 2010) также указывают на синергичное взаимодействие ГАМКА- и ДА-рецепторов при воспроизведении памяти.

Метаботропная интеграция глутамат ГАМК- и ДА-рецепторов схематически показана на рис. 6. ДА-рецепторы могут подвергаться аутомодификации петель метаботропной обратной связи, когда модифицируют активность глутамат и ГАМК-рецепторов сигналами внутриклеточного фосфорилирования. С помощью той же

самой реакции внутриклеточного фосфорилирования глутамат и ГАМК-рецепторы могут контролировать эффективности ДА-рецепторов. На втором этапе модификация, сформированная первым этапом, консолидируется модификацией экспрессии соответствующих генов.

Способность ДА-рецепторов подвергаться аутомодификации была продемонстрирована как на уровне связывания радиоактивных лигандов, так и на уровне экспрессии генов в различных структурах мозга и при различных экспериментальных процедурах (See et al., 1989, 1990; Qin, Weiss, 1994).

Схема внутриклеточной интеграции на уровне трансдукционного сигнала для звездчатых нейронов неостриатума подробно описана (см. рис. 5, 6). Обе схемы и наша (Bazyan, van Luijtelaar, 2013), и Грингарда (Greengard et al., 1999), в основном похожи, но есть несколько принципиальных отличий.

Схема Грингарда описывает только первый этап реакции, то есть в основном процессы фосфорилирования и дефосфорилирования (см. рис. 5). В то время как наша схема (см. рис. 6) описывает двухэтапный процесс. Первый этап – кратковременный (минуты), процессы фосфорилирования и дефосфорилирования. Второй этап – долговременный (часы сутки месяцы), основанный на процессах модификации экспрессии генов.

Самое основное различие заключается в том, что наша схема описывает не только взаимомодификацию активности рецепторов, но и их аутомодификацию с помощью механизмов обратной связи. В случае с ГАМКА-рецептором аутомодификация с помощью обратной связи осуществляется через механизм аллостерической пластичности ГАМКА-рецептора.

3.3. Роль холинергической системы стриатума в регуляции двигательного поведения

Основной возбуждающий вход на холинергические интернейроны стриатума идет от глутаматергических нейронов парафасцикулярного ядра таламуса. Таламическая регуляция холинергических нейронов включает еще непрямой тормозный компонент, обеспечиваемый аксональными коллатеральными ГАМК-ергическими шпиковыми нейронами среднего размера, которые тоже иннервируются нейронами парафасцикулярного ядра (Zackheim, Abercrombie, 2005). Показано, что введение ГАМКА антагониста бикикуллина в парафасцикулярное ядро, растормаживая его активность, значительно уменьшает концентрацию ацетилхолина (АЦХ) в диализате у интактных животных. Наоборот, при торможении парафасцикулярного ядра осуществляется прямое возбуждающее влияние на выделение АЦХ. В отличие от данных, полученных на интактных животных, у животных с предварительным односторонним повреждением ДА нигростриатных путей введение бикикуллина (селективного ГАМКА антагониста) в парафасцикулярное ядро значительно усилило выделение АЦХ, независимо от одновременной блокады стриатных ГАМКА-рецепторов. Эти результаты свидетельствуют о качественных изменениях в тормозной таламической регуляции уровня АЦХ в стриатуме при недостатке в

нем ДА. Такие изменения в холинергической передаче стриатума вызывают серьезные последствия для интегративной деятельности базальных ганглиев (Zackheim, Abercrombie, 2005). Не менее важным в организации двигательного поведения и его расстройств играет взаимодействие на уровне стриатума ДА и АЦХ. В опытах *in vivo* с использованием микродиализа введение агониста D2-рецепторов, квинпиrolа, вызывало не только увеличение внеклеточной концентрации ДА в стриатуме (на 26%), но и увеличение АЦХ (на 15%) (DeBoer et al., 1992). Известно, что холинергическая активность стриатума регулируется через D1- и D2-рецепторы (Civelli et al., 1993). D2-рецепторы тормозят выделение стриатного АЦХ (Stoof et al., 1992), тогда как D1-рецепторы усиливают его (Imperato et al., 1993). Имеется точка зрения, что регуляция АЦХ передачи в стриатуме осуществляется через D1-рецепторы, находящиеся в стриатуме и за его пределами (Abercrombie, DeBoer, 1997). Эта регуляция представляется в следующем виде (Abercrombie, DeBoer, 1997). Стимуляция D1-рецепторов черной субстанции, локализованных на терминалах ГАМК-ергических стриатинальных волокон, вызывает высвобождение ГАМК. В свою очередь торможение ГАМК-ергических ниграталамических проекционных нейронов приводит к растормаживанию таламокортикальной активности и усилению глутаматергических входов на стриатных холинергических нейронах. В пользу высказанной точки зрения свидетельствует то, что высвобождение ДА в области сомато-дендритных синапсов усиливает таламокортикальную активность (Timmerman, Abercrombie, 1996), а введение антагониста NMDA-рецепторов (МК 801) в ходе обратного диализа в стриатуме ослабляет усиленное выделение АЦХ, вызванного системным введением агониста D1-рецепторов, CY 208-243 (Damsma et al., 1991).

Таким образом, основными звеньями системы регуляции моторного поведения являются сенсомоторная кора, мозжечок, красное ядро и стриатум. Показано, что активность нейронов моторной коры коррелирует с разными параметрами движения, включая скорость, силу, направление, движения в суставах, конечное положение конечности. Микростимуляция моторной коры может вызывать сложные движения. Показано участие моторной коры в контроле позы и в обучении новой позе. Мозжечок играет существенную роль в моторном программировании. Латеральный мозжечок получает информацию о плане движения от ассоциативных областей коры и формирует программу движения, которая через зубчатые ядра и ядра таламуса передается на премоторную и моторную кору, где формируется нисходящая моторная программа, копия которой через нижнюю оливу поступает в промежуточную и медиальную области мозжечка, где она сравнивается с афферентной информацией. Считается, что мозжечок формирует внутреннюю модель тела и объектов окружающей среды, которая используется в процессе обучения. Согласно «вычислительной гипотезе обучения», существует три вида обучения – обучение «с учителем», т.е. по обратной связи (supervised learning), обучение по подкреплению (reinforcement learning) и обучение по ассоциации (unsupervised learning). Мозжечок играет существенную роль в обучении по обратной связи, оценивая текущую ошибку движения, тогда как функция базальных ганглиев связана, в основ-

ном, с выбором реакции для достижения максимума подкрепления (reinforcement learning). Моторная кора, согласно этой гипотезе, вовлечена в обучение по ассоциации. Показано, однако, что мозжечок, базальные ганглии и моторная кора вовлечены «в обучение с учителем» (supervised learning) в ситуации обучения произвольно-му контролю положения центра тяжести по зрительной обратной связи.

Базальные ганглии являются частью экстрапирамидной системы мозга, участвующей в моторном контроле. Центральной структурой базальных ганглиев является стриатум, состоящий из 3 ядер. Прилежащее ядро, или nucleus accumbens, относят к вентральному стриатуму. Nucleus caudatus, или хвостатое ядро, и putamen, или скорлупа, относятся к структурам дорзального стриатума и составляют неостриатум. 95% всех нейронов дорзального стриатума – это средние звездчатые ГАМК-ергические нейроны. Остальные 5% – это интернейроны. Нехватка интернейронов в дорзальном стриатуме компенсируется специальным строением аксонов и дендритов средних звездчатых нейронов стриатума, что позволяет им участвовать в функционировании локальной сети.

Нейрональные системы головного мозга млекопитающих можно разделить на две категории: иерархические нейросетевые синаптические системы и паракринные неспецифические, или диффузные несинаптические нейромодуляторные системы. К нейросетевым синаптическим системам относятся системы с ионотропными рецепторами: ГАМК, глутамат и никотиновая ацетилхолиновая; а к диффузным несинаптическим нейромодуляторным системам относятся системы с метаботропными рецепторами: норадреналин, дофамин, серотонин, мускариновая ацетилхолиновая и нейропептиды. Звездчатые нейроны неостриатума получают возбуждающую глутаматергическую синаптическую информацию через AMPA, каинатные и NMDA-рецепторы, локализованные на дендритном дереве средних звездчатых нейронов, практически из всех областей неокортекса. Сами звездчатые нейроны – ГАМК-ергические, то есть используют ГАМК как передающий информацию медиатор. Средние звездчатые нейроны хвостатого ядра и скорлупы морфологически идентичны, но отличаются нейрохимически. Одна популяция этих нейронов содержит ГАМК, диноρφин и вещество P как котрансмиттеры и преимущественно экспрессирует D1-рецепторы. Эти нейроны посылают аксоны во внутренний паллидум (ГПв) и в ретикулярную часть черной субстанции (ЧСрч). Они дают начало прямому пути, который, тормозя интернейроны локальной сети таламуса, активируют нейроны таламокортикального входа. Вторая популяция средних звездчатых нейронов содержит ГАМК и энкефалин как котрансмиттер и преимущественно экспрессирует D2-рецепторы. Эти нейроны проецируются к внешнему паллидуму (ГПвне), дают начало непрямому пути и тормозят нейроны таламокортикального входа. В том случае, когда не прямой ГАМК-ергический путь оканчивается на нейронах ретикулярного ядра таламуса, ингибирование этих нейронов вызывает пачечную активность и осцилляции в таламо-кортикальных нейронах (burst neurons). Причиной этой реакции является то, что в нейронах ретикулярного ядра таламуса (РЯТ) и соматосенсорной коры локализованы два потенциал-зависимых канала: I_h -канал и низкопороговый Ca^{2+} -канал Т-типа (ICa^{2+T}), активируемые гиперполяризацией.

Известно, что ДА-нейроны среднего мозга объединены в три группы клеток: А8, А9 и А10. Терминали этих групп нейронов формируют проекции, которые образуют нигростриатную и мезокортиколимбическую ДА-ергические системы мозга. Нигростриатная система формируется в основном нейронами группы А9, тела которых расположены в компактной части черной субстанции. Терминали аксонов этих нейронов заканчиваются в области хвостатого ядра или неостриатума. Мезокортиколимбическая ДА-ергическая система в большей своей части формируется телами нейронов А10. Аксоны мезокортиколимбической ДА-системы оканчиваются в вентральной части стриатума – прилежащем ядре, обонятельных бугорках, центральном и базолатеральном ядрах миндалевидного комплекса, перегородке, гиппокампе, префронтальной, передней цингулярной, энторинальной, периформной корковых областях и в глубоких слоях фронтальной коры.

Нигростриатная ДА-система модулирует активность синаптических входов и выходов звездчатых нейронов дорзального стриатума через индукцию внутриклеточных сигналов (вторичные посредники и процессы фосфорилирования и дефосфорилирования) ДА-рецепторами и контролем активности ГАМК и глутаматергических ионотропных рецепторов средних звездчатых нейронов, которые в свою очередь активируют таламокортикальные сети и регулируют моторное поведение животных и человека. Мезокортиколимбическая ДА-система формирует эмоциональные и мотивационные состояния, участвующие в процессах подкрепления. Одной из ключевых структур мезокортиколимбической ДА-системы является прилежащее ядро (*nucleus accumbens*), которое относят к вентральному стриатуму. Прилежащее ядро состоит из двух групп клеток: сердцевина – (*core*) и оболочка – (*shell*). В эмоционально положительных реакциях и в подкреплении участвуют обе части этого ядра. Кроме того, предполагается, что сердцевина прилежащего ядра совместно с неостриатумом участвует в реализации и контроле целенаправленного поведения. Оболочка прилежащего ядра, получая иннервацию от ДА клеточных групп А10, ассоциирована с лимбической системой. Сердцевина прилежащего ядра получает глутаматергический вход из префронтальной коры (следующая ключевая структура реакции подкрепления), таламуса, гиппокампа и амигдалы. У крыс описаны прямые и не прямые проекции из сердцевины прилежащего ядра в ретикулярную часть черного вещества и вентральный паллидум. В ретикулярную часть черного вещества и в бледный шар идут проекции из дорзального стриатума. Таким образом, ДА-система вентрального стриатума (мезокортиколимбическая) взаимодействует с ДА-системой дорзального стриатума (нигростриатная) на уровне ретикулярной части черного вещества и вентрального паллидума и регулирует таламокортикальные сети через ГАМК-ергическую систему. Необходимо добавить, что это взаимодействие контролируется префронтальной корой. Это и может быть структурной основой для реализации целенаправленного мотивированного моторного поведения, в частности – с выбором правильной реакции для получения подкрепления.

Предполагается, что топографические отношения между корой головного мозга и стриатумом обеспечивают базу для изоляции функционально различных сетей в базальных ганглиях. Эти циркулирующие сети включают соматомоторные, глазод-

вигательные, познавательные и лимбические связи. Внутри каждой сети предполагается наличие подсети, причем таким образом, чтобы у первичной моторной коры и премоторной коры были неидентичные связи со структурами базальных ганглиев. Аналогично, дорзолатеральные и орбитолатеральные сети обладают особыми соединительными паттернами. Мы полагаем, что наличие параллельных разделенных сетей позволяет также понять механизм стереотипного поведения, такого как стереотипия круговых движений, челночных движений, жевания, лизания и тому подобное. К такому роду стереотипии можно отнести и реакцию самостимуляции, которая возникает в определенных условиях, при активации префронтальной коры и прилежащего ядра, структуры вентрального стриатума.

Хотя топография и соматотопия подразумевают определенную степень параллельной организации, существуют также конвергенция и дивергенция в кортико-стриатных проекциях. Большие дендритные области средних звездчатых нейронов позволяют им получать вход от смежных проекций, которые приходят из различных областей коры. Входы больше чем от одной корковой области перекрываются, и вход от одиночной корковой области проецируется дивергентно к многочисленным зонам стриатума. Эта сходящаяся и расходящаяся организация служит анатомической основой для интеграции и преобразования информации от нескольких областей коры головного мозга, в том числе и при условнорефлекторном обучении. Эти дивергентные и конвергентные связи могут интегрировать разные представительства в коре мозга, в том числе и представительства условного и безусловного раздражителей.

4. Заключение

Глава посвящена анализу основных звеньев систем регуляции моторного поведения: сенсомоторная кора, мозжечок, красное ядро и стриатум. Приведены работы последних лет. Описывается строение и связи этих структур, их участие в процессах обучения и памяти. Особое внимание уделяется синаптическим нейромедиаторным и несинаптическим нейромодуляторным системам, иннервирующим эти структуры. Иерархические синаптические сети формируются ГАМК и глутаматергическими системами. Несинаптическая дофаминергическая система среднего мозга иннервирует эти системы, но выполняет модулирующую функцию. Мезокортиколимбическая дофаминергическая система формирует эмоциональные и мотивационные состояния – процессы подкрепления, и участвует в реализации целенаправленного поведения. Нигростриатная дофаминергическая система через индукцию внутриклеточного сигнала и процессы фосфорилирования и дефосфорилирования модулирует активность ГАМК и глутаматергических рецепторов средних звездчатых нейронов дорзального стриатума и управляет таламокортикальными сетями. Описываются механизмы внутриклеточного взаимодействия дофаминергической, ГАМК и глутаматергической систем. Рассматриваются возможные механизмы нарушений взаимодействия этих систем при паркинсонизме.

Литература

- Аршавский Ю.И., Гельфанд И.М., Орловский, Г.Н. *Мозжечок и управление ритмическими движениями*. М.: Наука, 1984. 165 с.
- Базян А.С. Нейромодуляторные интегративные механизмы формирования эмоционально-мотивационных состояний // *Нейрохимия*. 1999. Т. 16. № 2. С. 88-103.
- Базян А.С. Взаимодействие медиаторных и модуляторных систем головного мозга и их возможная роль в формировании психофизиологических и психопатологических состояний // *Усп. физиол. наук*. 2001. Т. 32. № 3. С. 3-22.
- Базян А.С., Григорьян Г.А. Молекулярно-химические основы эмоциональных состояний и подкрепления // *Успехи физиол. наук*. 2006. Т. 37. № 1. С. 68-83.
- Базян А.С., Сегал О.Л. Индуцируемый гиперполяризацией Ih пейсмейкерный канал в головном мозге млекопитающих // *Нейрохимия*. 2010. Т. 27. № 4. С. 269-279.
- Базян А.С., Хашаев З.Х. Аллостерическая пластичность ГАМКА рецептора и внутринейрональная интеграция на уровне трансдукционного сигнала // *Успехи физиол. наук*. 2010. Т. 41. № 1. С. 3-25.
- Базян А.С., Григорьян Г.А., Иоффе М.Е. Регуляция моторного поведения // *Успехи физиол. наук*. 2011. Т. 42. № 3. С. 65-80.
- Балезина Н.П. Нарушение выработанной двигательной координации после повреждения ядер мозжечка у собак // *Сравнительная физиология высшей нервной деятельности человека и животных*. М.: МГУ, 1988. ч. 1.
- Балезина Н.П., Варга М.Е., Васильева О.Н., Иванова Н.Г., Иоффе М.Е., Павлова О.Г., Фролов А.Г. Исследование механизмов реорганизации двигательных координаций при обучении // *Мозг и поведение*. М.: Наука, 1990. С. 108-119.
- Николлс Дж.Г., Мартин А.Р., Валлас Б.Дж., Фукс П.А. *От нейрона к мозгу*. М.: УРСС, 2003. 671 с.
- Иоффе М.Е. *Механизмы двигательного обучения*. М.: Наука, 1991. 135 с.
- Шаповалова К.Б. Современные представления о нейроморфологии и нейрохимии холинергической системы стриатума и ее роли в регуляции движений // *ЖВНД*. 1996. Т. 46. № 4. С. 656-673.
- Шаповалова К.Б. Мускариновые рецепторы неостриатума – участие в регуляции оперантного поведения у собак // *Росс. физиол. журнал*. 2000. Т. 86. № 11. С. 1404-1417.
- Шаповалова К.Б., Камкина Ю.В. Сравнение эффектов системного (внутримышечного) и внутристриарного введения селективного блокатора D1 дофаминовых рецепторов на двигательное поведение и перестройку позы у собак // *ЖВНД*. 2009. Т. 59. № 2. С. 221-227.
- Шепард Г. *Нейробиология*. М.: Мир, 1987. Т. 1-2. 454 с.
- Abercrombie E., De Boer P. Substantia nigra D1 receptors and stimulation of striatal cholinergic interneurons by dopamine: A proposed circuit mechanism // *J. Neurosci*. 1997. Vol. 17. № 21. P. 8498-8505.
- Aflalo T.S., Graciano M.S.A. Relationship between unconstrained arm movements and single-neuron firing in the macaque motor cortex // *J. Neurosci*. 2007. Vol. 27. P. 2760-2780.
- Albus J.S. A theory of cerebellar function // *Math. Biosci*. 1971. Vol. 10. P. 25-61.
- Alexander G.E., DeLong M.R., Strick P.L. Parallel organization of functionally segregated circuits linking basal ganglia and cortex // *Ann. Rev. Neurosci*. 1986. Vol. 9. P. 357-381.
- Alexander S.P.H., Mathie A., Peters J.A. *Guide to Receptors and Channels (GRAC)*, 5th edition // *Brit. J. Pharmacol*. 2011. Vol. 164. Supl. 1. P. S1-S324.
- Allen G.I., Tsukahara N. Cerebrocerebellar communication systems // *Physiol. Rev*. 1974. Vol. 54. P. 957-1006.
- Al Tajir G., Starr M.S. Anticonvulsant effect of striatal dopamine D2 receptor stimulation: dependence on cortical circuits? // *Neurosci*. 1991. Vol. 43. P. 51-57.
- Amabeoku G., Chikuni O. GABAergic and dopaminergic systems may be involved in seizures induced by pyrimethamine in mice // *Gen. Pharmacol*. 1994. Vol. 25. P. 1269-1277.
- Amalric M., Ouagazzal A., Baunez C., Nieoullon A. Functional interactions between glutamate and dopamine in the rat striatum // *Neurochem. Int*. 1994. Vol. 25. P. 123-131.
- Ballion B., Mallet N., Be'zard E. et al. Intratelencephalic corticostriatal neurons equally excite striatonigral and striatopallidal neurons and their discharge activity is selectively reduced in experimental parkinsonism // *Eur. J. Neurosci*. 2008. Vol. 27. P. 2313-2321.

- Baunez C., Nieoullon A., Amalric M.* N-methyl-D-aspartate receptor blockade impairs behavioural performance of rats in a reaction time task: new evidence for glutamatergic-dopaminergic interactions in the striatum // *Neurosci.* 1994. Vol. 61. P. 521-531.
- Bayazitov I. T., Kleshchevnikov A.M.* Afferent high strength tetanizations favours potentiation of the NMDA vs AMPA receptor-mediated components of field EPSP in CA1 hippocampal slices of rats // *Brain Res.* 2000. Vol. 866. P. 15-23.
- Bazyan A.S.* Two types of epilepsy models and processes of cognition: Pentylenetetrazole kindling and absence epilepsy of WAG/Rij rats strain // *Underlying Mechanisms of Epilepsy.* Ed. F.S. Kaneez. Rijeka, Croatia: InTech, 2011. P. 283-302.
- Bazyan A.S., van Luijteleaar G.* Review Article. Neurochemical and Behavioral Features in Genetic Absence Epilepsy and in Acutely Induced Absence Seizures // *ISRN Neurology.* 2013, Article ID 875834, 48 pages. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/875834>.
- Bazyan A.S., Zhulin V.V., Karpova M.N., Klishina N.Y., Glebov R.N.* Long-term reduction of benzodiazepine receptor density in the rat cerebellum by acute seizures and kindling and its recovery six months later by a pentylenetetrazole challenge // *Brain Res.* 2001. Vol. 888. № 2. P. 212-220.
- Beloozerova I.N., Sirota M.G., Orlovsky G.N., Deliagina T.G.* Activity of pyramidal tract neurons in the cat during postural correction // *J. Neurophysiol.* 2005. Vol. 93. P. 1831-1844.
- Bevan M.D., Wilson C.J.* Mechanisms underlying spontaneous oscillation and rhythmic firing in rat subthalamic neurons // *J. Neurosci.* 1999. Vol. 19. № 17. P. 7617-7628.
- Biewenga J.E., Schrama L.H., Gispen W.H.* Presynaptic phosphoprotein B-50/GAP-43 in neuronal and synaptic plasticity // *Acta. Biochim. Pol.* 1996. Vol. 43. P. 327-338.
- Black J.E., Isaacs K.R., Anderson B.J., et al.* Learning causes synaptogenesis, whereas motor activity causes angiogenesis, in cerebellar cortex of adult rats // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1990. Vol. 87. P. 5568-5572.
- Brindley G.S.* The use made by the cerebellum of the information that it receives from sense organs // *Int. Brain Res. Org. Bull.* 1964. Vol. 3. P. 80.
- Brooks-Kayal, M.R., Shumate, M.D., Jin, H., Rikhter, T.Y., Coulter, D.A.* Selective changes in single cell GABAA receptors subunit expression and function in temporal lobe epilepsy // *Nature Med.* 1998. Vol. 4. P. 1166-1172.
- Buhmann C., Gorsler A., Bäumer T. et al.* Abnormal excitability of premotor-motor connections in de novo Parkinson's disease // *Brain.* 2004. Vol. 127. Pt 12. P. 2732-2746.
- Buzsaki G., Smith A., Berger S., et al.* Petit mal epilepsy and parkinsonian tremor: hypothesis of a common pacemaker // *Neurosci.* 1990. Vol. 36. № 1. P. 1-14.
- Calabresi P., Picconi B., Tozzi A., Di Filippo. M.* Dopamine-mediated regulation of corticostriatal synaptic plasticity // *Trends in Neurosci.* 2007. Vol. 30. P. 211-219.
- Carmichael S. T., Chesselet M.-F.* Synchronous Neuronal Activity Is a Signal for Axonal Sprouting after Cortical Lesions in the Adult // *J. Neurosci.* 2002. Vol. 22. P. 6062-6070.
- Chen Z., Ito K., Fujii S., Miura M., Furuse H., Sasaki H., Kaneko K., Kato H., Miyakawa H.* Roles of dopamine receptors in long-term depression: enhancement via D1 receptors and inhibition via D2 receptors // *Receptors Channels.* 1996. Vol. 4. P. 1-8.
- Chen S., Wang J., Siegelbaum, S.A.* Properties of hyperpolarization-activated pacemaker current defined by coassembly of HCN1 and HCN2 subunits and basal modulation by cyclic nucleotide // *J. Gen. Physiol.* 2001. Vol. 117. № 5. P. 491-504.
- Civelli O., Bunzow J.R., Grandy D.K.* Molecular diversity of the dopamine receptors // *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 1993. Vol. 32. P. 281-307.
- Clapham D.E.* Not So Funny Anymore: Pacing Channels Are Cloned // *Neuron.* 1998. Vol. 21. № 1. P. 5-7.
- Corda M.G., Orlandi M., Lecca D., Giorgi O.* Decrease in GABAergic function induced by pentylenetetrazole kindling in rats: antagonism by MK-801 // *J. Pharmacol. Exptl. Therap.* 1992. Vol. 262. P. 792-800.
- Damsma G., Robertson G.S., Tham C.S., Fibiger H.C.* Dopamine regulation of striatal acetylcholine release: importance of D1 and N-Methyl-D-aspartate receptors // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1991. Vol. 259. № 3. P. 1064-1072.
- Deadwyler S.A., Dunwiddie T., Lynch G.* A critical level of protein synthesis is required long-term potentiation // *Synapse.* 1987. Vol. 1. P. 90-95.

- De Boer P., Damsma G., Schram Q. et al.* The effect of intrastratial application of directly and indirectly acting dopamine agonists and antagonists on the in vivo release of acetylcholine measured by brain microdialysis. The importance of the post-surgery interval // *Naun. Schmied. Arch. Pharmacol.* 1992. Vol. 345. № 2. P. 144-152.
- DeLong M.R., Crutcher M.D., Georgopoulos A.P.* Primate globus pallidus and subthalamic nucleus: functional organization // *J. Neurophysiol.* 1985. Vol. 53. № 2. P. 530-543.
- Diedrichsen J., Verstynen T., Lehman S.L., Ivry R.B.* Cerebellar involvement in anticipating the consequences of self-produced actions during bimanual movements // *J. Neurophysiol.* 2005. Vol. 93. P. 801-812.
- Diener H.C., Dichgans J., Guschlbauer B. et al.* Associated postural adjustments with body movement in normal subjects and patients with parkinsonism and cerebellar disease // *Rev. Neurol. (Paris)*. 1990. Vol. 146. P. 555-563.
- DiFrancesco D.* The cardiac hyperpolarizing-activated current I_f . Origins and developments // *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 1985. Vol. 16. № 3. P. 163-183.
- Doya K.* What are the computations of the cerebellum, of the basal ganglia, and cerebral cortex // *J. Neural Networks*. 1999. Vol. 12. P. 961-974.
- Doya K.* Complementary roles of basal ganglia and cerebellum in learning and motor control // *Curr. Opin. Neurobiol.* 2000. Vol. 10. P. 732-739.
- Evans M.S., Viola-McCabe K.E.* Midazolam inhibits long-term potentiation through modulation of GABA_A receptors // *Neuropharmacol.* 1996. Vol. 35. P. 347-357.
- Evarts E.V.* Relation of pyramidal tract activity to force exerted during voluntary movement // *J. Neurophysiol.* 1968. Vol. 31. P. 14-27.
- Flaherty A.W., Graybiel A.M.* Corticostriatal transformations in the primate somatosensory system. Projections from physiologically mapped body-part representations // *J. Neurophysiol.* 1991. Vol. 66. P. 1249-1263.
- Georgopoulos A.P., Kalaska J.F., Caminiti R., Massey J.T.* On the relations between the direction of two-dimensional arm movements and cell discharge in primate motor cortex // *J. Neurosci.* 1982. Vol. 2. P. 1527-1537.
- Georgopoulos A.P., Ashe J., Smyrnis N., Taira M.* The motor cortex and the coding of force // *Science*. 1992. Vol. 256. P. 1692-1695.
- Gomi H., Kawato M.* Equilibrium-point control hypothesis examined by measured arm stiffness during multi-joint movement // *Science*. 1996. Vol. 272. P. 117-120.
- Graciano M.S.A., Taylor C.S.R., Moore T.* Complex movements evoked by microstimulation of precentral cortex // *Neuron*. 2002. Vol. 34. P. 841-851.
- Greengard P., Allen P.B., Nairn A.C.* Beyond the dopamine receptor: the DARPP-32/protein phosphatase-1 cascade // *Neuron*. 1999. Vol. 23. N 3. P. 435-447.
- Hagiwara N., Irisawa H., Kameyama M.* Contribution of two types of calcium currents to the pacemaker potentials of rabbit sino-atrial node cells // *J. Physiol. Lond.* 1988. Vol. 395. P. 233-253.
- Hallett M.* Plasticity of the human motor cortex and recovery from stroke // *Brain Res. Rev.* 2001. Vol. 36. P. 169-174.
- Higashima M., Kinoshita H., Koshino Y.* Differences in the effects of zolpidem and diazepam on recurrent inhibition and long-term potentiation in rat hippocampal slices // *Neurosci. Lett.* 1998. Vol. 245. P. 77-80.
- Hicks A., Davis S., Rodger J., Helme-Guizon A., Laroche S., Mallet J.* Synapsin I and syntaxin 1B: key elements in the control of neurotransmitter release are regulated by neuronal activation and long-term potentiation in vivo // *Neurosci.* 1997. Vol. 79. P. 329-340.
- Hikosaka O.* Basal ganglia mechanisms of reward-oriented eye movement // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2007. Vol. 1104. P. 229-249.
- Hikosaka O., Tarikawa Y., Kawagoe R.* Role of the basal ganglia in the control of purposive saccadic eye movements // *Physiol. Rev.* 2000. Vol. 80. P. 953-978.
- Houk J.C.* Neurophysiology of frontal-subcortical loops // *Frontal-Subcortical Circuits. Psychiatry and Neurology*. Ed. D.G. Lichten. NY.: Cummings Guilford Publications, 2001. Ch. 4. P. 92-113.
- Houk J.C., Buckingham J.T., Barto A.G.* Models of the cerebellum and motor learning // *Behav. Brain Sci.* 1996. Vol. 19. P. 368-383.
- Imamizu H., Miyauchi S., Tamada T. et al.* Human cerebellar activity reflecting an acquired internal model of a new tool // *Nature*. 2000. Vol. 403. P. 192-195.

- Imperato A., Obinu M.C., Casu M.A., Mascia M.S., Dazzi L., Gessa G.L.* Evidence that neuroleptics increase striatal acetylcholine release through stimulation of dopamine D1 receptors // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1993. Vol. 266. № 2. P. 557–562.
- Ioffe M.E., Ivanova N.G., Frolov A.A. et al.* On the role of motor cortex in the learned rearrangement of postural coordinations // *Stance and Motion. Facts and Concepts.* Eds V.S. Gurfinkel, M.E. Ioffe, J. Massion, J.P. Roll. NY: Plenum Press, 1988. P. 213-226.
- Ioffe M.E., Ustinova K.I., Chernikova L.A., Kulikov M.A.* Supervised learning of postural tasks in patients with poststroke hemiparesis, Parkinson's disease or cerebellar ataxia // *Exp. Brain. Res.* 2006. Vol. 168. P. 384-394.
- Irisawa H., Brown H.F., Giles W.* Cardiac pacemaking in the sinoatrial node // *Physiol. Rev.* 1993. Vol. 73. № 1. P. 197-227.
- Ito M.* Recent advances in cerebellar physiology and pathology // *Adv. Neurol.* 1978. Vol. 21. P. 59-84.
- Ito M.* The cerebellum and neural control. NY: Raven Press, 1984.
- Ito M.* Long-term depression // *Annu. Rev. Neurosci.* 1989. Vol. 12. P. 85-102.
- Ito M.* Movement and thought: identical control mechanisms by the cerebellum // *Trends Neurosci.* 1993. Vol. 16. P. 448-450.
- Ito M.* Mechanisms of motor learning in the cerebellum // *Brain Res.* 2000. Vol. 886. P. 237-245.
- Ito M., Karachot L.* Protein kinases and phosphatase inhibitors mediating long-term desensitization of glutamate receptors in cerebellar Purkinje cells // *Neurosci. Res.* 1992. Vol. 14. P. 27-38.
- Joel D., Weiner I.* The connections of the primate subthalamic nucleus: indirect pathways and the open-interconnected scheme of basal gangliathalamocortical circuitry // *Brain. Res. Rev.* 1997. Vol. 23. № 1. P. 62-78.
- Johnston J.D., Price S.A. and Bristow D.R.* Flunitrazepam rapidly reduces GABA(A) receptor subunit protein expression via a protein kinase C-dependent mechanism // *Br. J. Pharmacol.* 1998. Vol. 124. P. 1338-1340.
- Kawato M., Wolpert D.* Internal models for motor control // *Novartis Found Symp.* 1998. Vol. 218. P. 291-304.
- Kokaia M., Pratt G.D., Elmer E., Bengzon J., Fritschy J.M., Kokaia Z., Lindvall O., Mohler H.* Biphasic differential changes of GABAA receptor subunit mRNA levels in dentate gyrus granule cells following recurrent kindling-induced seizures // *Mol. Brain Res.* 1994. Vol. 23. P. 323-332.
- Koff, J.M., Pritchard, G.A., Greenblatt, D.J., Miller, L.G.* The NMDA receptor competitive antagonist CPP modulates benzodiazepine tolerance and discontinuation // *Pharmacol.* 1997. Vol. 55. P. 217-227.
- Kotter R.* Postsynaptic integration of glutamatergic and dopaminergic signals in the striatum // *Prog. Neurobiol.* 1994. Vol. 44. P. 163-196.
- Kornhuber H.H.* Cerebral cortex, cerebellum and basal ganglia: an introduction to their motor functions // *The Neurosci.: 3rd Study Progr.* Eds. F.O. Schmidt, F.G. Worden. Cambridge: MIT Press, 1974. P. 267-280.
- Krishek B.J., Xie X., Blackston C., Haganir R.L., Moss S.J., Smart T.G.* Regulation of GABAA receptor function by protein kinase C phosphorylation // *Neuron.* 1994. Vol. 12. P. 1081-1095.
- Lehmann O., Jeltsch H., Lehnardt O., Pain L., Lazarus C., Cassel J.C.* Combined lesions of cholinergic and serotonergic neurons in the rat brain using 192 IgG-saporin and 5,7-dihydroxytryptamine: neurochemical and behavioural characterization // *Eur. J. Neurosci.* 2000. Vol. 12. № 1. P. 67-79.
- Llinas R., Welsh J.P.* On the cerebellum and motor learning // *Curr. Opin. Neurobiol.* 1993. Vol. 3. P. 958-965.
- Macdonald R.L., Olsen R.W.* GABAA receptor channels // *Annu. Rev. Neurosci.* 1994. Vol. 17. P. 569-602.
- Marr D.* A theory of cerebellar cortex // *J. Physiol.* 1969. Vol. 202. P. 437-470.
- Martin J.P.* The basal ganglia and posture. Putman, 1967.
- Matsumura M., Kojima J., Gardiner T.W., Hikosaka O.* Visual and oculomotor functions of monkey subthalamic nucleus // *J. Neurophysiol.* 1992. Vol. 67. № 6. P. 1615-1632.
- Mayford M., Abel T., Kandel E.R.* Transgenic approaches to cognition // *Cur. Opin. Neurobiol.* 1995. Vol. 5. P. 141-148.
- Mayse J.F., De Vietti T.L.* A comparison of state-dependent learning induced by electroconvulsive shock and pentobarbital // *Physiol. Behav.* 1971. Vol. 7. P. 717-721.
- Mink J.W.* The basal ganglia // *Fundamental Neuroscience.* 2nd edition. Eds. L.R. Squire, F.T. Bloom, S.C. McConnell S.C. et al. Elsevier Science, Academic Press, 2003. P. 815-839.

- Miyachi S. Cortico-basal ganglia circuits--parallel closed loops and convergent/divergent connections // *Brain Nerve*. 2009. Vol. 61. P. 351-359.
- Nicoll R.A., Malenka R.C., Kauer J.A. Functional comparison of neurotransmitter receptor subtypes in mammalian central nervous system // *Physiol. Rev.* 1990. Vol. 70. № 2. P. 513-565.
- Niles L.P., Smith L.J., Tenn C.C. Modulation of c-fos expression in the rat striatum by diazepam // *Neurosci. Lett.* 1997. Vol. 236. P. 5-8.
- Nudo R.J., Milliken G.W., Jenkins W.M., Merzenich M.M. Use-dependent alterations of movement representations in primary motor cortex of adult squirrel monkeys // *J. Neurosci.* 1996. Vol. 16. P. 785-807.
- Nudo R.J., Plautz E.J., Frost S.B. Role of adaptive plasticity in recovery of function after damage to motor cortex // *Muscle Nerve*. 2001. Vol. 24. P. 1000-1019.
- Olsen R.W., Yang J., King R.G., Dilber A., Stauber G.B., Ransom R.W. Barbiturate and benzodiazepine modulation of GABA receptor binding and function // *Life Sci.* 1986. Vol. 39. P. 1969-1976.
- Ogren S.O., Pakh B. Effects of dopamine D1 and D2 receptor agonists and antagonists on seizures induced by chemoconvulsants in mice // *Pharmacol. Toxicol.* 1993. Vol. 72. P. 213-220.
- Parent A., Hazrati L.N. Functional anatomy of the basal ganglia. II. The place of subthalamic nucleus and external pallidum in basal ganglia circuitry // *Brain Res. Rev.* 1995. Vol. 20. № 1. P. 128-154.
- Pasqualotto B.A., Lanius R.A., Shaw C.A. Regulation of GABAA and AMPA receptors by agonist and depolarizing stimulation requires phosphatase or kinase activity // *Neuroreport*. 1993. Vol. 4. P. 447-450.
- Phillips C.G., Porter R. Corticospinal neurones. Their role in movement. *Monogr. Physiol. Soc.* 1977. Vol. 34. 450 p.
- Pisani A., Bonsi P., Picconi B. et al. Role of tonically-active neurons in the control of striatal function: cellular mechanisms and behavioral correlates // *Prog. Neuropsychopharm. Biol. Psychiatry*. 2001. Vol. 25. P. 211-230.
- Plautz E.J., Milliken G.W., Nudo R.J. Effects of repetitive motor training on movement representations in adult squirrel monkey: Role of use vs. learning // *Neurobiology of Learning and Memory*. 2000. Vol. 74. P. 27-55.
- Porter R., Lemon R.N. *Corticospinal Function and Voluntary Movement*. Oxford: Clarendon Press. 1993. 421 p
- Pratt G.D., Kokaia M., Bengzon J., Kokaia Z., Fritschy J. M., Mohler H., Lindvall O. Differential regulation of N-methyl-D-aspartate receptor subunit messenger RNAs in kindling-induced epileptogenesis // *Neurosci.* 1993. Vol. 57. P. 307-318.
- Qin Z. H., Weiss B. Dopamine receptor blockade increases dopamine D2 receptor and glutamic acid decarboxylase mRNAs in mouse substantia nigra // *Eur. J. Pharmacol.* 1994. Vol. 269. P. 25-33.
- Redgrave P., Prescott T.J., Gurney K. The basal ganglia: a vertebrate solution to the selection problem? // *Neuroscience*. 1999. Vol. 89. P. 1009-1023.
- Roth R.H., Wolf M.E., Deutch A.Y. *Neurochemistry of midbrain dopamine system // Psychopharmacology: The Third Generation of Progress*. Ed. H.Y. Meltzer. NY: Raven Press, 1987. Ch. 9. P. 81-98.
- Roth R.H., Wolf M.E., Deutch A.Y. *Biochemical pharmacology of midbrain dopamine system // Psychopharmacology: The Fourth Generation of Progress*. Eds. F.E. Bloom, D.J. Kupfer. NY: Raven Press, 1995. Ch. 21. P. 227-243.
- Sanes J.N., Donoghue J.P. Plasticity and primary motor cortex // *Ann. Rev. Neurosci.* 2000. Vol. 23. P. 393-415.
- Sasaki K, Gamba H. Learning of fast and stable hand movement and cerebro-cerebellar interactions in the monkey // *Brain Res.* 1983. Vol. 277. P. 41-46.
- Schugens M.M., Breitenstein C., Ackermann H., Daum I. Role of the striatum and the cerebellum in motor skill acquisition // *Behav. Neurol.* 1998. Vol. 11. P. 149-157.
- Schultz W. Predictive reward signal of dopamine neurons // *J. Neurophysiol.* 1998. Vol. 80. P. 1-27.
- Schultz W., Dayan P., Montague P.R. A neural substrate of prediction and reward // *Science*. 1997. Vol. 275. P. 1593-1599.
- Seabrook G.R., Easter A., Dawson G.R., Bowery B.J. Modulation of long-term potentiation in CA1 region of mouse hippocampal brain slices by GABAA receptor benzodiazepine site ligands // *Neuropharmacol.* 1997. Vol. 36. P. 823-830.
- See R.E., Aravagiri M., Ellison G.D. Chronic neuroleptic treatment in rats produces persisting changes in GABAA and dopamine D-2, but not dopamine D-1 receptors // *Life. Sci.* 1989. Vol. 44. P. 229-236.

- See R.E., Toga A.W., Ellison G.* Autoradiographic analysis of regional alterations in brain receptors following chronic administration and withdrawal of typical and atypical neuroleptics in rats // *J. Neural. Transm. Gen. Sect.* 1990. Vol. 82. P. 93-109.
- Sigma-RBI Handbook of Receptor Classification and Signal Transduction, 5th ed. Ed. K. Watling. Sigma-RBI, 2006. 384 p.
- Smirnova T., Laroche S., Errington M.L., Hicks A.A., Bliss T.V., Mallet J.* Transsynaptic expression of a presynaptic glutamate receptor during hippocampal long-term potentiation // *Science.* 1993. Vol. 262. P. 433-436.
- Stackman R.W., Walsh T.J., Brucato F.H., Swartzwelder H.S.* Medial septal benzodiazepine receptors modulate hippocampal evoked responses and long-term potentiation // *Brain Res.* 1996. Vol. 717. P. 12-21.
- Stanton P.K., Sarvey J.M.* Blockade of norepinephrine-induced long-lasting potentiation in the hippocampal dentate gyrus by an inhibitor of protein synthesis // *Brain Res.* 1985. Vol. 361. P. 276-283.
- Stephens D.N., Turski L.* Kindling to the benzodiazepine receptor inverse agonist, FG 7142: evidence for involvement of NMDA, but not non-NMDA, glutamatergic receptors // *Neuropharmacol.* 1993. Vol. 132. P. 1011-1817.
- Stoof J.C., Drukarch B., DeBoer P., Westerink B.H.C., Groenewegen H.J.* Regulation of the activity of striatal cholinergic neurons by dopamine // *Neurosci.* 1992. Vol. 47. № 4. P. 755-770.
- Suri R.E.* TD Models of reward predictive responses in dopamine neurons // *Neural. Networks.* 2002. Vol. 15. P. 523-533.
- Thach W.T.* On the specific role of the cerebellum in motor learning and cognition: clues from PET activation and lesion studies in man // *Behav. Brain Sci.* 1996. Vol. 19. P. 411-431.
- Timmerman W., Abercrombie E.D.* Amphetamine-induced release of dendritic dopamine in substantia nigra pars reticulata: D1-mediated behavioral and electrophysiological effects // *Synapse.* 1996. Vol. 23. № 4. P. 280-291.
- Tobler P.N., Fiorillo C.D., Schultz W.* Adaptive coding of reward value by dopamine neurons // *Science.* 2005. Vol. 307. P. 1642-1645.
- Todorov E., Jordan M.I.* Optimal feedback control as a theory of motor coordination // *Nat. Neurosci.* 2002. P. 1226-1235.
- Zackheim J., Abercrombie E.D.* Thalamic regulation of striatal acetylcholine efflux is both direct and indirect and qualitatively altered in the dopamine-depleted striatum // *Neurosci.* 2005. Vol. 131. № 2. P. 423-436.

Болезнь Паркинсона: клиника, диагностика и лечение

*А.Б. Гехт, Г.Р. Попов, А.А. Гудкова, Е.С. Коршунова,
Е.А. Болдырева, Е.И. Гусев*

Содержание

1. Введение
2. Клиническая картина болезни Паркинсона
 - 2.1. Моторные проявления болезни Паркинсона
 - 2.2. Немоторные проявления болезни Паркинсона
3. Классификация болезни Паркинсона
4. Течение болезни Паркинсона, потенциальные маркеры доклинических стадий
5. Диагностика
6. Лечение болезни Паркинсона
7. Лечение вегетативных проявлений болезни Паркинсона
8. Лечение центральных немоторных проявлений болезни Паркинсона
9. Заключение

1. Введение

Болезнь Паркинсона (БП) – хроническое прогрессирующее нейродегенеративное заболевание, проявляющееся преимущественно двигательными нарушениями в виде гипокинезии, ригидности мышц, тремора покоя и постуральной неустойчивости, а также вегетативными, когнитивными и другими расстройствами.

В зависимости от этиологии выделяют (Jancovic, 1995):

1. Первичный (идиопатический) паркинсонизм: БП и ювенильный паркинсонизм. В данных случаях синдром паркинсонизма является доминирующим в клинической картине вплоть до развернутых стадий.

2. Вторичный (симптоматический) паркинсонизм возникает вследствие поражения мозга определенным этиологическим фактором. Соответственно выделяют лекарственный паркинсонизм, посттравматический, токсический, постэнцефалический, сосудистый, постгипоксический и др.

3. Паркинсонизм при других нейродегенеративных заболеваниях: мультисистемная атрофия, прогрессирующий надъядерный паралич, болезнь диффузных тел Льюи, кортикобазальная дегенерация, болезнь Гентингтона, спиноцереbellарные дегенерации, нейроакантоцитоз, дистония-паркинсонизм и др.

На долю БП приходится порядка 70–80% случаев паркинсонизма. БП встречается во всех странах мира и во всех этнических и социальных группах. Распро-

Сокращения: АДР – агонисты дофаминовых рецепторов; БП – болезнь Паркинсона; ИДДК – ингибиторы дофадекарбоксилазы; КОМТ – катехол-орто-метил-трансфераза; МАО-В – моноаминоксидаза типа В; СИОЗС – селективные ингибиторы обратного захвата серотонина.

страненность БП в целом составляет от 120 до 180 случаев на 100 000 населения, заболеваемость 10–20 случаев на 100 000 населения в год. Показатели распространенности и заболеваемости увеличиваются с возрастом. Распространенность среди лиц старше 60 лет составляет 1%, среди лиц старше 80 лет – 4% (Lees, 2002). Заболеваемость среди лиц старше 70 лет достигает 55 на 100 000 населения в год, а среди лиц старше 85 лет – 220–304 на 100 000 населения. Распространенность БП варьирует в разных странах: от 31 в Ливии до 348 в Индии на 100 000 населения. В настоящее время в мире проживает более 6 млн больных БП. В связи с тенденцией к постарению населения предполагается, что численность больных к 2030 году удвоится (Левин, Докадина, 2005).

БП приводит как к выраженным неврологическим нарушениям, так и к значительному снижению социальной активности и качества жизни больных. К настоящему времени проведен ряд исследований, в которых оценивался экономический ущерб от БП для государства, общества и пациента в разных странах. Исследования экономических характеристик БП показали, что затраты, связанные с БП, огромны. В странах Западной Европы прямые затраты, т.е. расходы, связанные с оказанием медицинской помощи, составляют от 4500 € до 13 000 € в год, а ежегодные непрямые затраты, обусловленные утратой трудоспособности больных составляют от 5 000 € до 8 000 € на одного пациента (Le Pen et al., 1999; Hagell et al., 2002; Keranen et al., 2003; Findley et al., 2003; Huse et al., 2005; Von Campenhausen et al., 2009; Winter et al., 2010a,b). В России прямые расходы составили 1770 €, а непрямые – 860 € за 6 месяцев по результатам фармакоэкономического исследования «стоимость болезни».

2. Клиническая картина болезни Паркинсона

2.1. Моторные проявления болезни Паркинсона

Характерными моторными признаками БП являются гипокинезия, мышечная ригидность, тремор покоя и поструральная неустойчивость.

Гипокинезия является обязательным симптомом паркинсонизма и проявляется брадикинезией – замедленностью движений и олигокинезией. Олигокинезия более сложный феномен, который включает затруднения инициации произвольных движений, их дезавтоматизацию, неспособность развивать адекватное по темпу и амплитуде усилие (гипометрия), обеднение двигательного рисунка, уменьшение амплитуды и скорости выполнения последовательных движений, нарушение способности интегрировать несколько движений в единое действие. Клиническими проявлениями гипокинезии являются редкие мигательные движения (симптом Мари); «застывший взор»; бедность мимики (гипомимия) вплоть до амимии – «маскообразного лица» (подкорковый симптом Бехтерева); симптом Леви при паркинсонизме – «кулака симптом»: при сжатии кисти в кулак отсутствует физиологическая синергия – разгибание кисти; микрография – при письме буквы становятся мелкими, особенно в конце фразы; симптом «прилипающих к полу ног», «инерции покоя»

феномен: больному трудно начать ходьбу, при этом он топчется на месте; микробазия – укороченный шаг; «стелющийся» шаг – при ходьбе больной недостаточно отрывает ступни от пола; отсутствие содружественных движений рук при ходьбе – ахейрокинез; брадилалия – замедленная речь; назофония – речь носит гнусавый, «носовой» оттенок; диспросодия – монотонность речи.

Мышечная ригидность проявляется повышением мышечного тонуса скелетной мускулатуры по пластическому типу, которое определяется при пассивном сгибании и разгибании и может быть монотонным (феномен «восковой куклы») или толчкообразно меняющимся (феномен «зубчатого колеса», симптом «Негро», что указывает на наложение тремора, возможно скрытого, на пластический гипертонус). Иногда тонус мышц бывает настолько высоким, что сила пассивного сопротивления значительно превышает силу активного движения (симптом Дылевой). К другим проявлениям пластического гипертонуса является Фуа-Тевенара голени феномен, когда пассивно согнутая под острым углом голень лежачего на животе больного застывает в приданном положении; Вестфаля стопный феномен: застывание стопы в пассивно приданном ей положении резкого тыльного сгибания.

Для БП характерен **тремор покоя**, т.е. тремор в покоящейся конечности, который уменьшается при ее движениях и усиливается при активных движениях другими конечностями. Тремор имеет частоту 3–6 Гц, наблюдается чаще в дистальном отделе руки или ноги и напоминает в руках «скатывание пилюль» или «счет монет». Помимо конечностей тремор может вовлекать голову, губы, подбородок. При БП могут встречаться и другие виды тремора (постуральный и кинетический) как изолированно, так и в сочетании с тремором покоя, но они обычно бывают менее выражены. Постуральный тремор является характерным, но не обязательным симптомом болезни.

Постуральная неустойчивость – неспособность удерживать равновесие при изменении позы. В основе постуральной неустойчивости лежит нарушение генерации адекватных постуральных рефлексов, на которое наслаивается гипокинезия, ригидность (Giladi et al., 2001). К проявлениям постуральной неустойчивости относятся феномены пропульсии, ретропульсии, латеропульсии (непреодолимое движение вперед, назад или в сторону), при этом больной не в состоянии самостоятельно остановиться. Постуральная неустойчивость является основной причиной падений, когда смещение центра тяжести не вызывает компенсаторных движений туловища и конечностей, при наклонах, подъемах из сидячего положения или ходьбе (Kerr et al., 2010). Постуральные, т.е. «позные» нарушения (нарушения позы) бывают заметны уже на ранних стадиях заболевания: к примеру, если больного попросить вытянуть руки вперед, можно увидеть согнутость в локтевом суставе руки на пораженной стороне, либо асимметричность сгибания с преобладанием в более пораженной стороне. К другим постуральным нарушениям относится сгибательная поза вследствие преобладания тонуса в мышцах-сгибателях туловища. Вследствие нарушения позных установок формируется характерная «поза просятеля»: туловище наклонено вперед, ноги полусогнуты, руки согнуты в локтевых суставах и прижаты к туловищу, предплечья супинированы, пальцы полусогнуты. Походка такого больного напоминает «кукольную». Постуральная неустойчивость наряду с другими аксиальными расстройствами плохо поддается терапии.

2.2. Немоторные проявления болезни Паркинсона

Помимо классической тетрады моторных симптомов для БП характерны немоторные симптомы, которые проявляются в психической, вегетативной и сенсорной сферах, нарушения сна и бодрствования.

К *психическим симптомам* относятся когнитивные, поведенческие, аффективные нарушения, психотические явления. Когнитивные нарушения на ранних этапах болезни бывают легкими и умеренными (Дамулин, 2009; Camicioli et al., 2003; Aarsland et al., 2003). У пациентов с умеренными когнитивными нарушениями выявляются снижение внимания, работоспособности, некоторая аспонтанность и замедленность мыслительных процессов (брадифрения), т.е. наблюдаются нейродинамические нарушения, к которым по мере прогрессирования заболевания присоединяются регуляторные расстройства, связанные с дисфункцией фронтальной коры, проявляющиеся снижением ресурсов внимания, памяти, особенно вербальной и зрительной, а также зрительно-пространственными нарушениями, например, неспособность правильно копировать рисунки, ошибки в направлении линий (Peavy, 2010). У 40–70% больных через 10–12 лет развивается деменция на финальных стадиях болезни (Mayeux et al., 1990; Aarsland et al., 2003). Определить, когда умеренный когнитивный дефект (при котором социальная адаптация больных не нарушена) перерастает в деменцию, крайне трудно (Pirogovsky et al., 2014). Когнитивные нарушения при БП могут быть усугублены приемом антихолинэргических препаратов и сопутствующей депрессией.

Депрессия – почти неизбежное психическое расстройство при БП. Депрессией страдают примерно 45% пациентов с БП. В большинстве случаев преобладают депрессивные синдромы легкой и средней степени тяжести, тем не менее отмечаются и суицидальные попытки. Выраженность депрессии в большинстве случаев не коррелирует с тяжестью двигательных нарушений, нет связи с длительностью болезни и возрастом больных (Starkstein et al., 1990). Основным проявлением депрессии при БП является тоска, которая может сочетаться с ангедонией, т.е. способностью получать удовольствие, утомляемостью, снижением аппетита, неизменно пессимистическими мыслями о будущем. Для депрессии при БП характерна высокая представленность тревожных расстройств, раздражительность, уныние, при этом нет идей самобичевания.

Ряд исследований продемонстрировали, что апатия была коррелирована с высоким баллом по шкале депрессии (Marin et al., 1993; Lavretsky et al., 1999).

Тревога выявляется примерно у половины больных, чаще всего сопровождает депрессию. Препараты леводопы могут усиливать тревожное состояние. У некоторых больных тревога, нарастая в период прекращения действия леводопы, может приводить к психовегетативному пароксизму (панической атаке).

У части больных, обычно на поздней стадии болезни, развивается обсессивно-компульсивный синдром в виде obsessions, т.е. навязчивых мыслей, идей, образов (например, стремление к идеальному порядку, чистоте). Компульсии являются поведенческим выражением obsessions, сопротивлению которым вызывает внутреннее напряжение, побуждающее их реализовать.

Большинство психотических расстройств развиваются на фоне приема противопаркинсонической терапии. Примерно у трети больных наблюдаются психотические явления, которые включают иллюзии, галлюцинации разных модальностей (чаще зрительные), бред, делирий. Тяжелые проявления в виде бреда, делирия чаще встречаются у пожилых пациентов с деменцией и существенно затрудняют терапию и уход за больным. Провоцировать развитие психотических расстройств могут, в первую очередь, противопаркинсонические препараты, особенно холинолитики и агонисты дофаминовых рецепторов (АДР). Реже психозы связаны со стрессом, декомпенсацией сопутствующего заболевания, инфекцией, травмой и другими внешними факторами.

Вегетативные нарушения являются неотъемлемой составляющей БП и носят перманентный характер. В начальных стадиях вегетативные нарушения клинически могут быть минимальны, однако по мере прогрессирования болезни нередко причиняют больным значительно больший дискомфорт, чем двигательные нарушения. Наиболее частыми вегетативными нарушениями являются запоры, сухость кожи с дистальным гипергидрозом, плохая переносимость жары и/или холода, слюнотечение, дисфагия, снижение массы тела, ноктурия, ургентные позывы к мочеиспусканию, недержание мочи, эректильная дисфункция у мужчин и аноргазмия у женщин, ортостатическая гипотензия, пищевая гипотензия, пароксизмы тахикардии, диффузная аллопеция, сухость кожи, избыточная секреция ушной серы, себорея, трофические нарушения кожи, слезотечение (Голубев и др., 1999).

Нарушения сна представлены инсомнией (нарушением засыпания, поддержания сна), парасомниями (двигательная активность в фазе сна с быстрыми движениями глаз, или парадоксальный сон без мышечной атонии, сногворение, ночная миоклония, кошмары и галлюцинации, сомнамбулизм), дневной гиперсомнией. Нередко расстройства сна появляются за несколько лет до проявления моторных симптомов болезни.

Примерно у половины больных БП уже на ранней стадии заболевания выявляется синдром хронической усталости – астеноподобное состояние, при котором больные испытывают крайнюю степень утомления, истощения в своей привычной повседневной деятельности. Хроническая усталость не связана со стадией, формой или продолжительностью болезни.

Сенсорные нарушения довольно часто присутствуют при БП, представлены парестезиями, ноющими болями в мышцах, могут возникать даже на ранних стадиях болезни и обычно сильнее выражены на более пораженных конечностях. При этом зоны гипо- или гиперестезии не выявляются.

Часто при БП наблюдается снижение обоняния, которое появляется обычно раньше двигательных нарушений. До 51% больных с БП страдают anosmией, 35% – тяжелой и 14% умеренной гипосмией. Дефицит обоняния при БП имеет двухсторонний характер и не связан с тем, с какой стороны тела ассоциированы моторные нарушения, а также с тяжестью и продолжительностью болезни и применением антипаркинсонических препаратов (Hawkes et al., 1997; Muller et al., 2002).

3. Классификация болезни Паркинсона

Классификация БП проводится по форме, стадии и темпу прогрессирования. В зависимости от характера основных моторных проявлений принято выделять дрожательную форму, при которой значительно преобладает тремор, акинетико-ригидную форму – в клинической картине отмечается гипокинезия и ригидность, тремор покоя отсутствует или выражен минимально, при этом может наблюдаться легкий постуральный тремор. При смешанных формах все три симптома выражены в той или иной степени, на долю смешанных форм приходится 60–70% случаев БП. В целом, течение болезни при дрожательной форме более благоприятное, чем при акинетико-ригидной.

В клинической практике для определения стадии наиболее широко применяется шкала Хен-Яра (Hoehn, Yahr, 1967) в модификации (Tetrud, Langston, 1989).

Стадии болезни представлены в табл. 1.

Терапия противопаркинсоническими препаратами уменьшает выраженность симптомов паркинсонизма, в таких случаях точнее применять термин «степень тяжести». Темп прогрессирования болезни определяется по времени достижения пациентом 3 стадии БП на фоне лечения (Левин и др., 2014). Соответственно выделяется быстрый темп прогрессирования, когда признаки 3 стадии появляются через 5 лет от дебюта заболевания, при умеренном темпе прогрессирования – в пределах 5–10 лет, и при медленном темпе прогрессирования – не ранее, чем через 10 лет.

Темп прогрессирования моторных и немоторных проявлений может не совпадать. По данным Ван Рудена с соавторами (Van Rooden et al., 2009), выделяются 4 группы пациентов с соотношением моторных и немоторных симптомов. Для первой группы характерны относительно ранний дебют заболевания (в среднем 4 лет), относительно медленное прогрессирование двигательных симптомов, мягкость немоторной симптоматики. Для второй группы также были характерны раннее начало заболевания, мягкость немоторной симптоматики, но отмечалась более высокая выраженность двигательных осложнений терапии леводопой и более быстрый темп прогрессирования. Третья группа пациентов (30%) характеризовалась более поздним началом заболевания (средний возраст составлял примерно 56 лет), отно-

Таблица 1

Стадии болезни Паркинсона

Стадия 0	Двигательные проявления отсутствуют.
Стадия 1	Односторонние проявления заболевания.
Стадия 1,5	Односторонние проявления с вовлечением аксиальной мускулатуры.
Стадия 2	Двусторонние симптомы без постуральной неустойчивости.
Стадия 2,5	Мягкие двусторонние проявления с сохранением способности преодолевать вызванную ретропульсию.
Стадия 3	Умеренная постуральная неустойчивость, но больной не нуждается в посторонней помощи.
Стадия 4	Значительная утрата двигательной активности, но пациент в состоянии стоять без поддержки и даже передвигаться.
Стадия 5	Без посторонней помощи больной прикован к креслу или постели.

сительной легкостью немоторных нарушений. Для четвертой группы (8%) были характерны примерно такой же возраст дебюта заболевания, как и для третьей, более частая встречаемость акинетико-ригидной формы, большая выраженность немоторных симптомов, более длительная продолжительность применения леводопы (Van Rooden et al., 2009).

4. Течение болезни Паркинсона, потенциальные маркеры доклинических стадий

Еще до появления классических двигательных симптомов при БП у больных могут развиваться неспецифические расстройства: anosmia, нарушения поведения во сне, депрессия, синдром беспокойных ног, хроническая усталость, запоры, некоторые пациенты незадолго до появления симптомов паркинсонизма бросают курить. Моторные симптомы могут дебютировать с тремора покоя, тугоподвижности или неловкости одной конечности, постепенно вовлекая другую ипсилатеральную конечность, шею, туловище и, наконец, противоположные конечности, при этом постоянно сохраняется асимметрия симптомов с преобладанием на стороне дебюта. Мышечная ригидность обычно начинается с шеи, далее распространяясь в нисходящем направлении. Стадия гемипаркинсонизма продолжается от нескольких месяцев до нескольких лет и соответствует 1–1,5 стадии БП по Хен-Яру (Hoehn, Yahr, 1967) Иногда возникает двустороннее начало заболевания. По мере прогрессирования заболевания и распространения нейродегенеративного процесса, присоединяется постуральная неустойчивость, что соответствует 3 стадии болезни по Хен-Яру (Hoehn, Yahr, 1967). Именно на третьей стадии становятся особенно заметными многие немоторные проявления БП, которые на поздних стадиях (4 и 5) нередко инвалидизируют больных в большей степени, чем моторные симптомы (Hely, 2005).

Вегетативные и сенсорные симптомы. В качестве кандидатов в ранние маркеры паркинсонизма обсуждаются такие вегетативные нарушения, как редкая дефекация (запоры), эректильная дисфункция у мужчин и аноргазмия, или снижение lubricации, у женщин, нарушение симпатической иннервации сердца и изменения циркадианных ритмов температуры тела и других показателей терморегуляции.

Известно, что почти все пациенты с БП страдают от снижения частоты и затруднения дефекации (Magerkurth et al., 2005). Эпидемиологическое исследование 6790 человек в возрасте от 51 до 75 лет, не страдавших БП, проводившееся на протяжении 24 лет, показало, что пациенты, склонные к запорам (менее одной дефекации в день), имеют в 3–4 раза больший риск развития БП в среднем через 12 лет с момента начала запоров, по сравнению с людьми с частотой опорожнения кишечника от одного раза в день и чаще (Abbott, 2001). Предполагается, что нарушения дефекации в премоторной фазе паркинсонизма могут быть связаны с поражением дорзального ядра блуждающего нерва на стадии I (Wolters, Braak, 2006).

В другом исследовании изучена эректильная функция у 32616 мужчин без симптомов паркинсонизма. Через 16 лет у 200 человек была диагностирована БП. Результаты этого исследования выявили корреляцию между сексуальными нарушениями и паркинсонизмом. Оказалось, что у мужчин с эректильной дисфункцией риск развития БП в 3,8 раза превышает риск для мужчин с сохранной половой функцией (Gao et al., 2007). Авторы делают вывод, что вегетативная нервная система может быть поражена задолго до того, как БП будет клинически диагностирована.

Говоря о нейрофизиологии мочеиспускания, надо признать, что влияние экстрапирамидной системы изучалось только косвенно. Однако нам удалось найти несколько работ, посвященных данному вопросу. Фундаментальными исследованиями в этой области являются работы (Lewin et al., 1967; Raz, 1976), авторы которых проводили электрическую стимуляцию отдельных участков головного мозга кошек. Х. Йошимура и др. (Yoshimura et al., 1993, 1998) проводили исследование на обезьянах, у которых искусственно вызывали паркинсонизм. С. Секи и др. (Seki et al., 2001) изучали роль D1- и D2-рецепторов в регуляции акта мочеиспускания у крыс. Результаты вышеприведенных исследований явились основанием для создания предполагаемой концепции роли дофаминергической системы в регулировании и нарушении функции нижних мочевых путей при БП. Дофаминергические нейроны из компактной части черной субстанции посредством дофамина тонически активируют D1-рецепторы в стриатум, что приводит к ингибированию центра мочеиспускания в мосту головного мозга. С другой стороны, дофаминергические нейроны из других областей головного мозга, в частности вентральной тегментальной области, могут стимулировать рефлекс мочеиспускания посредством D2-рецепторов, расположенных непосредственно в мосту головного мозга или в спинном мозге. Уменьшение числа клеток в *pars compacta* при БП приводит к дефициту дофамина. Это снижает ингибирующее влияние D1-рецепторов на центр мочеиспускания в мосту и вызывает детрузорную гиперактивность (Lewin, 1967; Raz 1976; Chrstmas et al., 1988; Khan et al., 1989, Sakakibara et al., 2001; Abrams et al., 2002). Таким образом, поражение структур головного мозга при БП вызывает нарушения накопительной способности детрузора. По мнению разных авторов, частота встречаемости расстройств мочеиспускания у этих больных колеблется в пределах от 37 до 90% случаев (Mundy et al., 1984; Berger et al., 1987; O'Donnell, 1997; Nomura et al., 2000; Лоран и др., 2005). По всей видимости, столь разные данные связаны с особенностями отбора пациентов (длительность заболевания, стадия, вид лечения и другие).

Тем не менее, все авторы сходятся во мнении, что наиболее частыми жалобами пациентов с БП являются учащенное мочеиспускание в течение дня и ночи, urgentные позывы и urgentное недержание мочи (Andersen, 1976, 1985; Berger et al., 1987). Данные симптомы принято относить к нейрогенному гиперактивному мочевому пузырю.

5. Диагностика

Прижизненный диагноз БП может быть в лучшем случае вероятным. Согласно диагностическим критериям БП (UK Parkinson's Disease Society Brain Bank, 1992), клиническая диагностика БП проводится в три этапа.

Этап 1. Диагностика синдрома паркинсонизма

Гипокинезия и наличие, по меньшей мере, одного из следующих симптомов: мышечная ригидность; тремор покоя 4–6 Гц; поструральная неустойчивость, не связанная с первичными зрительными, проприоцептивными, вестибулярными и мозжечковыми нарушениями.

Этап 2. Критерии исключения БП

Наличие в анамнезе повторных инсультов со ступенеобразным прогрессированием симптомов паркинсонизма, повторных черепно-мозговых травм, достоверного энцефалита; лечение препаратами, способными вызвать паркинсонизм; окулогирные кризы; наличие симптомов поражения мозжечка; раннее появление выраженной вегетативной недостаточности; длительная ремиссия; супрануклеарный паралич зрения; семейный анамнез паркинсонизма (более 1 родственника с аналогичным заболеванием); раннее появление выраженной деменции; симптом Бабинского; наличие на МРТ признаков церебральной опухоли или открытой (сообщающейся) гидроцефалии; отсутствие положительной реакции на высокие дозы леводопы; контакт с токсическими веществами, вызывающими паркинсонизм.

Этап 3. Подтверждающие критерии

Необходимо наличие не менее 3 признаков из следующих: тремора покоя, одностороннего начала заболевания, постоянной асимметрии с более выраженными симптомами на стороне тела, с которой началось заболевание, прогрессирующего течения болезни, хорошей реакции на лечение леводопой, сохранения эффекта терапии в течение 5 лет и более, выраженной дискинезии, индуцированной леводопой, длительного течения заболевания (10 лет и более).

Данные критерии обладают высокой специфичностью: 98% случаев подтверждаются патоморфологически. Дополнительными признаками, подтверждающими диагноз, могут являться нарушение обоняния, выявляемое уже на ранних стадиях болезни, зрительные галлюцинации на поздних стадиях, спровоцированные лекарственной терапией. К тому же, в настоящее время очевидно, что семейный анамнез не исключает БП. Достоверный диагноз болезни возможен лишь при патоморфологическом исследовании, выявляющем снижение численности нейронов и глиоз компактной части черной субстанции, и наличие телец Леви хотя бы в одной клетке черной субстанции или голубом пятне в отсутствие патоморфологических признаков другого заболевания.

Если на продвинутых этапах болезни диагностика не вызывает затруднений, то в начале заболевания она может быть в высшей степени затруднена, особенно при отсутствии тремора покоя. Для диагностики БП необходимо выявление синдрома паркинсонизма, наибольшие трудности могут возникать при выявлении гипокинезии. Предложен ряд тестов, облегчающих эту задачу: пальце-пальцевая проба, ког-

да пациенту предлагается быстро и с максимальной амплитудой сводить большой и указательный пальцы, тест с пронацией-супинацией кистей, тест движений в стопе: пациент постукивает пяткой по полу с максимальной быстротой, тест Фурнье: предлагается максимально быстро совершить серию движений: встать, сесть, наклониться, повернуться. Важным признаком при подозрении на БП является ахейрокинез, т.е. отсутствие содружественных движений рук при ходьбе, необходимо также проверить речь и почерк. Наличие гипокинезии недостаточно для выставления синдромального диагноза паркинсонизма, необходимо наличие тремора или повышения мышечного тонуса по пластическому типу.

В диагностике скрытой ригидности могут помочь следующие тесты. Тест Вартенберга: если занести руку под голову больного и приподнять ее, а затем резко убрать руку, то при мышечной ригидности голова падает не резко, а постепенно опускается. Прием Нойки-Таневой: если у лежащего на спине больного поднять ногу, то легче выявить повышение тонуса мышц по пластическому типу на той же стороне. Тест падения рук: обследующий неожиданно раздвигает тыльной стороной кистей руки больного, затем резко отпускает их: рука, в которой тонус преобладает, опускается быстрее. Дифференциальный диагноз пластического гипертонуса следует проводить с паратонией, которая характеризуется пассивным сопротивлением больного при исследовании мышечного тонуса, что наблюдается при поражении лобных долей.

Важным аргументом в пользу БП является тремор покоя, диагностика которого обычно не вызывает затруднений. Сложности возникают, если наблюдается изолированный постуральный тремор, который может быть единственным проявлением БП на начальной стадии. В таких случаях дифференциальный диагноз с другим частым экстрапирамидным заболеванием – эссенциальным (идиопатическим) тремором, может быть крайне затруднительным, особенно если при эссенциальном треморе наблюдается повышение тонуса мышц по пластическому типу и одностороннее начало. В пользу эссенциального тремора указывает положительный семейный анамнез, длительное доброкачественное течение, дебют эссенциального тремора с дрожания головы, чего никогда не бывает при БП. Следует учитывать, что, по крайней мере, у 6–7% больных с эссенциальным тремором в дальнейшем развивается БП (Louis, Ottman, 2013).

Помимо эссенциального тремора, с которым наиболее часто приходится дифференцировать БП, дифференциальный диагноз БП проводится с вторичным паркинсонизмом, паркинсонизмом «+» (см. критерии исключения БП) и рядом других состояний, которые могут имитировать синдром паркинсонизма: депрессией, гипотиреозом и др. При паркинсонизме страдает так называемый «язык тела», в то время как при депрессии внешний облик больного отражает его эмоциональное состояние.

6. Лечение болезни Паркинсона

Анализ широкого комплекса моторных и немоторных симптомов, характерных для клинической фазы БП, дает возможность более точно оценить степень разви-

тия болезни и разработать индивидуальную тактику лечения, направленную на ослабление не только моторных симптомов, но и нарушений в деятельности других функциональных систем, часто имеющих не менее важное значение для качества жизни пациентов. Вместе с тем каждый врач осознает трагичность ситуации – начав лечение на одной из клинических стадий по шкале Хен-Яра (Hoehn, Yahr, 1967), даже на самой ранней, вылечить больного невозможно. По крайней мере, такие случаи за последние 200 лет не известны. Лечение БП включает медикаментозную и немедикаментозную терапию, социальную реабилитацию. Медикаментозная терапия подразумевает нейропротективное и симптоматическое лечение. Лечение носит преимущественно симптоматический характер, но поскольку фармакотерапия отчасти компенсирует нейротрансмиттерный дисбаланс и при рациональном использовании увеличивает выживаемость пациентов, ее можно рассматривать и как патогенетическое лечение.

В настоящее время применяются шесть классов противопаркинсонических препаратов, т.е. препаратов, уменьшающих выраженность синдрома паркинсонизма (Winter et al., 2009, 2010b). Самым эффективным средством являются препараты леводопы, эффективно уменьшающие выраженность гипокинезии, ригидности, тремора. Более 40 лет леводопа остается «золотым стандартом» терапии БП (Иллариошкин, Яхно, 2008; Гехт, 2002). Сама леводопа не обладает сродством к дофаминергическим рецепторам, но, являясь предшественником дофамина, проникает через гематоэнцефалический барьер, захватывается терминалями нигростриатных нейронов, где подвергается декарбоксилированию с образованием дофамина. В настоящее время леводопа применяется с ингибиторами дофадекарбоксилазы (ИДДК) – карбидопой или бенсеразидом, которые не проникают в мозг и блокируют дофадекарбоксилазу на периферии, предотвращая тем самым периферические побочные действия дофамина и его метаболитов (норадреналина, адреналина), и повышают биодоступность леводопы в 5 раз.

Существование быстрорастворимых и пролонгированных форм леводопы имеет определенное значение в терапии БП. Побочные действия леводопы в основном дофаминергические и проявляются в трех сферах: вегетативной (тошнота, рвота, ортостатическая гипотония, тахикардия), психической (беспокойство, возбуждение, психозы, депрессия), двигательной (моторные флуктуации, дискинезии). Наслаиваясь на нейродегенеративный процесс, длительное лечение леводопой, имеющей короткий период полужизни в плазме, приводит к клиническому метаморфозу БП, который требует дифференцированного подхода к лечению, включающего, помимо прочего, применение других противопаркинсонических препаратов. Терапевтическая доза леводопы в составе препаратов с ИДДК составляет от 100 мг/сут и выше, доза титруется постепенно до достижения клинического эффекта, пациентов следует вести на минимально эффективных дозах. При БП обычно не рекомендуется превышать суточную дозу в 800 мг.

Вторым по эффективности классом противопаркинсонических препаратов являются агонисты дофаминовых рецепторов (АДР). Их главным преимуществом в сравнении с леводопой является более длительный период полувыведения. Это препараты разных групп, непосредственно стимулирующие дофаминовые рецепторы.

Имеют сродство преимущественно к D₂-рецепторам, стимуляция которых снижает активность непрямого кортико-стрио-паллидо-таламо-кортикального пути, который активируется при нехватке дофамина. Некоторые АDR, например прамипексол и пирибедил, обладают сродством и к D₃-рецепторам, широко распространенным в лимбической системе. Стимуляция D₃-рецепторов приводит к уменьшению выраженности часто встречающейся при БП депрессии. В целом, побочные действия АDR более выражены, чем у леводопы/ИДДК, кроме того, длительный прием эрголиновых агонистов дофамина (бромокриптин, каберголин, лизурид, перголид) может приводить к редкому, но серьезному осложнению, связанному со стимуляцией эрголиновых рецепторов – ретроперитонеальному, или легочному фиброзу. В настоящее время для лечения БП применяются неэрголиновые АDR, которые более эффективны и безопасны (прамипексол, ропинирол, пирибедил, ротиготин, апоморфин). Однако они часто вызывают выраженную дневную сонливость. В нашей стране наиболее часто применяются пирибедил 50 мг 1 таб. 3–5 раз в день в качестве монотерапии, 1–3 таб. в сочетании с леводопой; прамипексол 0,5–4,5 мг 3 раза в день в качестве монотерапии и в сочетании с препаратами леводопы. Клинической особенностью прамипексола является выраженное воздействие на тремор покоя, что позволяет его применять при треморе, резистентном к препаратам леводопы.

Ингибиторы моноаминоксидазы типа В (МАО-В) предотвращают окислительное расщепление дофамина, повышая его содержание в стриатуме. В настоящее время применяются два селективных ингибитора МАО-В: селегилин и разагилин. Селегилин является необратимым ингибитором МАО-В, обладает незначительным противопаркинсоническим действием, обусловленным помимо блокады МАО-В его метаболитами, которые непосредственно стимулируют дофаминовые рецепторы, ингибируют обратный захват дофамина и стимулируют его высвобождение в синаптическую щель. Селегилин назначается в дозе 5–10 мг 1–2 раза в день. Для предупреждения тираминзависимых гипертензивных реакций следует исключить из питания сыры, копчености, соевые соусы, пиво, красное вино. Разагилина мезилат – необратимый ингибитор МАО-В второго поколения, обладает более сильным клиническим эффектом, применяется на ранних стадиях БП в качестве монотерапии, на поздних стадиях в комплексном лечении эффективно сглаживает моторные флуктуации, индуцированные препаратами леводопы (Rascol et al., 2005). В исследованиях TEMPO (Shults, 2005), LARGO и ADAGIO (Parkinson Study Group 2004, 2005) показана способность разагилина оказывать помимо симптоматического эффекта нейропротекторное действие, что рекомендует его применение на ранних стадиях БП. Ингибиторы МАО-В нежелательно сочетать с антидепрессантами, поскольку возникает опасность развития серотонинового синдрома. Побочные действия ингибиторов МАО-В преимущественно дофаминергические.

Ингибиторы катехол-орто-метил-трансферазы (КОМТ) не обладают самостоятельным противопаркинсоническим действием и применяются обязательно в сочетании с леводопой/ИДДК. Блокирование дофадекарбоксилазы приводит к активации трансметилирования леводопы с образованием неактивного метаболита орто-метилдофа. Блокирование двух основных путей метаболизма леводопы приводит к повышению ее биодоступности. В настоящее время применяются 2 ингибитора

КОМТ: энтакапон и толкапон. Энтакапон блокирует КОМТ на периферии, не влияя на активность церебральной КОМТ. Энтакапон имеет сходную фармакокинетику с леводопой, поэтому применяется одновременно с ней. При однократном приеме энтакапон продлевает время максимальной концентрации леводопы в плазме, не повышая ее пик, при этом увеличивается время под кривой концентрация/время. Толкапон более сильный ингибитор КОМТ, в высоких дозах обладающий церебральным действием. Имеет более длительный период полувыведения, чем энтакапон, поэтому может приниматься независимо от времени приема леводопы. Гепатотоксическое действие толкапона ограничивает его применение и требует регулярного контроля печеночных ферментов. Толкапон показан, в основном, при недостаточном эффекте энтакапона. Ингибиторы КОМТ применяются для коррекции моторных флуктуаций, в настоящее время исследуется их потенциальная возможность отсрочки поздних моторных осложнений при начале терапии с препаратами леводопы. Другим положительным действием ингибиторов КОМТ может быть нормализация уровня гомоцистеина, который может повышаться при лечении препаратами леводопы/ИДДК вследствие активации реакций метилирования. Повышенный уровень гомоцистеина является фактором риска ишемической болезни сердца, деменции и др. Из побочных действий, помимо дофаминергических, наиболее часто встречаются диспептические. Энтакапон применяется в дозе 200 мг с каждой дозой леводопы, толкапон по 100 мг 3 раза в день, при необходимости по 200 мг 3 раза в день. В России энтакапон существует только в составе трехкомпонентного препарата сталево с содержанием леводопы/карбидопы в соотношении 1/4, доза энтакапона составляет 200 мг независимо от количества леводопы в таблетке (сталево 150/37,5/200, сталево 100/25/200, сталево 50/12,5/200). Переход со стандартных форм двухкомпонентных препаратов леводопы на сталево проводится одномоментно, исходя из эквивалентных по леводопе доз. Доза сталево при замене им пролонгированных форм должна быть снижена примерно на 30%. Таблетки сталево неделимы, если разовая доза недостаточна, к ней может быть добавлен двухкомпонентный препарат леводопы.

Противопаркинсонический эффект препаратов амантадина связан со следующими свойствами: блокада NMDA-рецепторов, стимуляция высвобождения дофамина из пресинаптических терминалей, стимуляция экспрессии D2-дофаминовых рецепторов в стриатуме, ингибирование обратного захвата дофамина, мягкое холинолитическое действие и слабая стимуляция дофаминовых рецепторов. Амантадины эффективны для коррекции поздней дискинезии. Предполагается, что регулярный прием амантадинов при БП способствует профилактике деменции. Хорошая переносимость делает их прием почти обязательным на всех этапах лечения БП. Более длительное действие амантадина сульфата и меньшая пиковая концентрация обуславливают его лучшую переносимость и низкую вероятность развития толерантности, а наличие инфузионной формы амантадина сульфата особенно важно для лечения декомпенсации БП. Суточная доза для амантадина сульфата 100–500 мг, амантадина гидрохлорида 100–300 мг. Побочные действия амантадина включают отеки, «мраморность» кожи, спутанность сознания, бессонницу.

Холинолитики – первый класс препаратов, который стал применяться для лечения БП, оказывают действие в основном на тремор покоя. Относительно низкая эффективность и множество побочных действий ограничивают их применение. Побочные эффекты холинолитиков включают тахикардию, снижение перистальтики желудочно-кишечного тракта, мидриаз, слабость аккомодации, сухость во рту, задержку мочи, дискинезии пика дозы. Но наиболее серьезные побочные действия – усугубление когнитивных нарушений и психозы, возникающие в связи с блокадой рецепторов в лобной коре и гиппокампе, где наблюдается гибель холинергических нейронов. Более того, длительный прием холинолитиков приводит к необратимым нарушениям памяти в связи с развитием альцгеймероподобных изменений в мозге, особенно у пожилых пациентов. Применение холинолитиков может быть отчасти оправдано у молодых больных с выраженным дрожательным гиперкинезом и относительно сохранным когнитивным статусом. В целом, лучше избегать этих препаратов. В нашей стране применяются тригексифенидил (циклодол) 2 мг 2–3 раза в день, бипериден (акинетон) 2 мг 2–3 раза в день.

Целью медикаментозной терапии любого хронического прогрессирующего заболевания, включая БП, является достижение оптимальной компенсации имеющихся нарушений для обеспечения социальной адаптации больного. Наиболее эффективным средством являются препараты леводопы, однако их длительный прием сопряжен с почти неизбежным развитием моторных осложнений – двигательных флуктуаций и дискинезий, которые являются самостоятельным инвалидирующим фактором. Леводопа, имея короткий период полувыведения, достаточно быстро исчезает из крови, однако в начале лечения ее терапевтический эффект сохраняется в течение дня, благодаря тому что сохранившиеся дофаминергические нейроны способны накапливать и хранить дофамин в своих терминалях, плавно его высвобождая, т.е. обладают «буферной» функцией. По мере гибели nigrostriатных нейронов способность хранить и высвобождать леводопу падает. Леводопа в большей степени подвергается декарбоксилированию в глиальных и недофаминергических нейронах, которые содержат дофадекарбоксилазу, но не обладают свойством хранить и плавно высвобождать дофамин и не находятся под дофаминергическим контролем, из этих клеток дофамин достигает постсинаптической мембраны путем диффузии. При многократном приеме леводопы в течение дня постсинаптическая мембрана подвергается нефизиологической, пульсирующей стимуляции, это приводит к нарушению регуляции генов и белков в нейронах и влечет за собой изменения паттерна их активности (Koller, 2000).

Ранним и самым частым проявлением моторных флуктуаций является феномен истощения эффекта разовой дозы леводопы, когда после приема препаратов леводопы симптомы паркинсонизма постепенно регрессируют («on»-период), далее спустя несколько часов, плавно, в течение 30–45 мин нарастают («off»-период). «Off»-период у большинства больных сопровождается нарастанием ряда немоторных симптомов: вегетативных (одышка, тахикардия, ощущение жара или холода, дискомфорт в грудной или брюшной полости), психических (тревога, депрессия, замедленное мышление), сенсорных (боли, парестезии). Ранним проявлением фе-

номена «истощения» является нарастание симптомов паркинсонизма утром после ночного перерыва в приеме («акинезия» раннего утра) или после пропуска очередной дозы леводопы. Однако у многих больных ночной сон приводит к парадоксальному улучшению двигательных симптомов, несмотря на ночной перерыв в приеме леводопы, этот феномен может рассматриваться как «благотворный эффект сна». С течением времени переходы от состояния относительного благополучия к обездвиженности становятся более быстрыми. Если симптомы паркинсонизма нарастают за несколько минут, диагностируется феномен «включения-выключения» («on-off»-периоды), симптомы паркинсонизма при этом рикошетно усиливаются. Для «off»-периода при феномене «включения-выключения» характерны более выраженные немоторные симптомы. При «on»-периоде может наблюдаться гипоманиакальное состояние, эйфория. Поскольку четко прослеживается связь с приемом леводопы, такие колебания моторных симптомов называются предсказуемыми «on-off»-периодами. Далее связь с приемом леводопы теряется, периоды «выключения» становятся непредсказуемыми, но чаще наступают при падении концентрации леводопы в плазме. К непредсказуемым «выключениям» феноменологически близки «застывания» – внезапная блокада двигательного акта, чаще локомоторного, которая нередко приводит к падениям. «Застывания» чаще наблюдаются в периоде «выключения». Среди других моторных флуктуаций нередко встречаются «отсроченное включение» (характеризуется наступлением эффекта разовой дозы спустя 60 мин и более после приема), «отсутствие включения» (отсутствие ожидаемого эффекта после приема леводопы), ухудшение после приема очередной дозы. Их проявления связаны с гастропарезом (леводопа всасывается в проксимальном отделе тонкого кишечника), приемом белковой пищи, т.к., являясь аминокислотой, леводопа конкурирует с пищевыми аминокислотами за всасывание в кишечнике и проникновение через гематоэнцефалический барьер. Феномен «неравномерного действия» одинаковых доз леводопы (при многократном приеме дневные или вечерние дозы действуют слабее утренних) может быть связан со снижением чувствительности дофаминовых рецепторов после каждого приема леводопы (которая после ночного перерыва восстанавливается).

Дискинезии могут быть представлены хореей, мышечной дистонией, баллизмом, миоклонией, акатизией, синдромом беспокойных ног, редко стереотипиями. Дискинезии определенным образом совпадают во времени с моторными флуктуациями у одного и того же больного. С клинической точки зрения удобно разделить дискинезий на три основных варианта. Дискинезии «пика дозы» проявляются, когда влияние леводопы на симптомы паркинсонизма становится максимальным. Чаще это хореея («хореея пика дозы») или хореодистония верхней половины тела. С течением времени порог дискинезий снижается и они могут сопровождать весь период «включения». В тяжелых случаях период «включения» может проявляться только дискинезиями, без какого-либо регресса симптомов паркинсонизма. Дискинезии «периода выключения» (дистония «периода выключения») проявляются статическими дистоническими установками, часто болезненными, наблюдающимися, как правило, в ногах, и сильнее выражены на более пораженной стороне. Дистония

появляется, когда действие отдельной дозы леводопы прекращается. Разновидностью «дискинезии периода выключения» является «дистония раннего утра». Двухфазные дискинезии встречаются гораздо реже и проявляются дистоническими, баллистическими или хореоформными гиперкинезами. Гиперкинезы возникают в начале и конце действия леводопы и отсутствуют, когда симптомы паркинсонизма выражены минимально. Дискинезии этого типа наиболее тяжело переносятся больными, описаны случаи внезапной смерти от сердечной аритмии. Другим вариантом двигательных осложнений является феномен «jo-jo-ing», когда у пациента периоды обездвиженности внезапно сменяются выраженными генерализованными гиперкинезами, абсолютно непредсказуемыми во времени.

Факторы, обуславливающие развитие моторных флуктуаций и дискинезий: возраст больных (риск выше у пациентов молодого возраста), стадия заболевания (при начале лечения леводопой на 1–2-й стадиях флуктуации развиваются спустя 3–5 лет, при назначении леводопы на 4-й стадии они появляются уже через несколько месяцев), суточная и кумулятивная доза леводопы за весь период лечения, индивидуальная чувствительность к леводопе, генетическая детерминированность, семейный анамнез и др.

При появлении моторных флуктуаций применяются следующие меры:

- дробление суточной дозы леводопы на несколько приемов (но не более 6–7),
- использование препаратов с замедленным высвобождением,
- повышение дозы леводопы,
- добавление препаратов, увеличивающих продолжительность действия разовой дозы леводопы (ингибиторы КОМТ и MAO-B),
- добавление агонистов дофамина, амантадина.

Эти меры наиболее эффективны при феномене «истощения», в какой-то степени при феномене предсказуемых «on-off»-периодов. Если же феномен «включения-выключения» носит непредсказуемый характер, то он наиболее трудно поддается коррекции. Иногда повышение разовой дозы леводопы позволяет перевести непредсказуемые флуктуации в предсказуемые. Дополнительными мерами для коррекции флуктуаций могут быть применение препаратов леводопы в растворенной форме (мадопар быстродействующий), что позволяет быстрее достичь состояния «включения», применение средств, усиливающих перистальтику желудка (домперидон, цизаприд), модификация диеты с приемом белковой пищи вечером. При ночной акинезии на ночь рекомендуется прием препаратов леводопы с замедленным высвобождением или леводопы с ингибитором КОМТ, агониста дофамина. Для коррекции застываний, особенно если они не связаны с определенной фазой действия леводопы, важное значение имеет обучение навыкам произвольной регуляции ходьбы (переступание через L-образную трость, танцевальные движения и др.). Определенную пользу при застываниях, как и при постуральной неустойчивости и нарушениях регуляции ходьбы, могут принести препараты с норадренергической активностью (пирибедил, йохимбин, дезипрамин), блокаторы NMDA-глутаматных рецепторов – амантадины. Отмечено, что длительный прием ингибиторов MAO-B снижает риск развития застываний.

Для коррекции дискинезий важное значение имеют препараты амантадина. При дистонии периода «выключения» эффективны те же меры, что и при феномене истощения разовой дозы леводопы, дополнительно могут быть назначены холинолитики, миорелаксанты (баклофен). Прием растворимых форм леводопы натошак позволяет быстро преодолеть дистонию «раннего утра». При дискинезиях периода «включения» следует отменить или снизить дозу холинолитика и ингибитора МАО-В, по возможности снизить дозу леводопы, одновременно назначив агонист дофамина и/или ингибитор КОМТ. При недостаточности этих мер дополнительно может быть назначен клоназепам. Труднее поддаются коррекции двухфазные дискинезии. В целом, они требуют усиления противопаркинсонической терапии и уменьшения продолжительности переходного периода, что может быть достигнуто заменой пролонгированных форм леводопы на стандартные, добавлением ингибиторов КОМТ, агонистов дофамина, амантадина. В некоторых случаях приходится увеличивать разовую дозу леводопы со снижением количества ее приемов.

Выбор препарата для начальной терапии БП остается сложной проблемой. Следует учитывать возраст пациента, клиническую форму, степень тяжести БП, сопутствующие соматические заболевания, состояние психических и вегетативных функций, социально-психологические факторы. У молодых пациентов (до 50 лет) на начальной стадии БП с учетом большей продолжительности предстоящей жизни и высокой вероятности развития моторных осложнений лечение может быть начато с агониста дофамина, амантадина, или ингибитора МАО-В. Если максимальная доза агониста дофамина оказывается недостаточной, следует перейти на комбинированную терапию этими препаратами с последующим добавлением малых доз леводопы. В возрасте 50–70 лет начало терапии агонистами дофамина возможна при малой и умеренной выраженности двигательного дефекта и отсутствии выраженных когнитивных нарушений, в иных случаях лечение следует начинать с малых доз леводопы (до 300–400 мг/сут), при необходимости добавляя другие противопаркинсонические средства. Моторные осложнения у пожилых больных развиваются позже и выражены слабее, в то же время пожилые больные хуже переносят комбинацию препаратов, больше расположены к психическим осложнениям из-за когнитивных нарушений сопутствующих заболеваний. При начале заболевания после 70 лет лечение может сразу начинаться с препаратов леводопы в минимальных эффективных дозах, которые в дальнейшем приходится повышать, а при появлении моторных флуктуаций и дискинезий добавлять ингибиторы КОМТ, агонисты дофамина и др. В целом, чем моложе больной, тем позже следует назначать леводопу. Вместе с тем, следует предостеречь от неоправданно позднего назначения препаратов леводопы, т.к. способность продлевать жизнь больным достигается при сравнительно раннем их назначении. На ранних стадиях БП эффективность АДР последних поколений (прамипексол, ропинирол) сопоставима с леводопой, что позволяет их применять при 1–2-ой стадиях БП для отсрочки появления моторных флуктуаций и дискинезий. Таким образом, достижение пациентом 3-й стадии следует рассматривать как один из критериев перехода на комбинированную терапию с леводопой.

7. Лечение вегетативных проявлений болезни Паркинсона

При *ортостатической гипотензии* рекомендовано снижение дозы противопаркинсонических препаратов (агонистов дофамина, леводопы), увеличение потребления соли и воды, тугое бинтование нижних конечностей, отмена диуретиков и сосудорасширяющих средств, назначение минералокортикоида флудрокортизона (0,1–0,6 мг/сут), α -адреномиметика мидодрина (5–10 мг 3 раза в день).

Для коррекции *сниженной перистальтики желудочно-кишечного тракта, запоров* следует отменить препараты с холинолитическими свойствами; увеличить потребление продуктов с высоким содержанием клетчатки, физические упражнения, увеличение объема потребляемой воды, назначить прокинетики – домперидон или цизаприд, слабительные, действующие осмотически – лактулозу или макроголь.

Нарушения мочеиспускания. Основным проявлением нарушений мочеиспускания при БП является гиперактивный мочевой пузырь как следствие супрасакральной денервации мочевого пузыря. Основной линией лечения нейрогенного мочевого пузыря являются препараты М-холиноблокирующего свойства: оксибутирин, толтеродин, троспиум, солифенацин, дарифенацин и фезотеродин. В работах Г.Г. Кривобородова с соавторами (2007) больным БП и нейрогенной детрузорной гиперактивностью последовательно сроком по 12 недель назначали М-холинолитики. Результаты применения всех холиноблокаторов у больных БП оказались сравнимы. Это касалось как лечебного эффекта, так и переносимости препарата. Однако авторы обращают внимание, что одним из возможных побочных эффектов М-холиноблокирующих средств является нарушение когнитивной функции (Кривобородов и др., 2007).

В последние годы для лечения нейрогенной детрузорной гиперактивности используется ботулинический токсин типа А. При локальном введении в терапевтических дозах активное вещество не проникает через гемато-энцефалический барьер и не вызывает существенных системных эффектов. Данный факт является несомненным плюсом для больных БП. Наш опыт применения внутридетрузорных инъекций ботулотоксина показывает высокую эффективность. Однако, учитывая возможность развития острой и хронической задержки мочи, метод имеет ряд ограничений. При отборе пациентов для применения ботулинотерапии важно принимать во внимание функцию рук больного, т.к. в случае развития задержки мочи он должен быть способен в течение нескольких месяцев проводить интермиттирующую самокатетеризацию. Таким образом, противопоказанием к введению ботулинического токсина типа А в детрузор является дрожательная форма БП (в особенности с постуральным тремором) и развернутые стадии, как 4 и 5 по Хен-Яру.

Дисфагия. Некоторые пациенты могут получить определенный положительный эффект от оптимизации дофаминергической терапии. В случаях, если затруднение глотания затрудняет прием лекарств, необходимо применение жидких форм препаратов леводопы. За рубежом альтернативным способом терапии при БП с тяжелыми нарушениями глотания является парентеральное введение апоморфина.

При *сиалорее* наиболее эффективны инъекции ботулотоксина.

При эректильной дисфункции у мужчин в первую очередь следует отменить холинолитики, оптимизировать дофаминергическую терапию. При неэффективности данных мер – назначить средства, усиливающие рефлекторную эрекцию, такие как ингибиторы фосфодиэстеразы 5 типа (силденафил, варденафил, тадалафил или уденафил). При применении препаратов данного ряда необходимо обращать внимание на то, что в сочетании с α -блокаторами (средствами, широко используемыми для купирования симптомов гиперплазии простаты у пожилых мужчин) они могут усиливать явления ортостатической гипотензии. Таким образом, при первичном назначении ингибиторов фосфодиэстеразы 5 типа не следует использовать максимальные дозы этих препаратов (Коршунова и др., 2013).

При сниженном *потоотделении* противопоказаны холинолитики и, может быть, амантадины, т.к. они снижают продукцию пота. При тошноте и рвоте, которые могут возникать в периоде титрования дозы АДР или препаратов леводопы, применяется домперидон (противопоказаны метоклопрамид, нейролептики).

8. Лечение центральных немоторных проявлений болезни Паркинсона

Психические расстройства. При деменции показаны ингибиторы холинэстеразы – ривастигмин (3–12 мг/сут) донепезил (5–10 мг/сут), галантамин (16–24 мг/сут). Может применяться акатинол мемантин (10–20 мг/сут) в качестве монотерапии или в сочетании с ингибиторами холинэстеразы, акатинол нельзя сочетать с амантадинами. Уточнить. Противопоказаны препараты с антихолинэргическим потенциалом.

Деменция является фактором риска психотических расстройств. При их появлении в первую очередь следует исключить инфекцию, метаболические, токсические нарушения, дегидратацию, отменить препараты с холинолитическим действием. При невозможности осуществления этих мер из-за нарастания симптомов паркинсонизма применяются атипичные нейролептики: клозапин (6,25–50 мг на ночь), кветиапин (25–100 мг/сут), оланзапин (2,5–15 мг/сут), рисперидон (0,5–2 мг/сут). Антипсихотической активностью обладают также ингибиторы холинэстеразы, селективный антагонист 5-HT₃ рецепторов ондансетрон (12–24 мг/сут)

Депрессия. Если оптимизация противопаркинсонической терапии не принесла успеха, следует назначить хорошо переносимые селективные ингибиторы обратного захвата серотонина (СИОЗС). В редких случаях СИОЗС вызывают ухудшение двигательных симптомов.

Нарушения сна и бодрствования. При инсомнии помимо коррекции ночной акинезии, императивных позывов на мочеиспускание, депрессии, артериальной гипертензии в положении лежа, часто являющихся причиной ночных пробуждений, дополнительно могут быть назначены на ночь антидепрессанты с седативным действием. Антидепрессанты не вызывают привыкания. Коротким курсом могут использоваться снотворные группы циклопирролонов (зопиклон 7,5 мг) или ими-

дазопиридинов (золпидем 10 мг), последние не столь эффективны, но менее токсичны. При парасомниях (нарушениях поведения во сне, спутанности сознания во сне, ночных кошмарах) следует отменить назначенные ранее седативные препараты, перераспределить суточную дозу дофаминергических средств, уменьшив последнюю дозу, при необходимости назначить атипичный нейролептик. Антисеротониновые препараты (метисергид) способны блокировать ночную миоклонию. Коррекция дневной гиперсонливости требует выявления и коррекции нарушений ночного сна, ортостатической гипотензии, гипотиреоза (совместно с эндокринологом). При возникновении гиперсонливости вследствие приема агониста дофаминовых рецепторов целесообразно заменить его другим агонистом, возможно, назначить ингибитор МАО-В или амантадин. При неэффективности этих мер дополнительно могут быть назначены психостимуляторы (метилфенидат, модафинил).

В комплекс лечения БП должны быть включены лечебная физкультура, речевая терапия, нейропсихологический тренинг. Методы психологической коррекции оказывают очень существенную поддержку больным на протяжении всей болезни.

9. Заключение

Болезнь Паркинсона – хроническое нейродегенеративное заболевание, несмотря на определенные успехи, достигнутые в изучении молекулярных и биохимических механизмов развития болезни, причины заболевания по-прежнему остаются неизвестными. В связи с этим этиологическое лечение не разработано, а терапия носит преимущественно симптоматический характер и продолжается в течение всей жизни больного. При этом на поздних стадиях болезни состояние и самочувствие больных во многом определяются немоторными симптомами и нередко ятрогенными нарушениями, коррекция которых, как правило, недостаточно эффективна. Высокие экономические потери, связанные с БП, вызваны необходимостью постоянной терапии, преждевременной утратой трудоспособности и практически неизбежной тяжелой инвалидизации больных, требующих ухода, что является социальным и экономическим бременем как для родственников больных, так и для общества в целом. В то же время, раннее выявление признаков БП и своевременно начатая терапия способствует длительной активности больных и продлению их жизни не только за счет коррекции симптомов, но и благодаря поддержке механизмов нейропластичности. Начатая терапия БП на этапе появления неспецифических немоторных симптомов до манифестации классических двигательных нарушений, когда еще не возник срыв компенсаторных механизмов, вероятно, обладает превентивным действием. В связи с этим особую актуальность обретает разработка и внедрение доступных методов доклинической диагностики в скрининг здоровья населения.

Литература

Гехт А.Б. Применение агонистов дофамина при болезни Паркинсона // Журнал неврол. и псих. им. С.С. Корсакова. 2002. Т. 102. № 12. С. 53-55.

- Голубев В.Л., Левин Я.И., Вейн А.М. Болезнь Паркинсона и синдром паркинсонизма. М.: МЕДпресс, 1999.
- Дамулин И.В. Патогенетические и терапевтические аспекты деменции при болезни Паркинсона // Журнал неврол. псих. им. Корсакова. 2009. Т. 109, № 2, С. 73-77.
- Коришунова Е.С., Попов Г.Р., Бодырева Е.А., Гудкова А.А., Гехт А.Б. Применение тадалафила при лечении эректильной дисфункции вследствие болезни Паркинсона // Мат. конференции «Мужское здоровье и долголетие». 2013. С. 38-39.
- Кривобородов Г.Г., Гехт А.Б., Коришунова Е.С. Формы урологической патологии и их лечение при болезни Паркинсона // Журнал неврол. и псих. им. С.С. Корсакова. 2007. № 4. С. 68-72.
- Иллариошкин С.Н., Яхно Н.Н. Болезнь Паркинсона и расстройства движений. М.: Диалог, 2008. 405 с.
- Левин О.С., Докладина Л.В. Эпидемиология паркинсонизма и болезни Паркинсона // Неврол. журн. 2005. № 5. С. 41-48.
- Шток В.Н., Федорова Н.В. Болезнь Паркинсона // Экстрапирамидные расстройства: руководство по диагностике и лечению. Ред. В.Н. Шток, И.А. Иванова-Смоленская, О.С. Левин. М.: МЕДпресс-информ. 2002. С.87-124.
- Aarstrand D., Hutchinson M., Larsen J.P. Cognitive, psychiatric and motor response to galantamine in Parkinson's disease with dementia // Int. J. Geriatr. Psychiatry. 2003. Vol. 18. № 10. P. 937-941.
- Abbott R.D., Petrovitch H., White L.R. et al. Frequency of bowel movements and the future risk of Parkinson's disease // Neurology. 2001. Vol. 57. № 3. P. 456-462.
- Abrams P, Cardoso L., Fall M. et al. The standardisation of terminology of lower urinary tract function // Report from the Standardisation Sub-committee of the International Continence Society. Neurourol Urodyn, 2002. Vol. 21. P. 167-178.
- Camicoli R. et al. Parkinson's disease is associated with hippocampal atrophy // Mov. Disord. 2003. P. 784-790.
- Christmas T.J., Kempster P.A., Chapple C.R., Frankel J.P., Lees A.J., Stern G.M., Milroy E.J. Role of subcutaneous apomorphine in parkinsonian voiding dysfunction // Lancet. 1988. Vol. 2. P. 1451-1453.
- Findley L., Aujla M., Bain P.G. et al. Direct economic impact of Parkinson's disease: a research survey in the United Kingdom // Mov. Disord. 2003. Vol. 18. № 10. P. 1139-1145.
- Gao X., Chen H., Schwarzschild M.A. et al. Erectile function and risk of Parkinson's disease // Am. J. Epidemiol. 2007. Vol. 166. № 12. P. 1446-1450.
- Giladi N., Balash J. Paroxysmal locomotion gait disturbances in Parkinson's disease // Neurol. Neurochir. Pol. 2001. 35. P.57-63.
- Hagell P., Nordling S., Reimer J., Grabowski M., Persson U. Resource use and costs in a Swedish cohort of patients with Parkinson's disease // Mov. Disord. 2002. Vol. 17. № 6. P. 1213-1220.
- Hawkes C.H., Shephard B.C., Daniel S.E. Olfactory dysfunction in Parkinson's disease // J. Neuronal Neurosurg Psychiat. 1997. Vol. 62. P. 436-446.
- Hely M.A., Morris J.G., Reid W.G., Trafficante R. Sydney multicenter study of Parkinson's disease: non-L-dopa-responsive problems dominate at 15 years // Mov. Disord. 2005. Vol. 20. № 2. P. 190-199.
- Hoehn M.M., Yahr M.D. Parkinsonism: onset, progression and mortality // Neurology. 1967. Vol. 17. № 5. P. 427-442.
- Huse D.M., Schulman K., Orsini L., Castelli-Haley J., Kennedy S. Lenhart G. Burden of illness in Parkinson's disease // Mov. Disord. 2005. Vol. 20. № 11. C. 1449-1454.
- Jancovic J. International classification of disease, tenth revision (ICD-10 NA): neurological adaptation // Extrapiramidal and Movement Disorders. 1995. Vol. 10. № 5. P. 533-540.
- Keränen T., Kaakkola S., Sotaniemi K. et al. Economic burden and quality of life impairment increase with severity of PD // Parkinsonism Relat Disord. 2003. Jan. Vol. 9. № 3. P. 163-168.
- Kerr G.K., Worringham C.J., Cole M.H., Lacherez P.F., Wood J.M., Silburn P.A. Predictors of future falls in Parkinson disease // Neurology. 2010. Jul. 13. Vol. 75. № 2. P. 116-124.
- Khan Z, Starer P., Bhola A. Urinary incontinence in female Parkinson's disease patients. Pitfalls of diagnosis // Urology. 1989. Vol. 33. P. 486-489.
- Koller W.C. Levodopa in the treatment of Parkinson's disease // Neurology. 2000. Vol. 55. № 11. Suppl. 4. P. 2-7.
- Le Pen C., Bonastre J., Pinton P. Medico-economic evaluation of abciximab // 1999. Vol. 48. № 1. P. 80-86.

- Lees A.J.* Drugs for Parkinson's disease // *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry.* 2002. Vol. 73. № 6. P. 607-610.
- Lewin R.J., Dulard G.V., Porter R.W.* Extrapyramidal inhibition of the urinary bladder // *Brain Res.* 1967. № 4. P. 301-309.
- Louis E.D., Ottman R.* Is there a one-way street from essential tremor to Parkinson's disease? Possible biological ramifications // *Eur. J. Neurol.* 2013. Vol. 20. № 11. P. 1440-1444
- Magerkurth C., Schnitzer R., Braune S.* Symptoms of autonomic failure in Parkinson's disease: prevalence and impact on daily life // *Clin. Auton. Res.* 2005. Vol. 15. № 2. P. 76-82.
- Mayeux R., Chen J., Mirabello E., Marder K., Bell K., Dooneief G., Cote L., Stern Y.* An estimate of the incidence of dementia in idiopathic Parkinson's disease // *Neurology.* 1990. Vol. 40. № 10. P. 1513-1517.
- Marin R.S., Firinciogullari S., Biedrzycki R.C.* The sources of convergence between measures of apathy and depression // *J. Affect. Disord.* 1993. Vol. 28. № 2. P. 117-124.
- Müller M.L. et al.* Clinical markers for identifying cholinergic deficits in Parkinson's disease // *Mov. Disord.* 2014. Vol. 12. doi: 10.1002/mds.26061.
- Peavy G.M.* Mild cognitive deficits in Parkinson disease: where there is bradykinesia, there is bradyphrenia // *Neurology.* 2010. Vol. 75. № 12. P. 1038-1039.
- Pirogovsky E., Schiehser D.M., Litvan I. et al.* Parkinsonism relat disord. 2014. Vol. 20. № 6. P. 627-631.
- Rascol O., Brooks D.J., Melamed E. et al.* LARGO study group. Rasagiline as an adjunct to levodopa in patients with Parkinson's disease and motor fluctuations (LARGO, Lasting effect in Adjunct therapy with Rasagiline Given Once daily, study): a randomised, double-blind, parallel-group trial // *Lancet.* 2005. Mar. 12–18. Vol. 365. № 9463. P. 947-954.
- Raz S.* Parkinsonism and neurogenic bladder – experimental and clinical observation // *Urol. Res.* 1976. № 4. P. 133-135.
- Sakakibara R., Shinotoh H., Uchiyama T. et al.* SPECT imaging of the dopamine transporter with [(123)I] – beta – CIT reveals marked decline of nigrostriatal dopaminergic functions in Parkinson's disease with urinary dysfunction // *J. Neurol. Sci.* 2001. Vol. 187. P. 55-59.
- Starkstein S.E., Preziosi T.J., Forrester A.W. et al.* Specificity of affective and autonomic symptoms of depression in Parkinson's disease // *J. Neurol. Neurosurg Psychiatry.* 1990. Vol. 53. № 10. P. 869-873.
- Tetrad J.W., Langston J.W.* MPTP-induced parkinsonism as a model for Parkinson's disease // *Acta. Neurol. Scand. Suppl.* 1989. Vol. 126. P. 35-40.
- Van Rooden S.M., Visser M., Verbaan D., Marinus J., van Hilten J.J.* Patterns of motor and non-motor features in Parkinson's disease // *J. Neurol. Neurosurg Psychiatry.* 2009. Vol. 80. № 8. P. 846-850.
- Von Campenhausen S., Winter Y., Gasser J. et al.* Cost of illness and health service patterns in Morbus Parkinson in Austria // *Wien. Klin. Wochenschr.* 2009. Vol. 121. № 17-18. P. 574-582.
- Wenge B., Geyer J., Bönisch H.* Oxybutynin and trospium are substrates of the human organic cation transporters // *Naunyn. Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 2011. Vol. 383. № 2. P. 203-208.
- Winter Y., von Campenhausen S., Popov G. et al.* Costs of illness in a Russian cohort of patients with Parkinson's disease // *Pharmacoeconomics.* 2009. Vol. 27. № 7. P. 571-584.
- Winter Y., Balzer-Geldsetzer M. et al.* Longitudinal study of the socioeconomic burden of Parkinson's disease in Germany // *Eur. J. Neurol.* 2010. Vol. 17. № 9. P. 1156-1163.
- Winter Y., von Campenhausen S., Popov G. et al.* Social and clinical determinants of quality of life in Parkinson's disease in a Russian cohort study // *Parkinsonism Relat. Disord.* 2010. Vol. 16. № 4. P. 243-248.
- Wolters E.C., Braak H.* Parkinson's disease: premotor clinico-pathological correlations // *J. Neural. Transm. Suppl.* 2006. № 70. P. 309-319.
- Yoshimura N., Mizuta E., Kuno S., Sasa M., Yoshida O.* The dopamine D1 receptor agonist SKF 38393 suppresses detrusor hyperreflexia in the mankey with parkinsonism induced by 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridin (MPTP) // *Neuropharmacology.* 1993. Vol. 32. № 4. P. 315-321.
- Yoshimura N., Mizuta E., Yoshida O., Kuno S.* Therapeutic effects of dopamine D1/D2 receptor agonist on detrusor hyperreflexia in 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridin-lesioned parkinsonian cynomolgus mankeys // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1998. Vol. 286. № 1. P. 228-233.

Особенности поддержания вертикальной позы на ранней стадии болезни Паркинсона

Ю.С. Левик, В.Ю. Шлыков, Н.В. Холмогорова, Т.Б. Киреева

Содержание

1. Введение
2. Методика стабиллографического исследования
3. Исследование позы при стоянии в покое – тест Ромберга
4. Исследование стабиллометрических характеристик произвольных целенаправленных перемещений центра давления
5. Исследование процесса поддержания равновесия при вибрационной стимуляции проприорецепторов мышц ног
6. Баллистография
7. Использование кресла, оснащенного силомоментными датчиками
8. Заключение

1. Введение

Наряду с основными симптомами болезни Паркинсона, составляющими классическую триаду: ригидность скелетной мускулатуры, гипокинезия, тремор «покая», в современной неврологии в качестве четвертого характерного симптома все чаще фигурируют постуральные нарушения.

Изменения позы, походки, почерка, нарушения постуральных рефлексов и раньше рассматривались неврологами в качестве информативных признаков болезни Паркинсона. Однако работа компенсаторных механизмов вначале позволяет предотвратить видимые нарушения позы, и внешне они проявляются уже на достаточно позднем этапе развития заболевания (обычно на третьей стадии болезни по Хен-Яру). Поэтому в качестве ранних информативных признаков заболевания до последнего времени рассматривались акинезия и тремор (Klockgether, 2004), а не постуральные расстройства.

При разработке подходов к выявлению ранних признаков БП мы искали нарушения в процессе поддержания человеком вертикальной позы, т.к. независимо от этиологии данного заболевания в первую очередь оно проявляется в нарушении двигательной функции, а позу можно рассматривать как частный случай движения. Во вторых – именно в позе отражаются изменения функционального состояния человека и нарушения механизмов координации, ответственных за постуральные настройки при выполнении произвольных движений. Одним из таких перспективных направлений исследований, активно развивающихся в последнее время

Сокращения: АПК – аппаратно-программный комплекс; БП – болезнь Паркинсона; КРИНД – коэффициент резкого изменения направления движения; КФР – качество функции равновесия; ОЦД – общий центр давления.

и используемых в медицинской диагностике, нейрофизиологии, реабилитации и оценке профпригодности, является анализ состояния функции равновесия человека – стабилография.

Стабилографический метод исследования процесса поддержания человеком вертикальной позы заключается в регистрации положения проекции общего центра давления (ОЦД) человека на горизонтальную плоскость опоры с использованием силоизмерительных датчиков и анализе смещений и колебаний ОЦД. Чаще всего исследования проводятся на человеке в естественной удобной вертикальной стойке в состоянии покоя или при выполнении различных диагностических тестов. В ряде случаев метод применяется при различных других положениях тела обследуемого, включая положение сидя и лежа.

Суть методов стабилографических исследований сводится к оценке биомеханических показателей человека в процессе поддержания им вертикальной позы. Тело стоящего человека совершает колебательные движения в различных плоскостях, иногда практически невидимые, иногда – хорошо заметные. Поэтому удержание равновесия человеком является сложным динамическим феноменом, требующим непрерывных микродвижений тела. В нем участвует значительное количество мышц, активность которых согласованно регулируется не только в условиях спокойного стояния, но и при осуществлении произвольных движений. Поза, или состояние «неустойчивого равновесия», является результатом взаимодействия суставно-мышечной проприорецепции, афферентации от вестибулярного и зрительного анализаторов, других систем и высших отделов центральной нервной системы. Поэтому изменения состояния или расстройство каждой из них, начиная с мышц и кончая корой головного мозга, находят отражение в изменении всех характеристик процесса поддержания позы. Как отмечал в свое время еще И.М. Сеченов, биомеханические показатели позы и движения человека являются самыми «отзывчивыми» на изменение системных связей во внутренней и внешней среде организма. По его меткому выражению, «все бесконечное разнообразие внешних проявлений мозговой деятельности сводится окончательно к одному явлению – к мышечному движению». Поэтому, изучая у человека функцию поддержания равновесия, мы фактически имеем возможность исследовать функциональное состояние многих мозговых механизмов. Характеристики позных колебаний: их амплитуда, частота, направление, а также среднее положение корпуса в проекции на плоскость опоры – являются чувствительными параметрами, отражающими состояние различных систем, включенных в поддержание вертикального баланса и обладающих как диагностической, так и прогностической ценностью.

В последнее время кроме традиционной стабилографии большой интерес привлекают кресла, оснащенные силомоментными датчиками. Такие устройства начинают все шире использоваться для записи баллистокардиограммы, оценки функционального и эмоционального состояния операторов, контроля позы с целью предупреждения закрепления неправильной осанки (Yoo et al., 2006; Baek et al., 2012), мониторинга уровня утомления (Nakane et al., 2011). В связи с этим, естественно, возникло предположение о том, что подобные устройства могут быть эффективны и для обнаружения скрытых патологических состояний двигательной системы.

2. Методика стабилографического исследования

При исследовании позы у пациентов с БП нами анализировались характеристики кинезиограммы во время поддержания равновесия пациентами, находящимися на разных стадиях заболевания и в различных условиях стояния. Для выявления скрытых признаков нарушения в работе механизмов позного контроля исследовались стабилографические показатели при поддержании вертикальной позы в покое, при произвольном изменении положения тела в пространстве и во время вибрационного воздействия на мышцы корпуса и ног обследуемого пациента (Шлыков и др., 2008; Левик и др., 2008)

Обследование позы в покое включало следующие пробы: стояние с открытыми и закрытыми глазами в удобной стойке (оценка влияния зрительной обратной связи на поддержание равновесия) и тест Ромберга (оценка влияния зрительной обратной связи в условиях уменьшенной площади опорного контура). Проводились также пробы с произвольными движениями, в которых требовалось с помощью биологической обратной связи отслеживать скачкообразное перемещение цели на экране монитора маркером, отражающим проекцию центра давления (ЦД) (тест со ступенчатым воздействием). Кроме того, исследовали поддержание позы при одно-сторонней и двухсторонней вибрационной стимуляции мышц голени (камбаловидная мышца, передняя большеберцовая мышца) и мышц, натягивающих широкую фасцию бедра.

Регистрация стабилограмм производилась с помощью компьютерного стабилографического комплекса «Стабилан-01-2.13», производства ОКБ «РИТМ» (Таганрог). Было обследовано 30 человек (14 мужчин и 16 женщин) от 35 до 71 года (средний возраст 55 лет) с давностью заболевания от 0,5 до 9 лет. Первая группа («ранние» БП) состояла из 22 больных, стадия 1,0–1,5 по Хен-Яру (Hoehn, Yahr, 1967), без постуральной неустойчивости. Вторая группа («поздние» БП) – 8 пациентов, стадия 2,0–2,5 по Хен-Яру. Результаты обследований на пациентах сравнивались с данными, полученными на здоровых людях (численность группы 15 человек, средний возраст 58 лет).

Исследовали «классические» стабилографические показатели: длины фронтальной и сагитальной стабилограммы, скорость ее изменения, а также векторные показатели статокинезиограммы, представляющие ее как набор векторов разной длины и направления. Этот новый подход предполагает, что при своевременной компенсации человеком отклонений его тела от вертикали скорость движения ЦД должна быть минимальной. Любые нарушения в системе регуляции вертикальной позы приводят к задержкам и ошибкам при коррекции отклонений тела от вертикали, большим отклонениям ЦД и как следствие – большим скоростям и резким изменениям направлений его движения (Усачев, 2008).

Были выбраны векторные показатели стабилограммы:

– качество функции равновесия (КФР) – параметр, характеризующий распределение векторов скоростей, – чем выше значение КФР, тем лучше человек поддерживает равновесие.

– коэффициент резкого изменения направления движения (КРИНД), отражающий в процентах количество векторов, направление которых более чем на 45 градусов отличается от направления предыдущего вектора, – чем ниже значение КРИНД, тем лучше человек поддерживает равновесие.

Выбранные показатели, отражающие скоростные параметры перемещения ОЦД, с нашей точки зрения, более адекватно характеризуют процесс поддержания равновесия по сравнению с площадью статокинезиограммы, величина которой существенно увеличивалась только при наличии у больного тремора покоя (Карпова и др., 2004).

3. Исследование позы при стоянии в покое – тест Ромберга

Как показали результаты обследований, при поддержании вертикальной стойки в позе Ромберга (стопы ног вместе) стабิโลграфические показатели больных паркинсонизмом отличались от показателей здоровых испытуемых даже при наличии зрительного контроля (рис. 1). Различия здоровых людей и пациентов оказались более выраженными по скорости перемещения центра давления и по КФР, особенно на ранней стадии заболевания. Изменения касались как абсолютных значений рассматриваемых параметров, так и их соотношений при открытых и закрытых глазах. Больше всего различия между группами пациентов и здоровыми людьми были выражены при отсутствии зрительного контроля. Средняя линейная скорость перемещения центра давления у БП при закрытых глазах возрастала в 1,5–2 раза по сравнению с контрольной группой. КФР у больных оказалось ниже, чем у здоровых, на 5–10%. При отсутствии зрительного контроля разница достигала 10–20%. В норме и на ранней стадии БП отсутствие зрительной информации снижало КФР примерно на 20%, а на поздних стадиях болезни при закрытых глазах он снижался

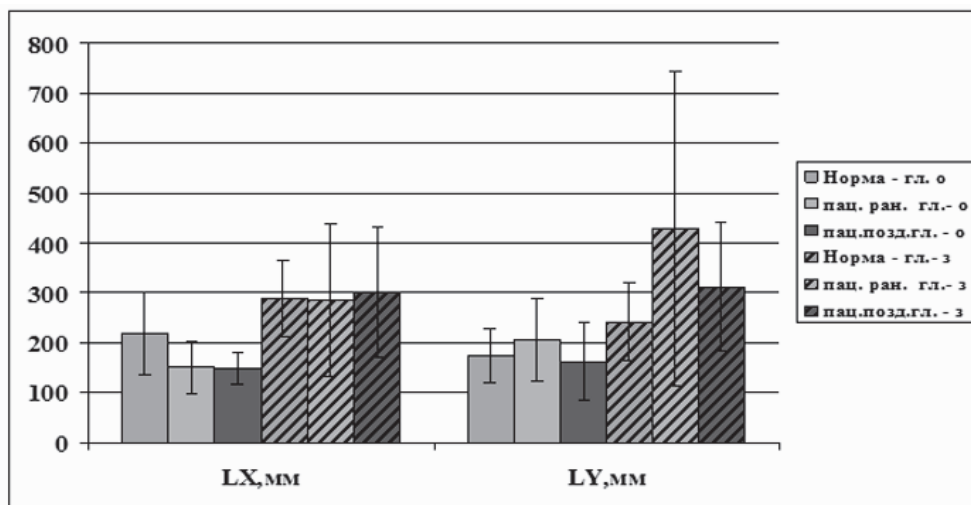


Рис. 1. Изменение длин фронтальной и сагиттальной стабิโลграмм в тесте Ромберга у здоровых и пациентов с БП на разной стадии заболевания при открытых и закрытых глазах

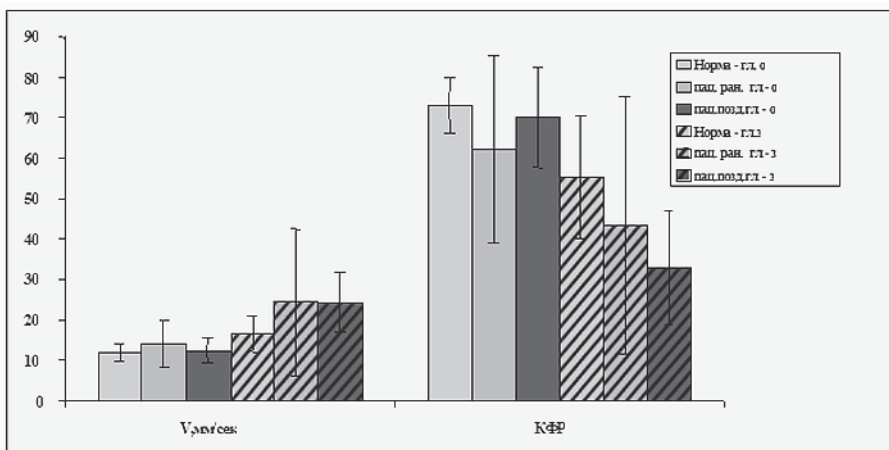


Рис. 2. Изменение скорости перемещения центра давления (V) и коэффициента функции равновесия (КФР) у здоровых и у пациентов с БП на разной стадии заболевания при открытых и закрытых глазах. Отличия по КФР между здоровыми и пациентами с поздней стадией БП достоверны ($p < 0,05$)

почти в два раза (рис. 2). КРИНД возрастал при БП в 3 раза по сравнению с нормой, но величина его не изменялась при закрытии глаз.

Полученные нами результаты в тесте с закрытыми глазами подтверждают данные о влиянии выключения зрения на характеристики устойчивости позы, но отличаются большей выраженностью изменений стабиллографических параметров, т.к. пациенты стояли не в удобной стойке (ноги на ширине плеч), а в классической позе Ромберга (ноги вместе) (Błaszcyk et al., 2007).

4. Исследование стабиллометрических характеристик произвольных целенаправленных перемещений центра давления

Для исследования характеристик произвольных целенаправленных движений при БП использовалась задача отслеживания курсором, отражающим перемещения ОЦД, перемещения цели на экране. Цель (мишень в виде концентрических окружностей) на экране монитора быстро смещалась на фиксированное расстояние. Следовательно, выполняемые пациентом произвольные движения (наклоны вперед), отслеживающие смещение цели, носили достаточно стереотипный характер, и для успешного выполнения задания требовались быстрота и точность движений.

Во время отслеживания курсором, отражающим положение ОЦД, перемещения цели на экране монитора (рис. 3) у пациентов с БП оказался повышенным латентный период начала движения, время движения к цели (время броска) и уменьшена скорость движения (скорость броска). В два раза возрастало время латентного периода движения и снижалась скорость произвольного перемещения ОЦД, особенно на поздней стадии заболевания.

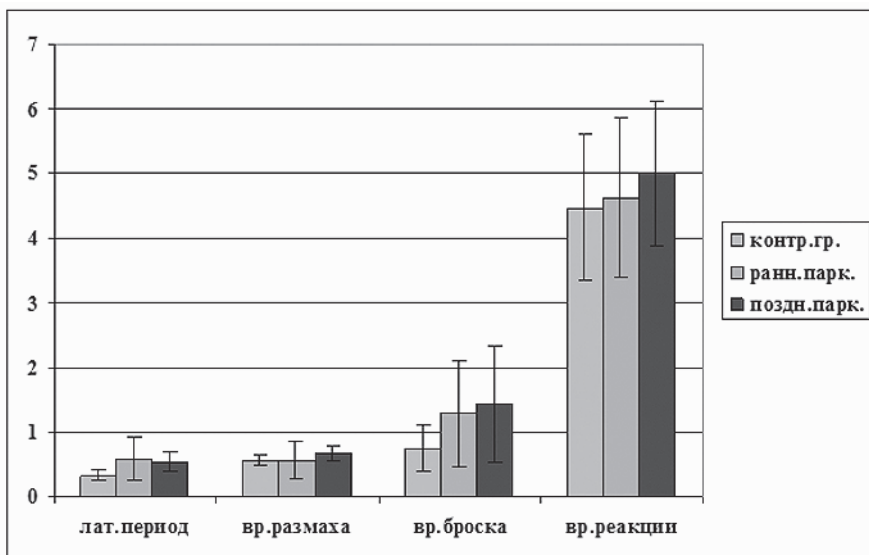


Рис. 3. Временные параметры стабилограммы при отслеживании курсором положения цели на экране у здоровых и у пациентов с БП на разной стадии заболевания. Отличия пациентов от здоровых по латентному периоду и времени броска достоверны ($p < 0,05$)

Снижение скорости произвольного перемещения ОЦД и возрастание коэффициента равновесия у больных в двигательных тестах, требовавших не только быстрого смещения ОЦД к цели, но и быстрой смены направления движения, может свидетельствовать о большей скованности пациентов с БП по сравнению со здоровыми испытуемыми.

5. Исследование процесса поддержания равновесия при вибрационной стимуляции проприорецепторов мышц ног

Исследования поддержания вертикальной позы у здоровых испытуемых во время вибрации мышц бедра или икроножной группы мышц, вызывающих отклонения корпуса, в разных позах и на разных типах опор показали, что чем больше уровень устойчивости, тем более сильное воздействие оказывала вибрация (Гурфинкель, Киреева, 1995; Гурфинкель и др., 1996).

В наших исследованиях пациенты с БП оказались менее чувствительны к воздействию вибрации по сравнению с контрольной группой. Практически у всех пациентов, в отличие от контрольной группы, не удалось вызвать отклонения корпуса во фронтальной плоскости в ответ на вибростимуляцию латеральных мышц бедра длительностью 20 секунд.

При стимуляции икроножных мышц у большинства пациентов оказалось труднее вызвать отклонение корпуса назад или вперед. Вместе с тем, у некоторых из них вибрация вызывала большие отклонения положения ОЦД и позную неустойчивость.

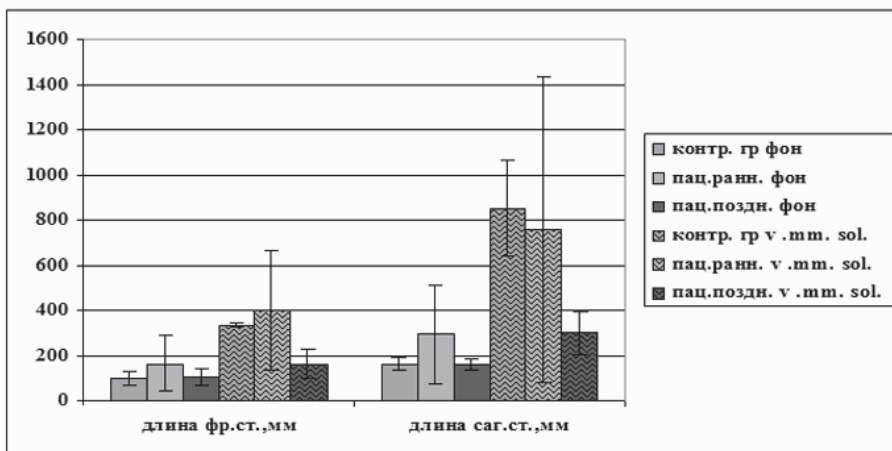


Рис. 4. Влияние вибрации икроножных мышц на длины фронтальной и сагиттальной стабилограммы в контроле и у пациентов с БП на разной стадии заболевания
V. mm. sol. – в условиях вибрации камбаловидной мышцы

На рис. 4 видно, что линейная скорость перемещения ОЦД у контрольной группы при стимуляции камбаловидной мышцы в 4 раза больше, чем при спокойном стоянии, тогда как у пациентов она повышалась только в 2–3 раза, причем на поздних стадиях болезни прирост скорости перемещения ОЦД был еще слабее.

Существенно меньше оказалась и величина отклонения от положения равновесия, особенно в сагиттальной плоскости, в ответ на воздействие вибрации. Одновременно изменялась длина фронтальной и сагиттальной стабилограммы, что было более выражено у пациентов на поздней стадии заболевания (рис. 5). В то же

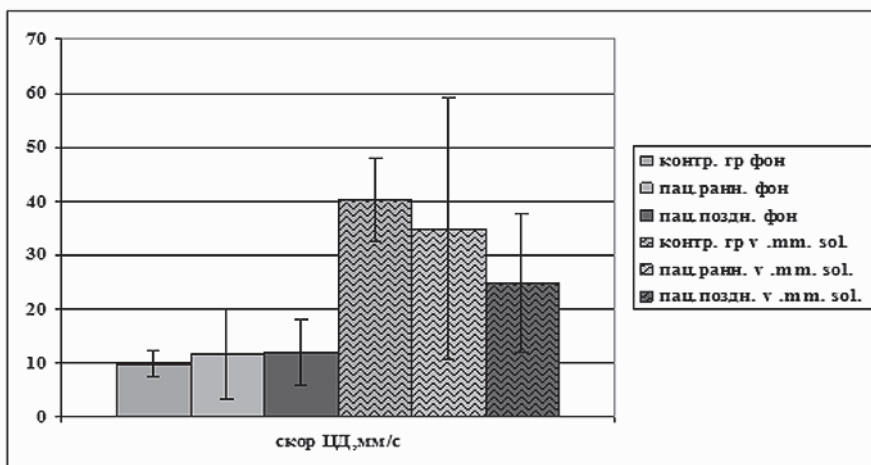


Рис. 5. Влияние вибрации икроножных мышц на скорость перемещения ЦД в сагиттальной плоскости при стоянии с закрытыми глазами
V. mm. sol. – в условиях вибрации камбаловидной мышцы

время, П. Валкович с соавторами отмечали увеличение амплитуды отклонения на воздействие короткой вибрации (1–3 с) у больных БП с большими сроками заболевания (Valkovic et al., 2006), однако обследованные ими пациенты имели склонность к внезапному падению.

Проведенные исследования показали, что пациенты отличаются от здоровых по большинству выбранных показателей в сторону ухудшения последних. Различия наблюдались у пациентов с БП как на ранних, так и на поздних стадиях заболевания.

6. Баллистография

Векторный анализ не исчерпывает диапазон методов оценки стабилметрической информации. Большой потенциал в исследовании различных неврологических и, в частности, нейродегенеративных и наследственных заболеваний при постановке или уточнении диагноза заключен в использовании частотных характеристик стабилографического сигнала, представляющего широкополосный спектр колебаний тела человека, вызванных в том числе дыханием, сердечной деятельностью, движением крови. Эти колебания проявляются в изменении вертикальных усилий – баллистограмме, которая также является интегративным сигналом.

В пилотных исследованиях, направленных на апробацию элементов предлагаемой технологии, приняли участие 6 носителей премутации X-хромосомы (родственники первой и второй степени родства больных с синдромом умственной отсталости, сцепленной с ломкой хромосомой X), 3 пациента на ранней стадии БП и 20 взрослых без диагностированных неврологических и соматических заболеваний. Регистрация осцилляторных движений тела и его частей в условиях стоя также осуществлялась с помощью стабилоанализатора «Стабилан 2-01». Оценка спектральной плотности мощности сигналов проводилась с использованием непараметрического метода П.Д. Велча (Welch, 1967). Для вычислений выбирались интервалы времени, протяженность которых превышала 60 с при частоте опроса датчиков 50 Гц. В рамках метода использовалось окно протяженностью 20 с с перекрытием 7 с.

На рис. 6 и 7 представлены спектры вертикальных усилий, регистрируемые стабилоанализатором в условиях ортоградной позы. В спектре мощности сигналов вертикальных усилий (баллистограмм) как у здоровых обследуемых (см. рис. 6), так и у пациентов с паркинсоническими нарушениями (см. рис. 7) локальные спектральные пики наблюдаются на частотах, кратных частоте сердечного ритма. При этом у здоровых обследуемых большинство этих пиков имеют сравнимые величины, в то время как для пациентов с БП (0–1 стадия по Хен-Яру) величина спектрального пика 6–8 Гц тремора в 5–10 раз превосходит величины прочих спектральных пиков. Наблюдаемый эффект усиления максимального спектрального пика на частоте 6–7 Гц, по-видимому, можно рассматривать как проявление скрытого очага генерации тремора.

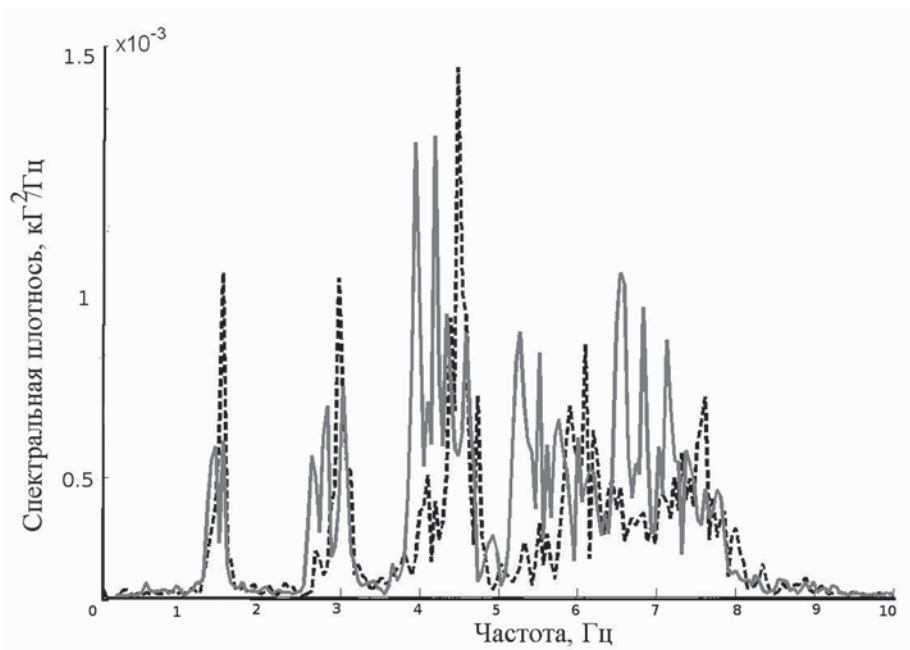


Рис. 6. Спектр мощности сигнала вертикальных усилий здорового обследуемого в условиях ортоградной позы (сплошная линия – глаза открыты, пунктир – глаза закрыты)

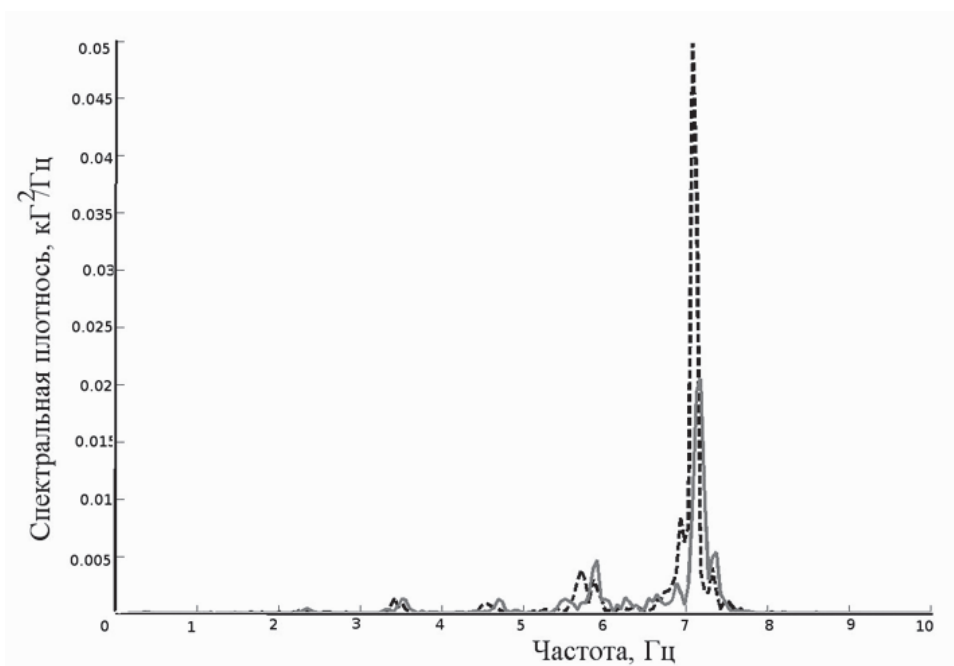


Рис. 7. Спектр мощности сигнала баллистограммы для больного с диагнозом БП в условиях ортоградной позы (сплошная линия – глаза открыты, пунктир – глаза закрыты)

7. Использование кресла, оснащенного силомоментными датчиками

Исследования тремора различных частей тела в покое и при выполнении функциональных проб проводились в условиях сидя – с помощью аппаратно-программного комплекса (АПК) «Многофункциональное кресло». Этот комплекс представляет собой специальное кресло, оснащенное семью силомоментными платформами, установленными на основных поверхностях, с которыми контактирует человек – «очувствленное кресло». Эргономика «очувствленного кресла» позволяет распределить основную составляющую веса сидящего человека на две отдельные чувствленные поверхности сидения, а парциальную составляющую веса спины – на чувствленный опорный элемент его спинки, что дает возможность оценить асимметрию позы. Парциальные составляющие веса рук и ног сидящего распределяются между чувствленными подлокотниками кресла и двумя дополнительными чувствленными поверхностями под кистями и стопами. Обследуемый спокойно сидел в АПК «Многофункциональное кресло» в удобной позе, его спина касалась спинки АПК, предплечье левой руки лежало на подлокотнике, а локоть правой руки упирался в подлокотник кресла под углом около 45° . Для усиления физиологического тремора обследуемому предлагалось правой рукой совершить статическую работу: удерживать груз весом 2 кг в течение 2–4 мин. Выбор массы груза и время его удержания определялись физическими возможностями обследуемого. Регистрация сигналов силомоментных датчиков АПК проводилась до, во время и по завершении статической работы. Общая длительность обследования на АПК «Многофункциональное кресло» составляла 5–8 мин. (Кручинин и др., 2009).

Результаты исследований показали, что при спокойном сидении у здорового человека и носителя премутации ломкой X-хромосомы в спектрограмме сигнала вертикальных усилий четко выделяется пик спектральной плотности на частоте дыхания (0,2–0,4 Гц). В диапазоне частот свыше 1 Гц наибольшая мощность спектра сигналов вертикальных усилий встречается в диапазоне частот 3,5–5,5 Гц. У некоторых носителей премутации ломкой X-хромосомы в условиях сидя в отдельных частях тела наблюдался 6–8-герцовый тремор. У спокойно сидящего пациента с диагнозом БП колебания заметной мощности регистрировались не только в вертикальном, но и в горизонтальном направлении. При этом локальные пики мощности спектра в диапазоне 6–8 Гц наблюдались в спектрограммах практически всех сигналов силомоментных датчиков АПК.

При выполнении функциональной нагрузочной пробы как у здоровых обследуемых, так и у носителей премутации ломкой X-хромосомы наблюдался усиленный физиологический тремор в руке, удерживающей груз, а в спектре вертикальных усилий сигнала правого подлокотника проявлялся локальный максимум в частотном диапазоне 6–12 Гц (рис. 8В)

У пациентов с БП в сигналах датчика правого подлокотника при удержании груза правой рукой наблюдался 6–8-герцовый тремор, незначительно превышающий уровень его спектра в той же полосе частот при удержании руки без груза (т.е. без статической нагрузки) (рис. 8А).

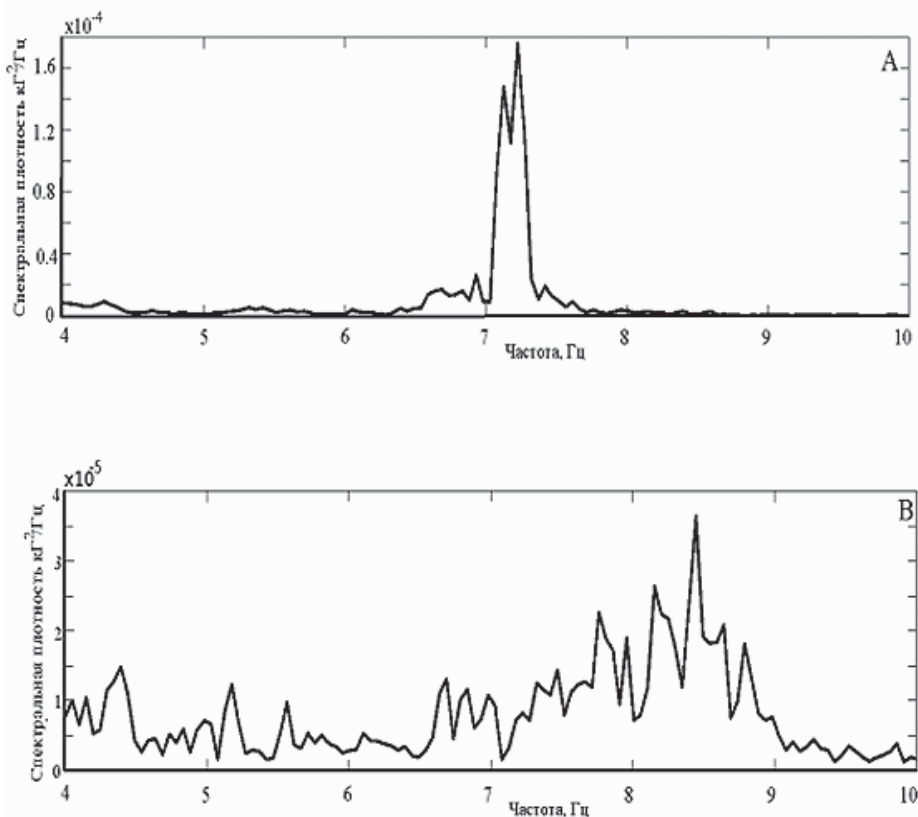


Рис. 8. Спектры мощности вертикальных усилий сигнала датчиков правого подлокотника АПК «Многофункциональное кресло», регистрируемые при удержании груза в правой руке для пациента с диагнозом БП (А) и здорового обследуемого (В)

На рис. 9 представлены спектры мощности вертикальных усилий на датчике левого подлокотника кресла, регистрируемые при удержании груза в правой руке для здорового обследуемого (А), носителя премутации ломкой Х-хромосомы и пациента с диагнозом БП (С). Как видно из рис. 8, удержание груза в правой руке у здорового обследуемого практически не влияет на высокочастотную часть спектра мощности сигналов силомоментного датчика левого подлокотника. У носителей премутации ломкой Х-хромосомы с симптомами, схожими с симптомами ранней стадии БП, статическая работа правой руки сопровождается появлением 6–8-герцового тремора в левой руке.

У пациентов с диагнозом БП «нагружение» правой руки практически не влияет на тремор покоя левой. Следует отметить, что при статической работе 6–8-герцовый тремор у носителей премутации ломкой Х-хромосомы может встречаться и в других частях тела, соприкасающихся с «очувствленными» поверхностями АПК. Степень выраженности тремора, возможно, определялась их текущим функциональным состоянием. У пациентов с БП в условиях сидя 6–8-герцовый тремор

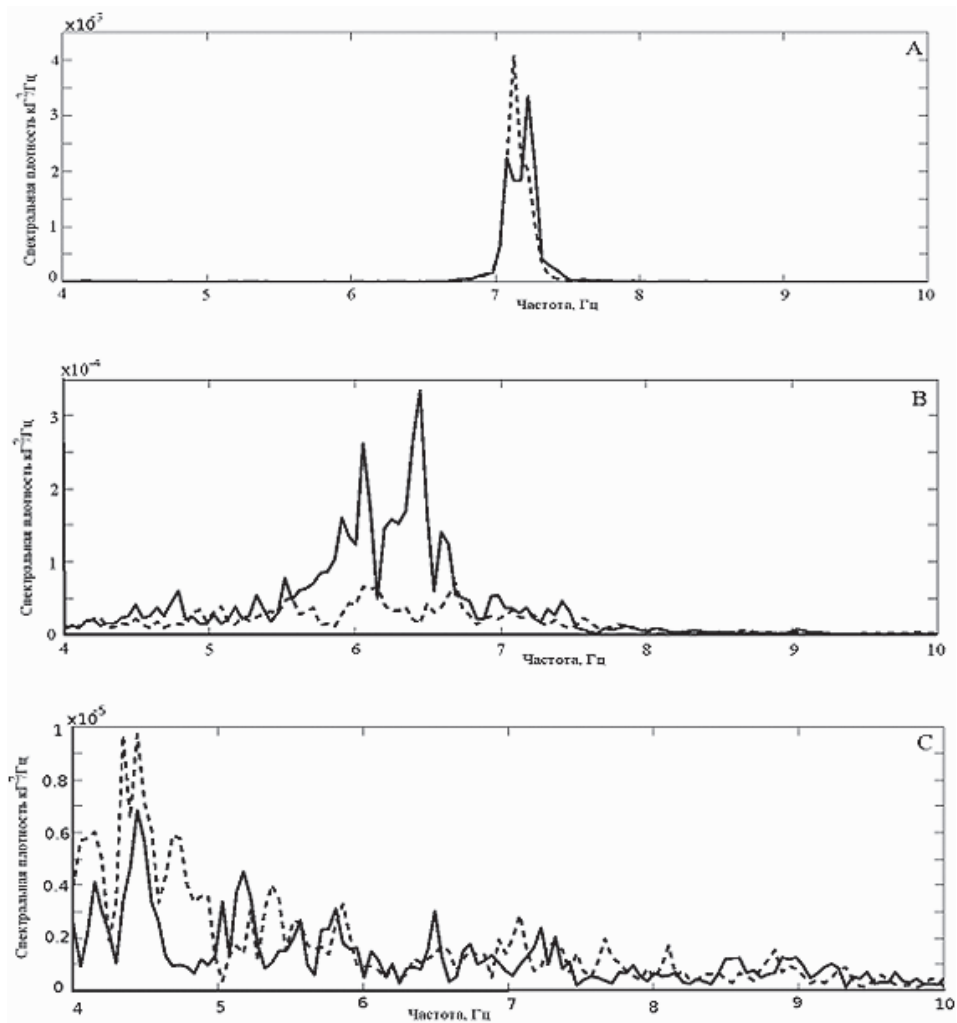


Рис. 9. Спектры мощности вертикальных усилий сигнала датчика левого подлокотника АПК «Многофункциональное кресло», регистрируемые при удержании груза в правой руке для пациента с диагнозом БП (А), носителя премутации ломкой X-хромосомы (В) и здорового обследуемого (С).

проявляется практически во всех частях тела, соприкасающихся с «очувствленными» поверхностями АПК, как до, так и во время и после выполнения статической нагрузочной пробы. При этом его амплитуда мало зависела от выполняемой статической нагрузки.

8. Заключение

Итак, проведенные исследования показали, что пациенты с БП отличаются от здоровых по большинству выбранных показателей. Наиболее перспективными

оказались векторные показатели стабิโลграмм – КРИНД и КФР. Эти показатели достоверно отличаются от показателей здоровых людей уже на ранних стадиях БП. Полученные результаты дают основания полагать, что стабิโลграфические методики, отличающиеся неинвазивностью, простотой регистрации и дешевизной, могут быть перспективны с точки зрения их использования для ранней диагностики БП.

В отличие от исследований постуральных параметров оценка тремора по обычной стабילוграмме затруднена. В этом случае более информативным является спектральный анализ баллистограммы, отражающей изменения вертикальных составляющих опорных реакций (Холмогорова и др., 2011).

Предлагаемая экспериментальная модель усиления физиологического тремора в пробах на «очувствленном» кресле позволяет зарегистрировать тремор у пациентов с БП и выявить повышенную готовность к генерации тремора у людей со скрытыми нарушениями двигательной регуляции. Таким образом, методика с использованием кресла, оснащенного силомоментными датчиками, также является перспективной с точки зрения ранней диагностики БП.

Литература

- Гурфинкель В.С., Киреева Т.Б. Поддержание вертикальной позы при одновременной вибрации икроножных и передних большеберцовых мышц // Физиология человека. 1995. Т. 21. № 5. С. 106-120.
- Гурфинкель В.С., Киреева Т.Б., Левик Ю. С. Влияние вибрации постуральных мышц на поддержание равновесия во фронтальной плоскости при разных уровнях устойчивости // Физиология человека. 1996. Т. 22. № 2. С. 83-92.
- Карпова Е.А., Иванова-Смоленская И.А., Черникова Л.А. и др. Клинико-стабилометрический анализ постуральных нарушений при болезни Паркинсона // Журнал неврол. и псих. им. С.С. Корсакова. 2004. Т. 104. № 1. С. 37-41.
- Кручинин П.А., Холмогорова Н.В., Слива С.С., Левик Ю.С., Шлыков В.Ю., Писаренко О.А. Аппаратно-программный стабילוграфический комплекс для диагностики функциональных и преморбидных состояний человека // Известия ЮФУ. Технические науки. Раздел 1. Аппаратные и программные средства функциональной диагностики и терапии. 2009. № 9. С.117-122.
- Левик Ю.С., Киреева Т.Б., Шлыков В.Ю. Особенности поддержания вертикальной позы у пациентов с болезнью Паркинсона // Альманах клинической медицины. 2008, Т. 17. Ч. 2. С. 217-220.
- Усачев В.И. Оценка динамической стабилизации центра давления стоп по данным анализа векторов стагокинезиграмы // Известия ЮФУ. Технические науки. 2008. № 6. С.124-128.
- Холмогорова Н.В., Кручинин П.А., Шлыков В.Ю. Особенности частотного анализа показаний силомоментных датчиков при исследовании постуральных микродвижений человека // Вестник Нижегородского университета им. Н.И. Лобачевского. 2011. № 4. Ч. 2. С. 475-477.
- Шлыков В.Ю., Киреева Т.Б., Левик Ю.С. Изменения стабילוграфических показателей у больных паркинсонизмом // Известия ЮФУ. Технические науки. 2008. № 6. С. 112-114.
- Baek H.J., Chung G.S., Kim K.K., Park K.S. A smart health monitoring chair for noninvasive easurement of biological signals // IEEE Trans. Inf. Technol. Biomed. 2012. Vol. 16. № 1. P. 150-158.
- Blaszczuk J.W., Orawiec R., Duda-Kłodowska D., Opala G. Assessment of Postural instability in patients with Parkinson's disease // Exp. Brain Res. 2007. Vol. 183. № 1. P. 107-114.
- Hoehn M.M., Yahr M.D. Pfrkinsonism: onset, progression and mortality // Neurology. 1967. Vol. 17. № 5. P. 427-442.
- Klockgether Th. Parkinson's disease: clinical aspects // Cell Tissue Res. 2004. Vol. 318. P. 115-120.

- Nakane H., Toyama J., Kudo M.* Fatigue detection using a pressure sensor chair // IEEE Intern. Conference on Granular Computing (GrC). 2011. Vol. 8-10. P. 490-495.
- Valcovic P., Krafczik S., Bötzel K.* Postural reactions to soleus muscle vibration in Parkinson's disease: scaling deteriorates as disease progresses // Neurosci. Lett. 2006. Vol. 401. № 1-2. P. 92-96.
- Welch P.D.* The use of fast fourier transform for the estimation of power spectra: a method based on time averaging over short, modified periodograms // IEEE Trans. Audio Electroacoust. 1967. Vol. AU-15. P. 70-73.
- Yoo W., Yi C., Kim M.* Effects of a proximity-sensing feedback chair on head, shoulder, and trunk postures when working at a visual display terminal // J. Occup. Rehabilitation. 2006. Vol. 16. P. 631-637.

Болезнь Паркинсона и эссенциальный тремор: сходство синдрома при разных прогнозах

М.Е. Курганская, А.А. Фролов, М.Е. Иоффе

Содержание

1. Введение
2. Эпидемиология и этиология
3. Патогенез болезни Паркинсона
4. Патогенез эссенциального тремора
5. Клинические проявления – тремор
6. Клинические проявления – двигательная функция
7. Биомеханические параметры циклических движений корпуса у пациентов с болезнью Паркинсона и с эссенциальным тремором
8. Заключение

Сокращения: БП – болезнь Паркинсона; КГ – контрольная группа испытуемых без известных неврологических нарушений; ЭТ – эссенциальный тремор.

Сокращения для обозначения двигательных заданий и биомеханических параметров (пояснения в тексте): sA – покачивание всем корпусом вперед-назад за счет сгибания-разгибания голеностопного сустава; sH – наклоны вперед и назад за счет сгибания-разгибания в тазобедренном суставе; fA – покачивания всем корпусом в стороны за счет подвижности голеностопного сустава; fH – наклоны в стороны за счет подвижности тазобедренного сустава вокруг сагиттальной оси; hA – вращение всего корпуса вокруг вертикальной оси тела за счет голеностопного сустава; hH – вращение тазового сегмента вокруг вертикальной оси при неподвижных плечах; A – объединенный голеностопный сустав; H – объединенный тазобедренный сустав; T – эквивалентный торсовый псевдосустав между плечевым и тазовым сегментами; A(sA) – амплитуда угла в голеностопном суставе при выполнении наклонов в сагиттальной плоскости за счет подвижности голеностопного сустава; H(sA) – амплитуда угла в тазобедренном суставе при выполнении наклонов в сагиттальной плоскости за счет подвижности голеностопного сустава; T(sA) – амплитуда угла в эквивалентном торсовом псевдосуставе при выполнении наклонов в сагиттальной плоскости за счет подвижности голеностопного сустава; A(sH) – амплитуда угла в голеностопном суставе при выполнении наклонов вперед и назад за счет сгибания-разгибания в тазобедренном суставе. H(sH) – амплитуда угла в тазобедренном суставе при выполнении наклонов в сагиттальной плоскости за счет сгибания-разгибания в тазобедренном суставе; T(sH) – амплитуда угла в эквивалентном торсовом псевдосуставе при выполнении наклонов в сагиттальной плоскости за счет сгибания-разгибания в тазобедренном суставе; A(fA) – амплитуда угла в голеностопном суставе при выполнении покачивания всем корпусом в стороны за счет подвижности голеностопного сустава; H(fA) – амплитуда угла в тазобедренном суставе при выполнении покачивания всем корпусом в стороны за счет подвижности голеностопного сустава; T(fA) – амплитуда угла в эквивалентном торсовом псевдосуставе при выполнении покачивания всем корпусом в стороны за счет подвижности голеностопного сустава; A(fH) – амплитуда угла в голеностопном суставе при выполнении наклонов в стороны за счет подвижности тазобедренного сустава вокруг сагиттальной оси; H(fH) – амплитуда угла в тазобедренном суставе при выполнении наклонов в стороны за счет подвижности тазобедренного сустава вокруг сагиттальной оси; T(fH) – амплитуда угла в эквивалентном торсовом псевдосуставе при выполнении наклонов в стороны за счет подвижности тазобедренного сустава вокруг сагиттальной оси; A(hA) – амплитуда угла в голеностопном суставе при выполнении вращения всего корпуса вокруг вертикальной оси тела за счет голеностопного сустава; H(hA) – амплитуда угла в тазобедренном суставе при выполнении вращения всего корпуса вокруг вертикальной оси тела за счет голеностопного сустава; T(hA) – амплитуда угла в эквивалентном торсовом псевдосуставе при выполнении вращения всего корпуса вокруг вертикальной оси тела за счет голеностопного сустава; A(hH) – амплитуда угла в голеностопном суставе при выполнении вращения

тазового сегмента вокруг вертикальной оси при неподвижных плечах; $H(hN)$ – амплитуда угла в тазобедренном суставе при выполнении вращения тазового сегмента вокруг вертикальной оси при неподвижных плечах; $T(hN)$ – амплитуда угла в эквивалентном торсовом псевдосуставе при выполнении вращения тазового сегмента вокруг вертикальной оси при неподвижных плечах.

1. Введение

Паркинсонизм – симптомокомплекс (синдром), характерный для группы заболеваний (см. Международная классификация – МКБ-10). Ведущими симптомами паркинсонизма является тремор, поздняя неустойчивость – мышечная ригидность. Среди причин, приводящих к синдрому паркинсонизма, нарушения, имеющие различную природу: токсическую, травматическую, сосудистую. Среди нарушений, сопровождающихся синдромом паркинсонизма, наиболее характерны нейродегенеративные изменения. Среди нейродегенеративных заболеваний выделяют болезнь Паркинсона (БП) и эссенциальный тремор (ЭТ) – два состояния, различные по своей природе, течению и прогнозу, но трудно различимые на начальной стадии. БП – это тяжелое инвалидизирующее заболевание с неблагоприятным прогнозом. Ко времени появления первых симптомов, заметных для больного и заставляющих его обратиться к врачу, потерянными оказываются около 70% нейронов черной субстанции (Lang, Obeso, 2004), что делает неэффективным любые нейропротекторные методики и оставляет в распоряжении врача только симптоматическое лечение. ЭТ, напротив, не сопровождается массивной гибелью нервных клеток (Louis, 2010). Течение этого заболевания требует иной стратегии, чем БП.

Эти различия в прогнозе и подходе к лечению обуславливают запрос на раннюю дифференциальную диагностику заболеваний. Данная работа посвящена обзору причин, по которым затруднена ранняя дифференциальная диагностика БП и эссенциального тремора, а также возможным путям решения этой проблемы.

2. Эпидемиология и этиология

Как БП, так и ЭТ достаточно широко представлены в популяции. В среднем БП встречается у 1% людей, достигших 60 лет (Wenning et al., 2005; Samii et al., 2004). Среди людей старше 85 лет доля больных с БП возрастает до 3–4% (Lau, Breteler, 2006; Wenning et al., 2005). ЭТ является наиболее распространенным экстрапирамидным нарушением, частота случаев ЭТ составляет по разным данным от 0,41 до 3,92% и даже до 40% (Rautakorpi et al., 1982; Deuschl, Lorenz, 2003). Случаи ЭТ также учащаются с возрастом и в популяции старше 60 лет превышают 5% (Louis et al., 1998; Dogu et al., 2003).

Влияние наследственного фактора прослеживается в обоих заболеваниях. Однако если пациенты с БП имеют родственников первой степени с тем же диагнозом в 15% случаев (Samii et al., 2004; Яхно, Штульман, 2001), то по данным разных исследований ЭТ является наследственным в от 25% (Louis et al., 2001) до 60% слу-

чаев (Busenbark et al., 1996). В возникновении БП определенную роль играет интоксикация. Была показана токсичность для черной субстанции ряда пестицидов, гербицидов и солей тяжелых металлов (Lau, Breteler, 2006). Значительная часть случаев обоих заболеваний sporadическая (Яхно, Штульман, 2001).

3. Патогенез болезни Паркинсона

Поражения мозга при БП хорошо изучены и локализованы в основном в черной субстанции. В черной субстанции происходит апоптоз дофаминпроизводящих клеток. В норме некоторое количество апоптозных телец также регистрируется (Tompkins et al., 1997). При этом главным маркером БП считается наличие телец Леви в черной субстанции. Тельца Леви – это патологические белковые образования внутри нервной клетки, состоящие из шарообразного ядра и нейрофибрилл, расходящихся от этого ядра радиально. В то же время, наличие в клетке телец Леви не означает, что клетка предрасположена к апоптозу более, чем клетка, не содержащая телец Леви (Tompkins, Hill, 1997). Недавние исследования позволяют предположить, что тельца Леви играют скорее нейропротекторную роль (Wakabayashi et al., 2007; Wakabayashi, 2008). Тельца Леви регистрируются также у пожилых людей без признаков БП, однако ассоциированы с теми или иными ограничениями двигательных возможностей (Byford et al., 2009). Есть данные, позволяющие предположить, что у части пациентов могут наблюдаться вторичные поражения дополнительной моторной области (SMA) (Jacobs, Horak, 2006; Курганская и др., 2010).

4. Патогенез эссенциального тремора

Локализация изменений в белом и сером веществе у пациентов с ЭТ – мозжечок, премоторная кора (Benito-León et al., 2009). При ЭТ необратимой массивной гибели нейронов в какой-либо структуре не наблюдается (Louis, 2010). Анатомические исследования позволяют предположить, что структурные изменения, наблюдаемые при ЭТ, неоднородны. Первую группу составляют образцы с изменениями в мозжечке в виде так называемых торпед – вздутый на аксонах или дендритах клеток Пуркинью. Эта группа составляет около 75% всех образцов. Роль торпед не ясна. Это могут быть как первичные поражения аксона, так и вторичные реакции на поражающий фактор, или даже попытка реорганизации клеточных органелл для регенерации (Louis et al., 2009). В любом случае, торпеды – это маркер дегенеративных изменений. При нормальных возрастных изменениях торпед не наблюдается. Часть клеток Пуркинью погибает и оставшиеся живые клетки иногда перемещаются в молекулярный слой. Еще один маркер – разросшиеся корзинчатые клетки. Вокруг аксонов клеток Пуркинью корзинчатые клетки образуют необычайно плотную сеть. Корзинчатые клетки – это тормозные интернейроны, они встречаются во многих отделах мозга. В мозжечке образуют пресинаптические контакты с параллельны-

ми волокнами – аксонами гранулярных клеток, а постсинаптические – с клетками Пуркинью. Вторая группа препаратов содержала тельца Леви в голубом пятне – locus coeruleus. Locus coeruleus обеспечивает физиологический ответ на стресс. Клетки locus coeruleus образуют синаптические контакты с клетками Пуркинью, что важно для правильного функционирования клеток Пуркинью и обеспечения их тормозного выхода и, возможно, для их выживания и нормального формирования.

5. Клинические проявления – тремор

Тремор является ведущим симптомом БП и ЭТ, что затрудняет их дифференциальную диагностику. Частотные диапазоны тремора при БП и ЭТ перекрываются. Для БП характерен тремор в частотном диапазоне от 3 до 7 Гц, а при ЭТ – от 4 до 12 Гц (Rubchinsky et al., 2007). Для БП характерен тремор в покое, реже – так называемый поздний тремор, возникающий при поддержании статической позы, или кинетический, возникающий при совершении движений (Яхно, Штульман, 2001). Дрожание головы или рук при ЭТ возникает при поддержании позы и при совершении движений. Оно особенно заметно при движениях, требующих точности (Rubchinsky et al., 2007). Тремор покоя при ЭТ наблюдается относительно редко, в особенно тяжелых случаях (Cohen et al., 2003).

Тремор может возникать за счет возбуждения нервной ткани, принадлежащей разным структурам центральной и периферической нервной системы. Тремор может быть механическим и возникать на резонансной частоте конечности, может зависеть от осцилляции некоторого центрального источника – специфической структуры мозга, а может отражать осцилляции распределенной сети, включающей несколько структур мозга.

Исследование физиологического тремора в группе нормальных испытуемых показало, что частота тремора 7,7 Гц в руке снижалась до 5,2 Гц при приложении к руке дополнительной нагрузки – отягощению (Raethjen et al., 2000). Такое изменение частоты тремора в ответ на отягощение указывает на резонансную природу компонента физиологического тремора, имеющего частоту около 7 Гц. На резонансный характер физиологического тремора на частоте, близкой к 7–8 Гц, указывает также наличие острого пика спектральной кривой механограммы (Lakie, 2012).

С другой стороны, при регистрации механограммы пальца были выявлены 3 частотные составляющие: 1–4, 6–11 и 15–30 Гц. Эти составляющие не меняли частоты при приложении нагрузки (Raethjen et al., 2000), следовательно их происхождение центральное (Raethjen et al., 2000).

У пациентов с БП были также выявлены как зависящая, так и не зависящая от дополнительной нагрузки компоненты тремора, причем в покое доминировал не зависящий от нагрузки центральный компонент, а в позднем треморе присутствовали оба компонента (Burne et al., 2004). Кортико-мышечная когерентность на частоте тремора 5 ± 12 Гц у пациентов с БП наблюдается в моторной коре. На фоне тонического мышечного усилия (поддержание позы) эта когерентность воз-

растала, а когерентность в бета-диапазоне – 15 ± 30 Гц, снижалась. Когерентность на частоте 15 ± 30 Гц повышалась при приеме дофамин-содержащих препаратов и при электростимуляции базальных ганглиев, при этом облегчалась брадикинезия и снижалась когерентность в диапазоне тремора (Salenius et al., 2002). Можно предположить, что источник тремора при БП – распределенный колебательный контур, включающий первичную моторную кору и базальные ганглии. Возможно, также растормаживается некий периферический контур.

В случае ЭТ есть указания на центральный источник тремора. Отягощение конечности, так же как и в случае физиологического тремора, изменяет параметры одного из компонентов тремора, оставляя другой неизменным (Blesić et al., 2011).

При ЭТ кортикомышечная когерентность на частоте тремора наблюдалась у пациентов, чья миограмма на частоте тремора превышала некоторый эмпирически найденный уровень (Raethjen et al., 2007). Когерентность возникала в центральной области, соответствующей контрлатеральной конечности, в которой регистрировался тремор, и в медиальной фронтальной области (Raethjen et al., 2007). Однако когерентность была нестабильна и прерывалась даже у тех испытуемых, у которых мощность миограммы на частоте тремора значительно превышала средний уровень. Задержка соответствовала времени проведения по быстрому кортико-спинальному пути. Авторы предположили, что осцилляции на частоте тремора возникают в нескольких кортико-подкорковых петлях и сменяют друг друга.

Фокальный осцилляторный потенциал в вентромедиальном (моторном) ядре таламуса регистрируется на частоте патологического тремора (4–7 Гц) (Kane et al., 2009). Вентромедиальные ядра таламуса соединяют мозжечок и базальные ганглии с моторной корой, получая аксоны из премоторной коры, а также через вентролатеральное ядро таламуса – из мозжечка. Высокочастотная стимуляция вентромедиального ядра уменьшает тремор (Kane et al., 2009). Таким образом, при ЭТ основным источником тремора, по-видимому, является вентромедиальное ядро таламуса, не получающее адекватного тормозного воздействия от мозжечка. Однако тремор, очевидно, возникает не от прямого нисходящего влияния таламуса, а через моторную кору или мозжечок.

6. Клинические проявления – двигательная функция

Как при БП, так и при ЭТ наблюдаются некоторые особенности двигательной функции. У пациентов с БП уже на начальном этапе БП можно обнаружить изменения в позном контроле в положении стоя (Курганская и др., 2010). На более поздних стадиях у пациентов с БП снижается способность к сохранению равновесия и возникает опасность падения (Grimbergen et al., 2004). Неудивительно поэтому, что много работ посвящено исследованию поддержания пациентами баланса в положении стоя (De Nunzio et al., 2007), сидя (Burg et al., 2006) и при ходьбе (Jacobs, Horak, 2006). В указанных работах в качестве показателя отклонения от положения равновесия регистрировался один выбранный кинематический пара-

метр, такой как отклонение центра давления (Burg et al., 2006), смещение головы в выбранном направлении (Debaere et al., 2003) или длина шага (Jacobs, Horak, 2006). Очевидно, что поддержание равновесия зависит от содружественной работы всех элементов кинематической цепи. В то же время, исследования, в которых дается полное кинематическое описание на уровне вклада отдельных суставов, малочисленны. В частности, в работе А.В. Александрова с соавторами (Alexandrov et al., 1998) регистрировались углы в голеностопном, коленном и тазобедренном суставах во время быстрого однократного наклона в сагиттальной плоскости на поздних стадиях БП. В этой работе было показано, что по сравнению с нормой у больных при сохранении общей кинематической структуры движения суставные углы несколько меньше, соотношение суставных углов более вариативно и не оптимально для поддержания равновесия, поскольку приводит к большему смещению центра тяжести в сагиттальном направлении, увеличивая риск падения, особенно при наклоне назад. Для пациентов с ЭТ поддержание равновесия не является проблемой, хотя экспериментальные исследования выявляют некоторые особенности в поддержании равновесия (Bove et al., 2006) и в управлении ходьбой, в частности – бывает затруднена ходьба, требующая выстроить ступни в линию, – так называемый тандемный шаг (Louis et al., 2010). Примечательно, что еще одно моторное нарушение при ЭТ – неспособность выработать условно-рефлекторное моргание в ответ на звуковой сигнал, за которым следует поток воздуха, направленный в лицо, успешно компенсируется при помощи электростимуляции таламуса. По-видимому, электростимуляция облегчает проводимость оливо-мозжечкового пути (Kronenbueger et al., 2008). В табл. 1 суммированы особенности БП и ЭТ.

Таблица 1

Особенности болезни Паркинсона и эссенциального тремора

Особенности БП и ЭТ	Болезнь Паркинсона (БП)	Эссенциальный тремор (ЭТ)
Распространенность в популяции	1% старше 60 лет, до 3% старше 85 лет	4,0–5,6% старше 40 лет, 6,3–9,0% старше 60 лет
Причины возникновения	Наследственность 15% Токсины (тяж. мет., пестициды) Спорадическое	Наследственность – до 60% Спорадическое
Частота тремора	3–7 Гц	4–12 Гц
Локализация тремора	Руки, ноги – одностороннее начало Голова, голосовые связки, язык.	Руки – всегда двухсторонний Голова
Характер тремора	В покое поздний кинетический	Поздний кинетический (приближение к цели)
Течение	Прогрессирующее течение. Тяжелая инвалидизация после 10–15 лет болезни	Прогрессирование медленное, симптомы обратимы (алкоголь, кофеин)
Моторные нарушения	Трудности поддержания позы, сохранения баланса (падение) трудности инициации движения	Тонкие изменения, регистрируемые лабораторными методами: затруднения tandem gait не вырабатывается условно-рефлекторное моргание

7. Биомеханические параметры циклических движений корпуса у пациентов с болезнью Паркинсона и эссенциальным тремором

Была предпринята попытка исследовать кинематические особенности трехмерных движений корпуса у пациентов на начальных стадиях БП и у больных с ЭТ (Kurgansky et al., 2014). В работе кроме движения в сагиттальной плоскости рассматривались движения во фронтальной и горизонтальной плоскостях. Кроме того, помимо голеностопного и тазобедренного сустава исследовалась подвижность грудного сегмента корпуса относительно тазового. Это потребовало создания трехмерной модели движений корпуса, учитывающей все степени свободы, имеющиеся в указанных суставах.

В исследовании приняли участие три группы испытуемых. Во-первых, группа пациентов с БП. Стадия БП оценивалась по шкале Хен-Яра (Hoehn, Yahr, 1967) в модификации О. Линдвала (Lindvall et al., 1989). Среди 36 пациентов 27 пациентов имели заболевание в стадии 1, 8 пациентов в стадии 2 и только один пациент в стадии 3. Во-вторых, 14 пациентов с ЭТ. Тремор оценивался с использованием шкалы Фана–Толоса–Мартина (Fahn et al., 1993). Средняя оценка тремора по группе составляла $7,38 \pm 0,83$. Наконец, в исследовании участвовали 23 практически здоровых испытуемых без известных неврологических и ортопедических отклонений, которых мы рассматривали как контрольную группу (КГ). Исследование проводилось в соответствии с Хельсинкской декларацией при информированном согласии испытуемого.

Экспериментальная установка включала в себя электромагнитную систему регистрации движений и управляющий компьютер. Система регистрации движений Flock of Birds («Ascension Technology Corporation», USA) позволяла измерять пространственное положение датчиков с точностью $\pm 0,5$ мм и их ориентацию с точностью $\pm 0,1$ град. Общая частота оцифровки показаний системы регистрации движения и стабиланализатора составляла 67 Гц. Четыре датчика движения были закреплены на бедрах, тазе и на грудном отделе спины испытуемого.

Каждому испытуемому предлагалось выполнить шесть двигательных задач в положении стоя. Исследованию движений в каждой из трех анатомических плоскостей – сагиттальной, фронтальной и горизонтальной – было посвящено по две задачи. В сагиттальной плоскости испытуемые выполняли покачивание всем корпусом вперед-назад за счет сгибания-разгибания голеностопного сустава (задача sA, s – сагиттальная плоскость, A – голеностопный сустав) и наклоны вперед и назад за счет сгибания-разгибания в тазобедренном суставе (задача sH, s – сагиттальная плоскость, H – тазобедренный сустав). Движения, совершаемые во фронтальной плоскости, включали покачивания всем корпусом в стороны за счет подвижности голеностопного сустава (для выполнения этого движения вес тела переносили попеременно с одной стопы на другую – задача fA, f – фронтальная плоскость, A – голеностопный сустав) и наклоны в стороны за счет подвижности тазобедренного сустава вокруг сагиттальной оси (задача fH, f – фронтальная плоскость, H – тазобедренный сустав). Наконец, в горизонтальной плоскости испытуемые выполняли

ли вращение всего корпуса вокруг вертикальной оси тела за счет голеностопного сустава (на самом деле происходило вращение всех сегментов тела в одну сторону вокруг вертикальной оси – задача hA , h – горизонтальная плоскость, A – голеностопный сустав) и вращение таза вокруг вертикальной оси при неподвижных плечах (задача hH , h – горизонтальная плоскость, H – тазовый сегмент).

Все испытуемые выполняли шесть предложенных задач в фиксированной последовательности: sA , sH , fA , fH , hA , hH . Каждое движение выполнялось циклически по 5 раз в комфортном темпе, выбранном самим испытуемым. Перед началом эксперимента испытуемому давали устную инструкцию, сопровождаемую показом движений. Испытуемого просили сложить руки на груди, не сгибать колени и не отрывать стопы от платформы. В перерывах между задачами испытуемому напоминали очередную задачу. Момент начала движения выбирался самим испытуемым. Типичный эксперимент продолжался приблизительно 20 мин.

Переход от первичных данных о положении и ориентации датчиков к описанию трехмерного движения корпуса в терминах суставных углов проводился по методу, предложенному в работе (Viryukova et al., 2000). Далее суставные углы в левом и правом голеностопном и тазобедренном суставах усреднялись. Таким образом, движение в каждом из трех суставов – объединенном голеностопном (A), объединенном тазобедренном (H) суставах и в эквивалентном торсовом псевдосуставе между плечевым и тазовым сегментами (T) – описывалось изменением трех углов: сгибанием относительно поперечной оси, сгибанием относительно сагиттальной оси и вращением вокруг вертикальной оси, всего девять обобщенных координат.

Для каждой двигательной задачи были выбраны характерные обобщенные координаты, в наибольшей степени отражавшие специфику данного движения. Так, для наклонов в сагиттальной плоскости анализировался угол поворота вокруг поперечной оси, перпендикулярной сагиттальной плоскости. Для наклонов во фронтальной плоскости был выбран угол вращения вокруг сагиттальной оси. Для вращения корпуса и тазового сегмента относительно вертикальной оси анализировались углы вращения в горизонтальной плоскости. Таким образом, выполнение каждой двигательной задачи характеризовалось тремя переменными – характерными углами в трех модельных суставах. В дальнейшем для обозначения каждого из выходных параметров будет использоваться комбинация из обозначения сустава, за которым в скобках следует обозначение двигательной задачи. Например, обозначение $A(sA)$ используется для обозначения амплитуды угла в голеностопном суставе (A) при выполнении наклонов в сагиттальной плоскости (s) при ведущем голеностопном суставе (sA).

Зависимости выбранных углов от времени имели форму, близкую к синусоидальной. В частотном представлении этому соответствовал изолированный узкий и хорошо различимый пик на частоте основной гармоники. Квазигармонический характер временных зависимостей позволил исследовать их с помощью частотно-фазового Фурье-анализа и получить интегральные характеристики выполнения каждой задачи: частоту, амплитуду и разность фаз для соседних суставов. Частота и амплитуда каждого движения соответствовали положению и величине максимума автоспектра для характерных углов в каждом из трех суставов (от 1 до 3). Для каждой

из задач частоты основной гармонике для всех суставов практически совпадали. В качестве частоты движения принималось среднее значение по трем углам. Разность фаз между движениями в k-ом и m-ом суставах вычислялась как фаза взаимного спектра для изменения характерных суставных углов на частоте основной гармонике.

Частота основной гармонике движений. Средние значения частот для каждой из двигательных задач представлены в табл. 2. Оказалось что частота основной гармонике значимо выше у пациентов, чем у испытуемых КГ, причем у пациентов с БП выше, чем у пациентов с ЭТ (см. табл. 2). На первый взгляд, это противоречит отмеченному в литературе наличию брадиканезии у пациентов с БП (Hoehn, Yahr, 1967). Так, у пациентов на поздних стадиях БП при сагиттальном наклоне (вперед или назад) амплитуда движений меньше, а время выполнения движений больше, чем у контрольных испытуемых (Alexandrov et al., 1998). На самом деле здесь нет противоречия. Во-первых, в настоящей работе фаза инициации движения не регистрировалась и ее длительность не учитывалась при оценке времени движения. Между тем, как показано в исследовании инициации ходьбы (Rosin et al., 2009), при БП именно фаза инициации, т.е. время от предъявления императивного сигнала до начала первого шага, оказывается длительнее, чем в норме, а время выполнения шага не отличается от нормы. Во-вторых, в настоящей работе все движения предлагалось выполнять в удобном темпе, в то время как различия в скорости движения у пациентов с БП и у здоровых испытуемых обычно наблюдаются тогда, когда движение предлагалось выполнить как можно быстрее (Alexandrov et al., 1998; Carbon et al., 2007; Rosin et al., 2009). Наконец, брадиканезия проявляется в первую очередь в медленной ходьбе, а частота шагов положительно коррелирует со скоростью перемещения только при условии неизменной длины шага, в то время как у пациентов с БП длина шага укорочена (Morris et al., 2005), частота шагов, напротив, увеличена (Morris et al., 1995).

Исследование походки у пациентов с ЭТ и у пациентов с мозжечковыми нарушениями показало, что как у пациентов с ЭТ, так и у мозжечковых больных су-

Таблица 2

Средние значения частот для двигательных задач

Группа		Двигательная задача					
		sA	sH	fA	fH	hA	hH
ГК	Среднее значение	0,2035	0,2012	0,2054	0,2325	0,2275	0,3263
	стандартная ошибка	± 0,01450	± 0,01404	± 0,01229	± 0,01550	± 0,01582	± 0,03775
БП	Среднее значение	0,2916	0,2517	0,2814	0,2757	0,3026	0,3623
	стандартная ошибка	± 0,01150	± 0,01411	± 0,01214	± 0,01646	± 0,01645	± 0,03608
ЭТ	Среднее значение	0,2893	0,2600	0,2665	0,2739	0,2646	0,3563
	стандартная ошибка	± 0,01398	± 0,01971	± 0,02323	± 0,01657	± 0,01841	± 0,03713

щественно пролонгирована фаза опоры, когда обе ноги соприкасаются с опорой, и укорочена фаза переноса, при сохранении общей длительности шага (Stolze et al., 2001). В то время как у мозжечковых больных этот эффект выражен и при обычной локомоции, и в тандемном шаге, у пациентов с ЭТ эффект становится заметен только в тандемном шаге. Увеличение частоты циклических наклонов у пациентов, показанное в настоящей работе, также соответствует более кратковременным единичным движениям, где торможение быстрее следует за ускорением. Однако сравнивать с ходьбой наклоны корпуса, выполняемые без отрыва стопы от опоры, можно только с известной осторожностью. Вопрос частоты выполнения произвольных движений у пациентов с БП и ЭТ требует отдельного исследования.

Амплитуды суставных углов. Линейный дискриминантный анализ. Рассматривая амплитуды суставных углов как вектор в многомерном пространстве, мы использовали линейный дискриминантный анализ, основанный на методе линейной регрессии (Hastie et al., 2001). Надежность классификации оценивалась при помощи коэффициента α Коэна (Kohavi, Provost, 1998), который вычисляется при помощи так называемой матрицы ошибок P , каждый элемент которой p_{ij} – это вероятность классификации события категории i как события категории j . Тогда

$$\alpha = (\sum_i p_{ij} p_i - \sum_i p_i q_i) / (1 - \sum_i p_i q_i),$$

где $q_i = \sum_j p_{ij} p_j$ – вероятность распознавания классификатором события категории i , p_j – вероятность появления события категории j .

При идеальном классификаторе матрица P должна быть диагональной, т.е. ненулевые элементы должны стоять только на главной диагонали. Тогда $\alpha = 1$. В случае совершенно случайной классификации α оказывается близкой к нулю.

Мы оценивали точность классификации как функцию числа параметров, включенных в дискриминантный анализ, причем для каждого числа параметров пере-

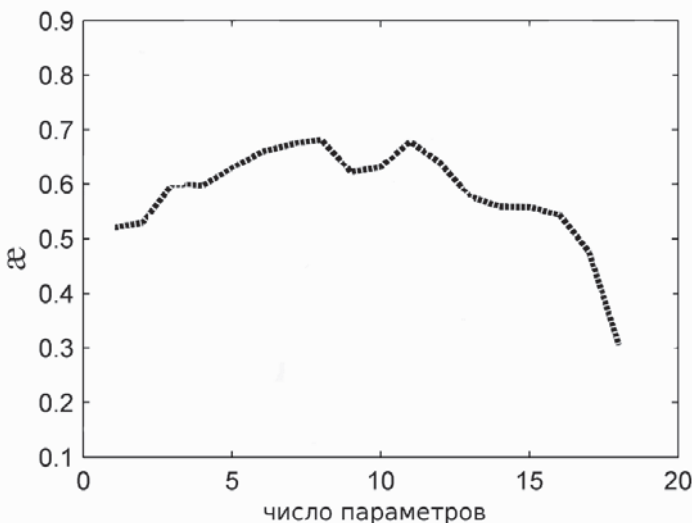


Рис. 1. Оптимальная классификация α в зависимости от числа параметров

бирались все сочетания амплитуд суставных углов и в качестве искомой точности классификации выбиралось максимальное значение α .

Каждый частный дискриминантный анализ для определенного набора исходных параметров проводился следующим образом: выборку разделяли на обучающую и тестирующую подвыборки в соотношении 0,7 и 0,3 от полной выборки, соответственно. В этом случае показатель α оценивался как среднее, полученное по 200 случайным комбинациям обучающей и тестирующей выборок. Комбинация параметров, соответствующая максимальному значению α , выбиралась в качестве оптимальной для данного числа параметров. На рис. 1 показана кривая оптимальной классификации α в зависимости от числа параметров. Из рисунка видно, что максимальное значение α , равное 0,68 достигается для 8 параметров. Классификация данных на 3 группы является двумерной задачей и выражается двумя скалярными дискриминантными функциями DF1 и DF2, состоящими из 8 наилучших классификаторов – амплитуд изменения суставных углов.

$$DF1 = -.05H(sA) -.09T(sH) -.04H(sH) +.28A(sH) +.016T(fA) +.03T(hA) +.02H(hH) +.13A(hH) -1.4$$

$$DF2 = -.23H(sA) +.01T(sH) +.02H(sH) -.1A(sH) +.23T(fA) +.02T(hA) +.004H(hH) -.02A(hH) -9$$

На рис. 2 показана скаттерграмма участников исследования в координатах дискриминантной функции. Каждый светлый квадрат соответствует испытуемому КГ, темный треугольник – пациенту с БП, а темный кружок – пациенту с ЭТ. Из рисунка видно, что участники демонстрируют тенденцию группироваться в соответствии со своим диагнозом. Пациенты с БП собираются в третьем квадранте ($DF1 < 0$ и

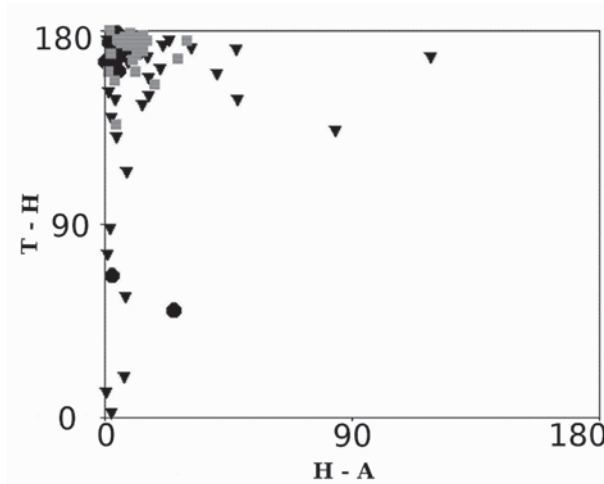


Рис. 2. Скеттерграмма участников исследования в координатах дискриминантной функции

Каждый светлый квадрат соответствует испытуемому КГ, темный треугольник – пациенту с БП, а темный кружок – пациенту с ЭТ

DF2<0), Здоровые испытуемые в основном попадают в четвертый квадрант (DF1>0 и DF2<0), а пациенты с ЭТ занимают в основном верхнюю полуплоскость (DF2>0). Таким образом, можно рассматривать значение DF1<0 как предиктор БП, а значения DF2>0 как предиктор ЭТ. В табл. 3 представлена матрица ошибок для исследуемой экспериментальной подгруппы. Видно, что для ГК и для БП число правильно предсказанных диагнозов существенно превышает ошибочно предсказанные диагнозы. Среди 14 пациентов с ЭТ 8, т.е. большая часть, также была классифицирована правильно. Однако для ЭТ это соотношение не столь надежно, к тому же у 16 испытуемых ЭТ предсказано ошибочно. Возможно, это связано с малым числом участников с ЭТ.

Таблица 3

Матрица ошибок для экспериментальной подгруппы

Истинный диагноз	Предсказанный диагноз		
	ГК	БП	ЭТ
ГК	18	1	7
БП	3	24	9
ЭТ	1	5	8

Рассмотрение структуры дискриминантной функции показывает, что в первом компоненте DF1 положительный коэффициент с максимальным абсолютным значением стоит при параметре A(sH). Это значит, что пациенты с БП совершают отклонения в голеностопном суставе в сагиттальной плоскости меньше, чем здоровые испытуемые. Коэффициент с наибольшим отрицательным весом стоит при T(sH) – амплитуда отклонения в торовом псевдосуставе в сагиттальной плоскости. Эта величина у пациентов с БП оказывается больше, чем у испытуемых КГ. Таким образом, как и в работе А.В. Александрова с соавторами (Alexandrov et al., 1998), в настоящей работе амплитуда изменений суставных углов в голеностопном суставе в сагиттальной плоскости оказалась ниже у больных с БП, чем у здоровых испытуемых. Кроме этих различий, согласующихся с результатами, полученными ранее, дискриминантный анализ позволил выявить новый эффект: амплитуда сгибания торового псевдосустава в сагиттальной плоскости оказалась больше у паркинсоников в том случае, когда инструкция требовала выполнять покачивания всем корпусом за счет голеностопного сустава, а не за счет тазобедренного или торового суставов. Вхождение этой амплитуды в оптимальную дискриминантную функцию с наибольшим положительным весом дает основание говорить о тенденции пациентов с БП сгибать торс вместо голеностопного сустава. Большая амплитуда сгибания в торсе, по-видимому, носит компенсаторный характер: при сниженной подвижности в тазобедренном и голеностопном суставах дополнительное сгибание торса помогает достичь соответствующего угла наклона головы к горизонту, субъективно воспринимаемого как наклон. Таким образом, мы имеем компенсацию недостаточной подвижности в тазобедренных и голеностопных суставах за счет подвижности торса, еще сохраняющейся на этой стадии заболевания. С прогрессированием заболевания такой способ компенсации становится недоступным для пациентов, так как ригидность мышц корпуса увеличивается и корпус начинает двигаться как жесткий сегмент (Burg et al., 2006).

Вторым по абсолютной величине положительным коэффициентом является коэффициент при $A(hN)$, т.е. при амплитуде угла аксиального вращения тазового сегмента ГТ. Средние значения данной амплитуды у пациентов с БП так же ниже, чем в КГ. При выполнении вращения таза при неподвижных плечах и стопах существенная часть пациентов с БП и два пациента с ЭТ не справлялись с координацией движения суставов. При вращении тазового сегмента голеностопный и тазобедренный суставы должны поворачиваться строго синфазно, или с разностью фаз 0° , а эффективный торсовый псевдосустав поворачивается в противофазе, что соответствует разности фаз в 180° . Таким образом, плечевой сегмент не смещается относительно стоп. Подобное соотношение фаз характерно также для многих пациентов с БП. Однако у значительной части пациентов с БП это соотношение не выдерживается. Как видно из рис. 2, разность фаз между тазобедренным суставом и эквивалентным торсовым псевдосуставом принимает все значения от 0 до 180° . Нулевая разность фаз соответствует синфазному вращению в тазобедренном суставе и торсовом псевдосуставе и не может обеспечить правильного выполнения движения, т.е. вращения тазового сегмента при неподвижных плечах. Нарушение координации движений таза и плеч в этом случае нельзя объяснить ригидностью, так как ригидность сама по себе привела бы, как и в случае вращения всего корпуса, к правильному выполнению задачи, но с меньшей амплитудой. Нарушение координации может быть результатом дефицита проприоцептивно-моторной интеграции, которая наблюдается при БП (Jacobs, Horak, 2006; Maschke et al., 2003; Vaugouyeau et al., 2007). Пытаясь скомпенсировать недостаток проприоцептивной чувствительности, пациенты используют зрительную обратную связь и успешнее выполняют задачи, в которых предьявляется видимая цель и возможно использование зрительно-моторной координации (Jacobs, Horak, 2006). Полученные в настоящей работе данные позволяют предположить, что пациенты могут компенсаторно привлекать зрительную обратную связь как при наклоне вперед, так и при скручивании, когда именно перемещение головы, а значит и видимой картинке, служило сигналом об успешном выполнении задачи. Нарушение координации происходит в тех случаях, когда зрительная обратная связь неэффективна и необходимо использовать именно проприоцептивный сигнал. Этим, по-видимому, объясняется наблюдаемое в настоящей работе нарушение координации движений плечевого и тазового сегментов во время вращения таза вокруг вертикальной оси при неподвижных плечах. Характер представленных дефектов аксиальных движений и тот факт, что дофаминсодержащие препараты их не компенсируют (исследование проводилось через час-полтора после приема препарата, т.е. в оптимальном состоянии), позволяет предположить, что нарушения функционирования дофаминергических систем в базальных ганглиях не являются непосредственной причиной нестабильности баланса и дефицита проприоцептивно-моторной интеграции при БП (Bejjani et al., 2000; Jacobs, Horak, 2006). Возможно, причиной этих нарушений являются вторичные поражения SMA (Jacobs, Horak, 2006; Курганская и др., 2010). Показано, что а) в норме эта область вовлекается в переработку проприоцептивной информации (Debaere et al., 2003), так как ее активность возрастает при выполнении движений под проприоцептивным контролем (Debaere et al., 2003); б) эта область получает

обильные связи из дофаминергических областей (Williams, Goldman-Rakic, 1993); в) при БП и при поражениях SMA наблюдаются сходные моторные нарушения, что проявляется в выполнении бимануальных двигательных последовательностей (Jones et al., 1992; Wu et al., 2010); г) ее активность усиливается приемом дофаминсодержащих препаратов у тех пациентов, у которых она снижена (Haslinger et al., 2001). Показано (Carbon et al., 2007), что с развитием БП в управление движениями вовлекаются области мозга, в норме отвечающие за другую, часто более сложную деятельность. Так, при снижении активности дополнительной моторной области управление движениями может компенсаторно переключаться на использование сохранной дорсолатеральной премоторной коры, которая, однако, требует внешних сенсорных сигналов, в частности зрительных (Jacobs, Horak, 2006)

Второй компонент дискриминантной функции DF2 демонстрирует более высокие значения для пациентов с ЭТ. Наибольший положительный коэффициент стоит при параметре T(fA) – амплитуде угла в торсовом псевдосуставе во фронтальной плоскости. Отклонение в сторону в торсе у пациентов с ЭТ больше, чем у пациентов с БП и КГ. Причем в задаче fA отклонения торса как раз не требовалось, так что речь идет скорее о неконтролируемых движениях. Поскольку, как уже отмечалось выше, у пациентов с ЭТ патологические изменения наблюдаются в мозжечке (Benito-León et al., 2009; Louis, 2010), мы относим это ухудшение контроля за счет мозжечкового дефицита и рассматриваем повышенную неконтролируемую подвижность торса как знак гиперметрии, поскольку клинические исследования показывают, что гиперметрия часто оказывается следствием поражения мозжечка (Ioffe, 2013).

Среди пациентов с ЭТ особо обращают на себя внимание два пациента, которые не смогли выполнить изолированное вращение тазового сегмента и скоординировать вращение сегментов в противофазе (см. рис. 2). Мы видим два предположительных объяснения этому наблюдению. Во-первых, мозжечковая дисфункция может препятствовать успешной координации движений во времени, в данном случае противофазной синхронизации (Иг, 2007). Известно, что мозжечок отвечает за тонкий временной мониторинг центральных сигналов, который может регулировать движение как одного (Flament, Hore, 1986), так и нескольких (Bracewell et al., 2005) суставов. Альтернативным объяснением трудностей с противофазной координацией у двух пациентов с ЭТ может быть дебют у этих пациентов БП, маскированный симптомами ЭТ. В исследовании (Geraghty et al., 1985) было показано, что лица с ЭТ имеют в 24 раза более высокую вероятность развития БП, чем в среднем по популяции.

8. Заключение

В настоящем исследовании показано, что для пациентов с БП в начальной стадии и пациентов с ЭТ характерны следующие особенности выполнения циклических движений корпуса в положении стоя: у пациентов с БП амплитуда углового смещения в голеностопном суставе в сагиттальной плоскости уменьшена по срав-

нению с нормой. Таким образом предотвращается большое смещение центра тяжести. У пациентов с ЭТ наблюдается увеличенная амплитуда отклонения торса во фронтальной плоскости, что особенно заметно при выполнении заданий, где движения в торсе не требовались. Как те, так и другие пациенты могут испытывать сложности с поддержанием потивофазной координации. Полученные результаты позволяют предположить что измененный паттерн циклических движений корпуса может быть связан со сниженными функциональными возможностями SMA у пациентов с БП в начальной стадии и с некоторой мозжечковой недостаточностью у пациентов с ЭТ.

Разделить контрольную группу и две группы пациентов удалось при помощи дискриминантного анализа, основанного на особенностях движения корпуса у пациентов. Циклические изменения суставных углов допускают применение анализа в частотной области. Оказалось, что интегральные параметры, выявляемые в частотной области, чувствительны к тонким изменениям двигательного паттерна, не заметным в единичном движении.

Тонкие изменения в двигательном паттерне, позволяющие отделить пациентов с болезнью Паркинсона и с ЭТ от здоровых испытуемых, выявленные в исследовании, можно зарегистрировать с помощью недорогой и неинвазивной процедуры, которая может быть включена в популяционный скрининг. Лиц, попавших в группу риска, по данным скрининга следует направлять на более подробное клиническое и радиологическое обследование для верификации диагноза. Такой подход может повысить шансы диагностики БП на раннем этапе.

Литература

- Курганская М.Е., Фролов А.А., Иоффе М.Е. и др. Кинематические особенности произвольных циклических движений корпуса на начальной стадии БП // ЖВНД. 2010. Vol. 60. P. 596-608.
- Международная классификация болезней 10-го пересмотра (МЛБ-10), класс 6 болезни нервной системы, g20-g26, экстрапирамидные и другие двигательные нарушения, g20, БП, g21. <http://www.mkb10.ru/?class=6&bloc=77>.
- Яхно Н.Н., Штульман Д.Р. Болезни нервной системы. М.: Медицина, 2001.
- Alexandrov A., Aurenty R., Massion J., Mesure S., Viallet F. Axial synergies in parkinsonian patients during voluntary trunk bending // Gait and Posture. 1998. Vol. 8. P. 124-135.
- Bejjani B., Gervais D., Arnulf I., Papadopoulos S. et L. Axial parkinsonian symptoms can be improved: the role of levodopa and bilateral subthalamic stimulation // J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry 2000. Vol. 68. P. 595-600.
- Benito-León J., Alvarez-Linera J., Hernández-Tamames J.A. et al. Brain structural changes in essential tremor: voxel-based morphometry at 3-tesla // J. Neurol. Sci. 2009. Vol. 287. P. 138-142.
- Biryukova E., Roby-Brami A., Frolov A., Mokhtari M. Kinematics of human arm reconstructed from spatial tracking system recordings // J. Biomechanics. 2000. Vol. 33. P. 985-995.
- Blesić S., Stratimirović D., Milošević S., Marić J., Kostić V., Ljubisavljević M. Scaling analysis of the effects of load on hand tremor movements in essential tremor // Physica A. 2011. Vol. 390. P. 1741-1746.
- Bove M., Marinelli L., Avanzino L., Marchese R., Abbruzzese G. Posturographic analysis of balance control in patients with essential tremor // Mov. Disord. 2006. Vol. 21. P. 192-198.
- Bracewell R.M., Balasubramaniam R., Wing A.M. Interlimb coordination deficits during cyclic movements in cerebellar hemiataxia // Neurology. 2005. Vol. 64. P. 751-752.

- Burg van der J., Wegenb *Å.E.E.H.*, Rietbergb *M.B.*, Kwakkelb *G.*, Dieena *J.* Postural control of the trunk during unstable sitting in parkinson's disease // *Parkinsonism and Related Disorders*. 2006. Vol. 12. P. 492-498.
- Burne *J.A.*, Blanche *T.*, Morris *J.J.* Muscle loading as a method to isolate the underlying tremor components in essential tremor and parkinson's disease // *Muscle Nerve*. 2004. Vol. 30. P. 347-355.
- Busenbark *K.*, Barnes *P.*, Lyons *K.*, Ince *D.*, Villagra *F.*, Koller *W.C.* Accuracy of reported family histories of essential tremor // *Neurology*. 1996. Vol. 47. P. 264-265.
- Byford *M.*, Brayne *C.*, McKeith *I.*, Chatfield *M.*, Ince *P.*, Matthews *F.* Lewy bodies and neuronal loss in sub-cortical areas and disability in non-demented older people: a population based neuropathological cohort study // *BMC Geriatr*. 2009. Vol. 9. P. 22.
- Carbon *M.*, Gilardi *M.F.*, Dhawan *V.*, Eidelberg *D.* Correlation of movement initiation and velocity in parkinson's disease: a longitudinal pet study // *Neuroimage*. 2007. Vol. 34. P. 361-370.
- Cohen *O.*, Pullman *S.*, Jurewicz *E.*, Wanter *D.*, Louis *E.D.* Rest tremor in patients with essential tremor: prevalence, clinical correlates, and electrophysiologic characteristics // *Arch. Neurol*. 2003. Vol. 60. P. 405-410.
- De Nunzio *A.M.*, Nardone *A.*, Schieppati *M.* The control of equilibrium in parkinson's disease patients: delayed adaptation of balancing strategy to shifts in sensory set during a dynamic task // *Brain Res. Bull*. 2007. Vol. 74. P. 258-270.
- Debaere *F.*, Wenderoth *N.*, Sunaert *S.*, Van Hecke *P.*, Swinnen *S.P.* Internal vs external generation of movements: differential neural pathways involved in bimanual coordination performed in the presence or absence of augmented visual feedback // *Neuroimage*. 2003. Vol. 19. P. 764-776.
- Deuschl *G.*, Lorenz *D.* Orphanet encyclopedia. December, 2003. <http://www.orpha.net/data/patho/GB/uk-essentialtremor.pdf> 2003.
- Dogu *O.*, Sevim *S.*, Camdeviren *H.*, Sasmaz *T. et al.* Prevalence of essential tremor: door-to-door neurologic exams in mersin province, turkey // *Neurology*. 2003. Vol. 61. P. 1804-1806.
- Fahn *S.*, Tolosa *E.*, Martin *C.* Clinical rating scale for tremor // *Parkinson's Disease and Movement Disorders*. Eds. J. Jankovic, E. Tolosa. 1993. P. 225-234.
- Flament *D.*, Hore *J.* Movement and electromyographic disorders associated with cerebellar dysmetria // *J. Neurophysiol*. 1986. Vol. 55. P. 1221-1233.
- Geraghty *J. J.*, Jankovic *J.*, Zetuský *W. J.* Association between essential tremor and parkinson's disease // *Ann. Neurol*. 1985. Vol. 17. P. 329-333.
- Grimbergen *Y.*, Munneke *M.*, Bloem *B.* Falls in parkinson's disease // *Currant Opinion in Neurology*. 2004. Vol. 17. P. 405-415.
- Haslinger *B.*, Erhard *P.*, Kämpfe *N.*, Boecker *H. et al.* Event-related functional magnetic resonance imaging in parkinson's disease before and after levodopa // *Brain*. 2001. Vol. 124. P. 558-570.
- Hastie *T.*, Tibshirani *R.*, Friedman *J.* Linear discriminant analysis in the elements of statistical learning: data mining, inference, and prediction. Berlin: Springer, 2001.
- Hoehn *M.*, Yahr *M.* Parkinsonism: onset, progression and mortality // *Neurology*. 1967. Vol. 17. P. 427-442.
- Ilg *W.*, Golla *H.*, Thier *P.*, Giese *M.A.* Specific influences of cerebellar dysfunctions on gait // *Brain*. 2007. Vol. 130. P. 786-798.
- Ioffe *M.E.* Cerebellar control of posture // *Handbook of the Cerebellum and Cerebellar Disorders*. Eds. M. Manto, D. Gruol, J. Schmähmann, N. Koibuchi, F. Rossi. NY: Springer, 2013. Vol. 2. № 53. P.1221-1240.
- Jacobs *J.*, Horak *F.* Abnormal proprioceptive-motor integration contributes to hypometric postural responses of subjects with parkinson's disease // *Neuroscience*. 2006. Vol. 141. P. 999-1009.
- Jones *D.*, Phillips *J. G.*, Bradshaw *J. L.*, Iansek *R.*, Bradshaw *J.* Impairment in bilateral alternating movements in parkinson's disease? // *J. Neurol. Neurosurgery, Psych*. 1992. Vol. 55. P. 503-506.
- Kane *A.*, Hutchison *W.D.*, Hodaie *M.*, Lozano *A.M.*, Dostrovsky *J.O.* Enhanced synchronization of thalamic theta band local field potentials in patients with essential tremor // *Exp. Neurol*. 2009. Vol. 217. P. 171-176.
- Kohavi *R.*, Provost *F.* Glossary of terms // *Machine Learning*. 1998. Vol. 30. P. 271.
- Kronenbuerger *M.*, Tronnier *V.M.*, Gerwig *M. et al.* Thalamic deep brain stimulation improves eyeblink conditioning deficits in essential tremor // *Exp. Neurol*. 2008. Vol. 211. P. 387-396.

- Kurgansky M., Frolov A., Ioffe M., Karabanov A., Chernikova L.* A comparative kinematic analysis of cyclical bending in patients with early stages of parkinson's disease and in patients with essential tremor // *Motor Control*. 2014. Vol. 18. P. 331-346.
- Lakie M., Vernooij C.A., Osborne T.M., Reynolds R.F.* The resonant component of human physiological hand tremor is altered by slow voluntary movements // *J. Physiol. (Lond.)* 2012. Vol. 590. P. 2471-2483.
- Lang A.E., Obeso J.A.* Challenges in parkinson's disease: restoration of the nigrostriatal dopamine system is not enough // *Lancet Neurol.* 2004. Vol. 3. P. 309-316.
- Lau L.M., Breteler M.M.* Epidemiology of parkinson's disease // *Lancet Neurol.* 2006. Vol. 5. № 6. P. 525-535.
- Lindvall O., Rehncrona S., Brundin P. et al.* Human fetal dopamine neurons grafted into the striatum in two patients with severe parkinson's disease. a detailed account of methodology and a 6-month follow-up // *Arch. Neurol.* 1989. Vol. 46. P. 615-631.
- Louis E. D.* Essential tremor: evolving clinicopathological concepts in an era of intensive post-mortem enquiry // *Lancet Neurol.* 2010. Vol. 9. P. 613-622.
- Louis E.D., Ottman R., Hauser W.A.* How common is the most common adult movement disorder? estimates of the prevalence of essential tremor throughout the world // *Mov. Disord.* 1998. Vol. 13. P. 5-10.
- Louis E. D., Ford B., Frucht S., Ottman R.* Mild tremor in relatives of patients with essential tremor: what does this tell us about the penetrance of the disease? // *Arch. Neurol.* 2001. Vol. 58. P. 1584-1589.
- Louis E. D., Yi H., Erickson-Davis C., Vonsattel J. G., Faust P. L.* Structural study of purkinje cell axonal torpedoes in essential tremor // *Neurosci. Lett.* 2009. Vol. 450. P. 287-291.
- Louis E.D., Rios E., Rao A.K.* Tandem gait performance in essential tremor: clinical correlates and association with midline tremors // *Mov. Disord.* 2010. Vol. 25. P. 1633-1638.
- Maschke M., Gomez C., Tuite P., Konczak J.* Dysfunction of the basal ganglia, but not the cerebellum, impairs kinaesthesia // *Brain.* 2003. Vol. 126. P. 2312-2322.
- Morris M.E., Ianseck R., Matyas T.A., Summers J.J.* Ability to modulate walking cadence remains intact in parkinson's disease // *J. Neurol. Neurosurgery, Psych.* 1995. Vol. 57. № 12. P. 1532-1534.
- Morris M., Ianseck R., McGinley J., Matyas T., Huxham F.* Three-dimensional gait biomechanics in Parkinson's disease: evidence for a centrally mediated amplitude regulation disorder // *Mov. Disord.* 2005. Vol. 20. P. 40-50.
- Raethjen J., Pawlas F., Lindemann M., Wenzelburger R., Deuschl G.* Determinants of physiologic tremor in a large normal population // *Clin. Neurophysiol.* 2000. Vol. 111. P. 1825-1837.
- Raethjen J., Govindan R.B., Kopper F., Muthuraman M., Deuschl G.* Cortical involvement in the generation of essential tremor // *J. Neurophysiol.* 2007. Vol. 97. P. 3219-3228.
- Rautakorpi I., Takala J., Marttila R., Sievers K., Rinne U.* Essential tremor in a finnish population. *acta neurologica scandinavica* rautakorpi i, takala j, marttila rj, sievers k, rinne uk. essential tremor in a finnish population // *Acta. Neurol. Scand.* 1982. Vol. 66. P. 58-67.
- Rosin R., Topka H., Dichgans J.* Gait initiation in parkinson's disease // *Movement Disorders.* 2009. Vol. 12. P. 682-690.
- Rubchinsky L.L., Kuznetsov A.S., Wheelock V.L., Sigvardt K.A.* Tremor // *Scholarpedia.* 2007. Vol. 2. № 10. P. 1379.
- Salenius S., Avikainen S., Kaakkola S., Hari R., Brown P.* Defective cortical drive to muscle in parkinson's disease and its improvement with levodopa // *Brain.* 2002. Vol. 125. P. 491-500.
- Samii A., Nutt J.G., Ransom B.R.* Parkinson's disease // *Lancet.* 2004. Vol. 363. P. 1783-1793.
- Stolze H., Petersen G., Raethjen J., Wenzelburger R., Deuschl G.* The gait disorder of advanced essential tremor // *Brain.* 2001. Vol. 124. P. 2278-2286.
- Tompkins M.M., Basgall E.J., Zamrini E., Hill W.D.* Apoptotic-like changes in lewy-body-associated disorders and normal aging in substantia nigral neurons // *Am. J. Pathol.* 1997. Vol. 150. P. 119-131.
- Vaugoyeau M., Viel S., Assaiante C., Amblard B., Azulay J.* Impaired vertical postural control and proprioceptive integration deficits in parkinson's disease // *Neuroscience.* 2007. Vol. 146. P. 852-863.
- Wakabayashi K.* Lewy body formation in parkinson's disease: neurodegeneration or neuroprotection // *Rinsho Shinkeigaku.* 2008. Vol. 48. P. 981-983.
- Wakabayashi K., Tanji K., Mori F., Takahashi H.* The lewy body in parkinson's disease: molecules implicated in the formation and degradation of alpha-synuclein aggregates // *Neuropathology.* 2007. Vol. 27. P. 494-506.

- Wenning G., Kiechl S., Seppi K., Müller J., Högl B., Saletu M., Rungger G., Gasperi A., Willeit J., Poewe W.* Prevalence of movement disorders in men and women aged 50-89 years (brunneck study cohort): a population-based study // *Lancet Neurol* 2005. Vol. 4. P. 815-820.
- Williams S.M., Goldman-Rakic P.S.* Characterization of the dopaminergic innervation of the primate frontal cortex using a dopamine-specific antibody // *Cereb. Cortex*. 1993. Vol. 3. P. 199-222.
- Wu T., Wang L., Hallett M., Li K., Chan P.* Neural correlates of bimanual anti-phase and in-phase movements in parkinson's disease // *Brain*. 2010. Vol. 133. P. 2394-2409.

Корреляты функционального состояния центральной (моторной) нервной системы в неинвазивной диагностике нейродегенеративных патологий

С.П. Романов, З.А. Алексанян

Среди нарушений движений, вызываемых дисфункцией регуляторных процессов в ЦНС, болезнь Паркинсона (БП) проявляется рядом специфических симптомов, часто выделяясь заметным тремором конечностей. Если в классическом виде БП, вызванная недостаточностью выработки дофамина в результате поражения дофаминергической системы и деградацией нейронов черной субстанции, относится к идиопатическому или первичному паркинсонизму, то внешне проявляемые аналогичные симптомы другой этиологии в результате дисфункции механизмов взаимодействия нейронов ЦНС характеризуют как симптоматический или вторичный паркинсонизм. Естественно, что правильно установленный диагноз будет определять как специфику выбираемых методов лечения, так и возможный благоприятный исход для пациента.

При БП как нейродегенеративном заболевании необходим поддерживающий постоянно контролируемый курс лечения. В случае вторичного паркинсонизма после выявления более подробного анамнеза необходим выбор адекватного курса лечения с ликвидацией последствий причины заболевания, а не только подавления проявляемой симптоматики.

Специфика проявления симптоматики паркинсонизма требует различных методов дифференциальной диагностики: от анализа произвольных (тремор) и особенностей выполнения произвольных движений в различных двигательных пробах до генетических и молекулярных исследований. Изучение принципов структурной организации и механизмов взаимодействия центральных областей системы управления движениями, обеспечивающих программирование, инициацию и текущую регуляцию движений, предусматривает раскрытие функциональной организации активности между структурами моторной системы (кора, таламус, базальные ганглии) в норме и при различных центральных двигательных патологиях. Понимание функционирования и взаимодействия нейронных структур многоуровневой системы управления движениями имеет фундаментальное значение для нейрофизиологии и представляет научный интерес в раскрытии общих принципов организации и механизмов работы мозга. Знание этих механизмов необходимо для фундаментальной медицинской науки, так как способствует пониманию причин возникновения патологических состояний и позволяет воссоздать картину структурно-функциональных изменений при поражениях ЦНС и в процессе восстановления утраченных двигательных функций под действием медикаментозной терапии.

Для дифференциальной диагностики пациентов с симптоматическим тремором мы впервые применили анализ изометрического напряжения мышц рук вместо

Сокращения: БП – болезнь Паркинсона; ГК – главные компоненты.

анализа тремора, обычно регистрируемого датчиками ускорения (акселерометрами) или движения (Романов и др., 1996, 1997). Это позволило нам анализировать амплитудно-частотные параметры произвольно удерживаемого изометрического усилия, а также частоту и амплитуду его произвольных колебаний, которые не искажены преобразованием силы сокращения мышц в ускорение, скорость и в периодическое смещение подвижных звеньев тела, характеризующее тремор. Мы получили возможность объективной экспресс-диагностики патологических состояний ЦНС, так как в параметрах изометрического усилия отражена структура нисходящей активности, направляющейся по пирамидному пути и экстрапирамидным трактам к мотонейронным пулам сегментарного уровня. Кроме того, процедура регистрации изометрического усилия не требует наложения и крепления каких-либо датчиков на теле пациента, а также вспомогательного квалифицированного медперсонала для работы с пациентом или здоровым обследуемым (Романов, Алексанян, 2009; Алексанян, Романов, 2009).

Проведенный ранее визуальный анализ записанных тензограмм изометрического усилия, удерживаемого с минимальной и максимальной силой (индивидуально в диапазоне 0–5 кг), позволил разделить неврологических пациентов (N=388, возраст $58,8 \pm 15,2$ лет) на 6 характерных групп, отличающихся от нормы (здоровые испытуемые) и между собой по амплитуде, форме и выраженной превалирующей частоте произвольных колебаний усилия (Романов и др., 1997). Статистический анализ временных рядов произвольно удерживаемого в течение 30 с усилия показал, что у этих пациентов различаются и реакции на удержание максимального усилия по отношению к параметрам, соответствующим удержанию минимального усилия. Эти параметры касаются изменения амплитуды и частоты колебаний произвольной компоненты изометрического усилия. На основании наблюдаемых различий из 6 выделенных групп 4 связали с треморной формой паркинсонизма, одну – с ригидно-треморной формой и одну – с ригидно-акинетической формой паркинсонизма. Различие параметров произвольных колебаний при регистрации минимального усилия и отличие в реакциях на удержание максимального усилия предполагают возможность поражения различных структур ЦНС, участвующих в формировании произвольного управления и произвольной (автоматической) регуляции движений (Romanov, Pchelin, 2001; Бедров и др., 2008).

Изучение особенностей удержания изометрического усилия пациентами с установленным клиническим диагнозом болезнь Паркинсона позволило выделить критерии дифференциальной диагностики БП от различных форм синдрома паркинсонизма, зачастую неясной этиологии (Дик и др., 2010а,б). Результаты тестирования пациента ПОА (диагноз болезнь Паркинсона), показывающие изменение функционального состояния моторной системы при подборе лекарственной терапии и во время контрольного тестирования через 2 года, приводим на рис. 1.

Представлены десятисекундные фрагменты произвольных колебаний изометрического усилия, удерживаемого пальцами выпрямленных вперед рук. В первом тесте пациенты слегка касаются датчиков силы (тензограммы А), а во втором (тензограммы Б) нажимают на датчики с максимальной силой, контролируя равенство произвольных усилий левой и правой руки по положению меток на экране

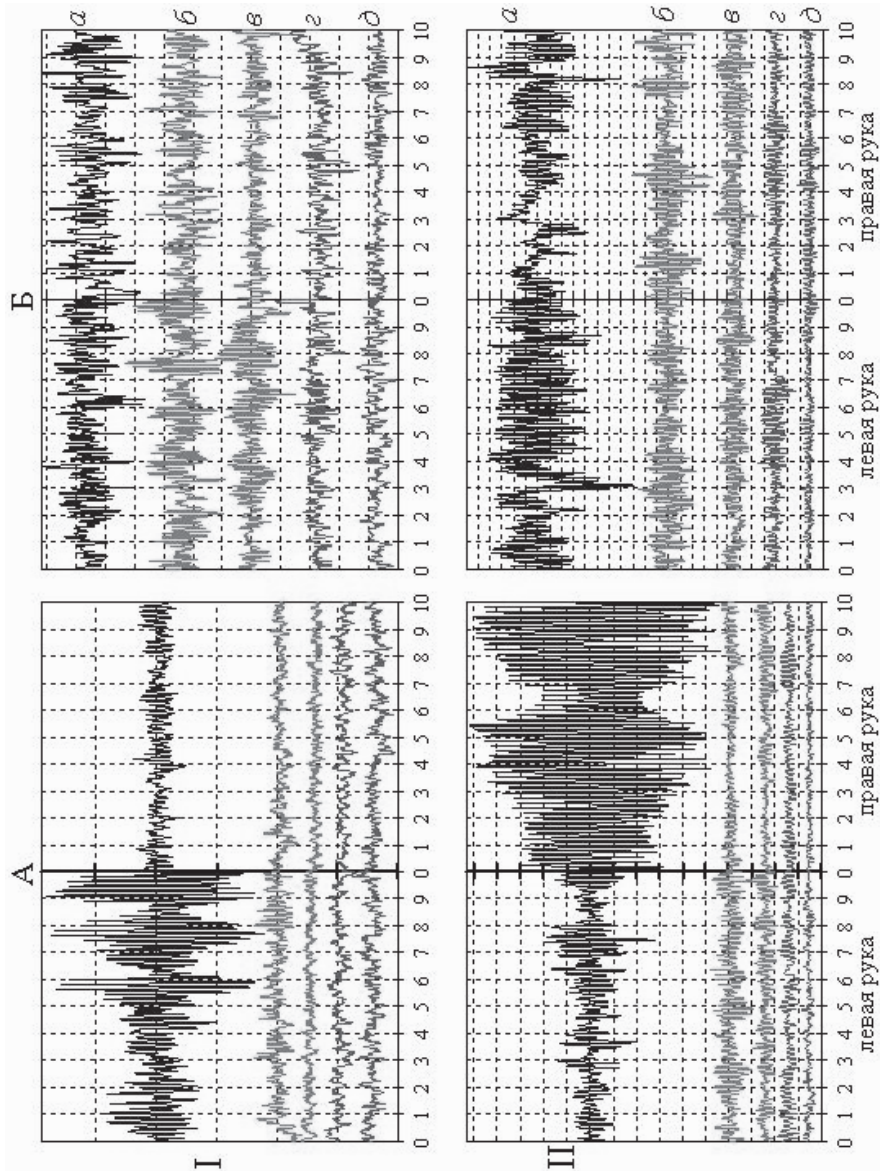


Рис. 1. Фрагменты тензограмм произвольных колебаний усилия БП-пациента ПОА53

А – максимальное произвольное усилие, Б – минимальное произвольное усилие. а – перед приемом L-допа содержащего препарата; б, в, г, д – тестирование в последующие моменты времени на фоне действия препарата. II – контроль терапии через 2 года после I. По горизонтали – время, с. По вертикали – деление шкалы 100 г.

монитора. В обоих тестах задача пациентов заключается в совмещении меток на экране монитора, что соответствует равенству усилий, удерживаемых правой и левой рукой. Характерным для БП является повышенная амплитуда произвольных колебаний в одной из рук при минимальном изометрическом усилии. При удержании максимального усилия амплитуды произвольной компоненты справа и слева выравниваются так, что амплитуда наибольших колебаний усилия уменьшается, а в другой руке увеличивается, как это и должно происходить при увеличении усилия. Этот эффект связываем с тем, что нисходящая произвольная активность по пирамидному тракту при максимальном усилии «шунтирует» активность в экстрапирамидных трактах, возможно, на мотонейронах сегментарного уровня. Здесь также следует заметить, что если у пациентов визуально наблюдаем в одной из рук больший тремор, обычно регистрируемый как движение датчиками ускорения, то при регистрации напряжения мышц в изометрическом режиме при минимальном усилии амплитуда произвольной компоненты в этой руке может оказаться меньше, чем в контралатеральной руке. Это подчеркивает объективность регистрации моторного выхода при изометрическом напряжении мышц, так как в этом случае не возникают резонансные явления, обусловленные ритмическими движениями инерционных масс звеньев конечности.

На рис. 1 верхний (а) ряд тензограмм соответствует условиям регистрации через 5 часов после принятия назначенного препарата, когда его действие на момент тестирования практически прекращается. Тензограммы б, в, г и д представляют результат последующих тестирований на фоне действия препарата при удержании таких же значений минимального (А) и максимального (Б) усилий. Эффективность терапии демонстрируется снижением амплитуды произвольных колебаний усилия в последовательных тестах после приема 1 таб. накома (тензограммы I б и в). Тестирование г проведено на фоне мадопара через 2 недели, а д – еще через неделю через 18 часов после сочетанного применения накома-0,5 и инстенона-30. Как видим, под объективным контролем возможен индивидуальный подбор щадящей поддерживающей терапии.

Однако БП прогрессирует, и это мы можем видеть при тестировании этого же пациента через 2 года в возрасте 55 лет (см. рис. 1, II, а). Амплитуда произвольных колебаний усилия в правой руке выросла и значительно больше, чем в левой руке, в которой амплитуда колебаний усилия осталась такой же, как и 2 года назад. При удержании максимального усилия амплитуды колебаний произвольной компоненты выравниваются в левой и правой руке, что является характерным для БП. После приема 1 таб. синемет (запись б) пациент субъективно не почувствовал облегчения и принял еще 1 таб. синемет, после чего были проведены еще 3 тестирования (II в, г и д). Однако уже через 20 минут после первого приема препарата запись б показала уменьшение амплитуд произвольной компоненты усилия в правой и левой руке.

Проведен статистический анализ данных параметров произвольно удерживаемого изометрического усилия и колебаний произвольной компоненты усилия в разные моменты (а, б, в, г, д) тестирования до и на фоне действия препарата. Учитывались следующие параметры: время регистрации после приема препарата,

содержащего L-допа, показатели изометрического усилия для левой и правой руки (минимальное усилие, усредненные значения стандартных отклонений произвольного усилия и произвольной компоненты, максимальное усилие, усредненные значения стандартных отклонений произвольного усилия и произвольной компоненты).

Для выявления особенностей управления изометрическим усилием мы провели оценку достоверности данных вычислением достоверности по критерию Стьюдента, используя парный Т-тест в электронной таблице Microsoft Excel 2000.

Наиболее информативными являются усредненные значения минимального произвольного усилия. Было установлено, что до приема препарата в начале курса лечения имелись существенные различия между левой и правой рукой ($p=0,009$). После двухлетнего курса лечения различия нивелируются ($p=0,991$). Этот параметр, возможно, является объективным показателем эффективности поддерживающей терапии. Т-тест не выявил существенных различий между левой и правой рукой для стандартных отклонений произвольного усилия и произвольной компоненты, вероятность сходства которых равнялась, соответственно, 0,543 и 0,103 до начала лечения и 0,376 и 0,210 через 2 года. Однако следует заметить, что значения стандартных отклонений этих параметров значительно увеличились за 2 года, особенно в правой руке.

Как мы отмечали выше, удержанию максимального произвольного усилия соответствует максимальное возбуждение структур моторной системы. Достоверных различий в анализируемых параметрах нет между левой и правой рукой. Положительным фактором в терапии БП является увеличение максимального произвольного усилия на 900 г через 2 года, которое подтверждается достоверностью различий до начала лечения и через 2 года на уровне $p=0,0008$ и $p=0,0003$ соответственно для левой и правой руки. Между стандартными отклонениями произвольного усилия и произвольной компоненты нет достоверных различий в этих исследованиях.

Исследование на здоровых испытуемых показало, что амплитуда произвольной компоненты в норме увеличивается по экспоненциальному закону, при увеличении силы – по линейному закону (Романов и др., 2007). Тест на максимальное усилие также способствует увеличению амплитуды колебаний произвольной компоненты изометрического усилия, характеризующей функциональное состояние моторной системы. Поэтому эффективность терапии можно оценивать еще по одному параметру, а именно отношению величины произвольно удерживаемого усилия к амплитуде (или стандартному отклонению) произвольной компоненты (рис. 2).

Графики показывают, что процесс восстановления управления двигательной функцией под действием препарата идет неравномерно и по-разному проявляется в левой и правой руке, а также при тестировании состояния ЦНС минимальной и максимальной силой. Если в начале лечения (сессия 1) действие препарата протекало одинаково в левом и правом полушариях, то через 2 года (сессия 2) в правой руке (левое полушарие мозга) наблюдаем отсутствие монотонности изменений по мере действия препарата в сравнении с левой рукой. Через 3 часа после приема препарата (справа на *d*) наблюдаем снижение коэффициента вследствие уменьше-

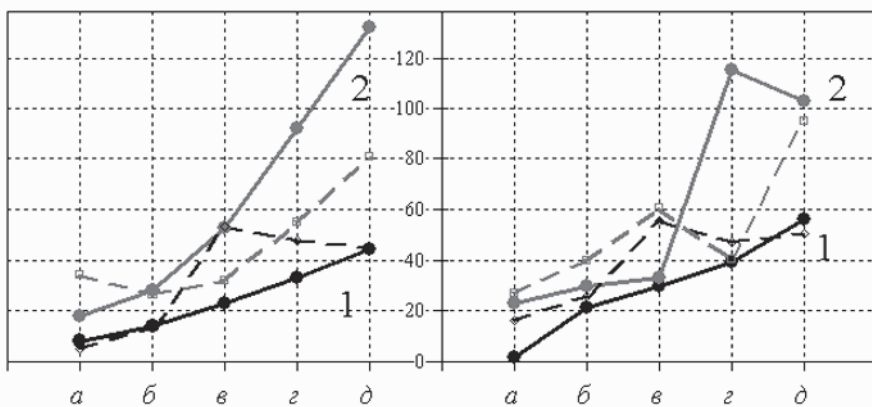


Рис. 2. Характеристики процесса восстановления активности моторной системы под влиянием терапии

1 и 2 – сессии тестирования (в начале лечения и через 2 года). Слева от центральной оси – левая рука; справа – правая рука. Штриховая линия – удержание минимального усилия, сплошная – удержание максимального изометрического усилия. По горизонтали: последовательные моменты тестирования. По вертикали: отношение произвольного изометрического усилия к стандартному отклонению произвольной компоненты

ния произвольного усилия и увеличения его стандартного отклонения, хотя амплитуда произвольного компонента продолжает снижаться.

Для более детального анализа изменений, происходящих в системе управления движениями, мы используем метод разложения временных рядов на главные компоненты (ГК) применительно к моторному выходу, в нашем случае – оцениваемому по величине изометрического усилия, регистрируемого в виде временного ряда в течение 30-секундного теста (рис. 3).

Каждая ГК представлена значениями ее относительного вклада в исходный временной ряд вдоль частотной оси. Первая (1) ГК имеет наибольшую амплитуду. Остальные ГК (2, 3 и т.д.) имеют (в норме) выраженные максимумы в диапазоне 1–10 Гц. Расположение этих максимумов связываем с циклической активностью, формируемой на разных уровнях организации моторной системы. Чем ниже частота, тем более высокий уровень участвует в формировании циклической активности, нисходящей к мотонейронам сегментарного уровня, активность которого характеризует первая (1) ГК. Считаем, что параметры ГК характеризуют активность на разных уровнях регуляции системы управления движениями, постулированных Н.А. Бернштейном. По определению, первым уровнем регуляции является сегментарный, многочисленными афферентными системами которого вовлечены в кольцевую (гомеостатическую) регуляцию активности мотонейронов, в частности, через проприоцептивные пути мышечных рецепторов и моторный выход (Романов, 2000). Вторую ГК связываем с нисходящей активностью пирамидного тракта, сформированного пирамидными нейронами моторной коры, которая вовлечена во второй контур регуляции активности мотонейронов. Остальные ГК, имеющие выраженные максимумы в диапазоне 1–10 Гц, связываем с отражением активности

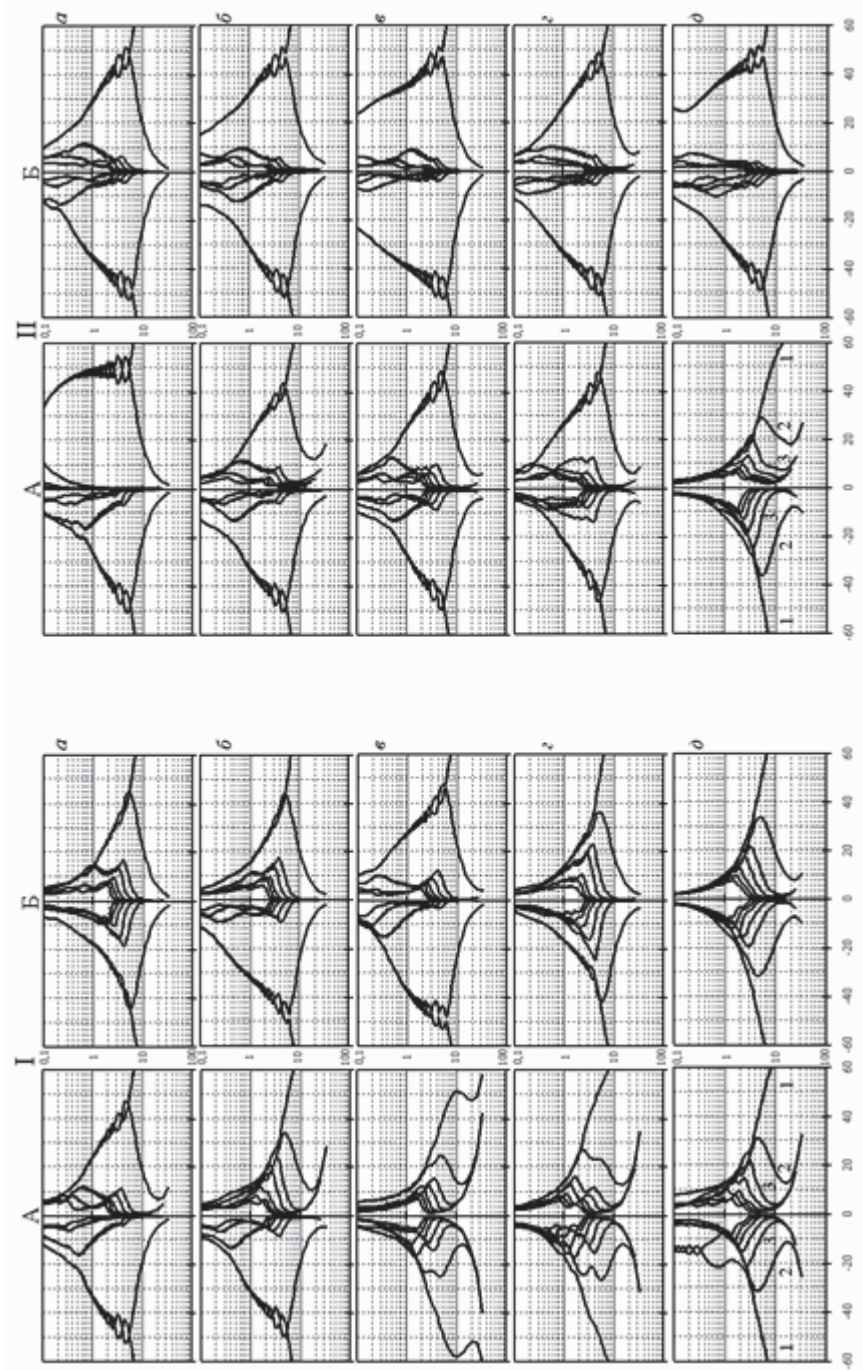


Рис. 3. Представление интегративной активности моторной системы в параметрах огибающих главных компонент разложения изометрического усилия как временного ряда
 I и II – соответственно сессии 1 (в начале курса лечения) и 2 (в процессе лечения через 2 года) тестирования пациента. А и Б – соответственно удержание минимального и максимального усилия. а, б, в, г и д – как на рис. 1 и 2. На каждой диаграмме представлены по семь (1, 2, 3 и т.д.) главных компонент разложения для левой (слева от центральной оси) и правой (справа от центральной оси) руки. По вертикали: частота, Гц (логарифмический масштаб). По горизонтали: вклад каждой компоненты, %

структур базальных ганглиев, таламуса и мозжечка, также вовлеченных в автоматическую кольцевую регуляцию мышечного сокращения. Важно, что количество этих ГК, вклад которых в исходный временной ряд более 3%, ограничено и не превышает 7–10. Если первые две ГК можем точно сопоставить с активностью первых двух контуров управления, то для верификации остальных, имеющих более низкую амплитуду максимумов, которые расположены на более низкой частоте, необходимы пациенты с уникальными поражениями ЦНС. Тем не менее, мы получаем дополнительные параметры для дифференциальной диагностики патологических состояний центральной (моторной) нервной системы.

По диаграммам мы можем оценить распределение активности в контурах моторной системы, выявить межполушарную асимметрию и проследить процесс восстановления активности к норме в случае эффективности терапии. Диаграммы d в сессии 1 (см. рис. 3) показывают близкое к норме распределение активности под действием терапии, особенно при удержании максимального усилия. Однако проведенное через 2 года тестирование этого же БП-пациента показало эффективность терапии, которая восстанавливает центральную активность в моторной системе, регистрируемую при минимальном усилии, но при максимальном усилии видим подавленность активности в структурах экстрапирамидной системы (оггибающие ГК 3, 4 и т.д.), возможно, вследствие деструктивных процессов.

Проблема поддержания функционального состояния моторной системы больных с диагнозом БП кроется не только в невозможности объективного контроля эффективного действия индивидуально подбираемых препаратов, но и в неоправданном назначении врачами и самостоятельном применении пациентами L-допа-терапии при синдроме паркинсонизма.

Приведем результат настойчивого лечения L-допа на протяжении нескольких лет пациента МВА с «установленным» диагнозом БП, пока очередной врач не усомнился в поставленном диагнозе, предположив, что у пациента МВА (58 лет), по всей вероятности, клинически достоверный лекарственный паркинсонизм. В этой связи врачу была необходима наша консультация и объективное обследование пациента по нашей методике, чтобы подтвердить или опровергнуть свое предположение, от результатов которого будет зависеть тактика по ведению и восстановлению этого пациента. Для объективной оценки функционального состояния ЦНС проведено тестирование пациента по нашей методике. Пациент был в ясном сознании, но скован и не мог передвигаться без посторонней помощи. Тремор конечностей визуально не обнаруживался. Перед обследованием попросили пациента «потерпеть» и не принимать назначенную терапию за сутки до тестирования. Каждый тест длился 30 с, чтобы получить временные ряды достаточной длительности для последующего анализа. Для определения функционального состояния моторной системы пациент удерживал минимальное и максимальное изометрическое усилие сначала только пальцами рук с опорой на тыльную сторону ладони – тестирование пирамидного пути, а затем пальцами выпрямленных вперед рук – тестирование преимущественно экстрапирамидной активности. Первая серия тестов проведена на фоне отмены препаратов. Затем пациент принял 0,5 таб. наком. Через 30 мин, почувствовав недомогание и дискомфорт, очевидно, от воздействия L-допа, пациент самостоятельно

принял 1 таб. клоназепам. Через некоторое время мы повторили тестирование еще два раза. Оценивались статистические параметры удерживаемого усилия (для левой и правой руки: минимальное и максимальное усилие, стандартные отклонения произвольного усилия и непроизвольной компоненты) и время, соответствующее формированию файла в компьютере при проведении каждого теста.

Тест с удержанием максимального усилия проводился через 1 мин после регистрации данных при удержании минимального усилия.

В отличие от БП-пациента стандартные отклонения непроизвольной компоненты изометрического усилия у обследуемого были меньше стандартного отклонения произвольного усилия и не уменьшались монотонно со временем по мере действия препарата. Автокорреляционные функции удерживаемого произвольного усилия имеют большой декремент затухания, а непроизвольной компоненты – быстро затухают, что также не соответствует этим показателям при БП. Фрагменты записей непроизвольной компоненты изометрического усилия, удерживаемого обследуемым только пальцами рук и выпрямленными вперед руками с минимальной и максимальной силой, приведены на рис. 4.

В пальцах правой руки в сравнении с пальцами левой руки регистрируются повышенные колебания непроизвольной компоненты изометрического усилия. При максимальном усилии амплитуда колебаний непроизвольной компоненты возрастает со временем, а еще через 20 мин при просьбе увеличить максимальное усилие появляются синхронные непроизвольные вспышки активности в правой и левой руке. При минимальном усилии на этот момент времени в правой руке исчезают непроизвольные колебания изометрического усилия. В выпрямленных руках амплитуда колебаний непроизвольной компоненты изометрического усилия существенно не отличается слева и справа и фактически не меняется со временем. Как и в норме, амплитуда этих колебаний увеличивается при увеличении усилия. Отношение стандартных отклонений удерживаемого произвольного изометрического усилия и непроизвольной компоненты также не соответствует этому параметру при БП. Проба на наком оказывается отрицательной.

Препарат практически не оказывает влияния на экстрапирамидную систему (удержание усилия выпрямленными руками). В пальцах рук (тестирование пирамидного пути) нет существенных изменений через час после приема препарата, а еще через 20 мин видим разнонаправленные изменения отношения при минимальном и максимальном усилиях. Все эти корреляты функционального состояния ЦНС отвергают диагноз БП у данного обследуемого.

Чтобы представить картину изменения активности внутри моторной системы у данного обследуемого, вычислили значения ГК непроизвольных колебаний изометрического усилия, которые представили огибающими относительно частоты разложения (рис. 5).

Диаграммы показывают явную асимметрию в распределении огибающих ГК. Выявляется большее поражение в пальцах правой руки, так как наибольший вклад в регистрируемый временной ряд здесь вносят первая и вторая ГК, форма огибающих которых характерна для периодических процессов, в нашем случае – отражающих вовлечение структур моторной системы в патологическую активность.

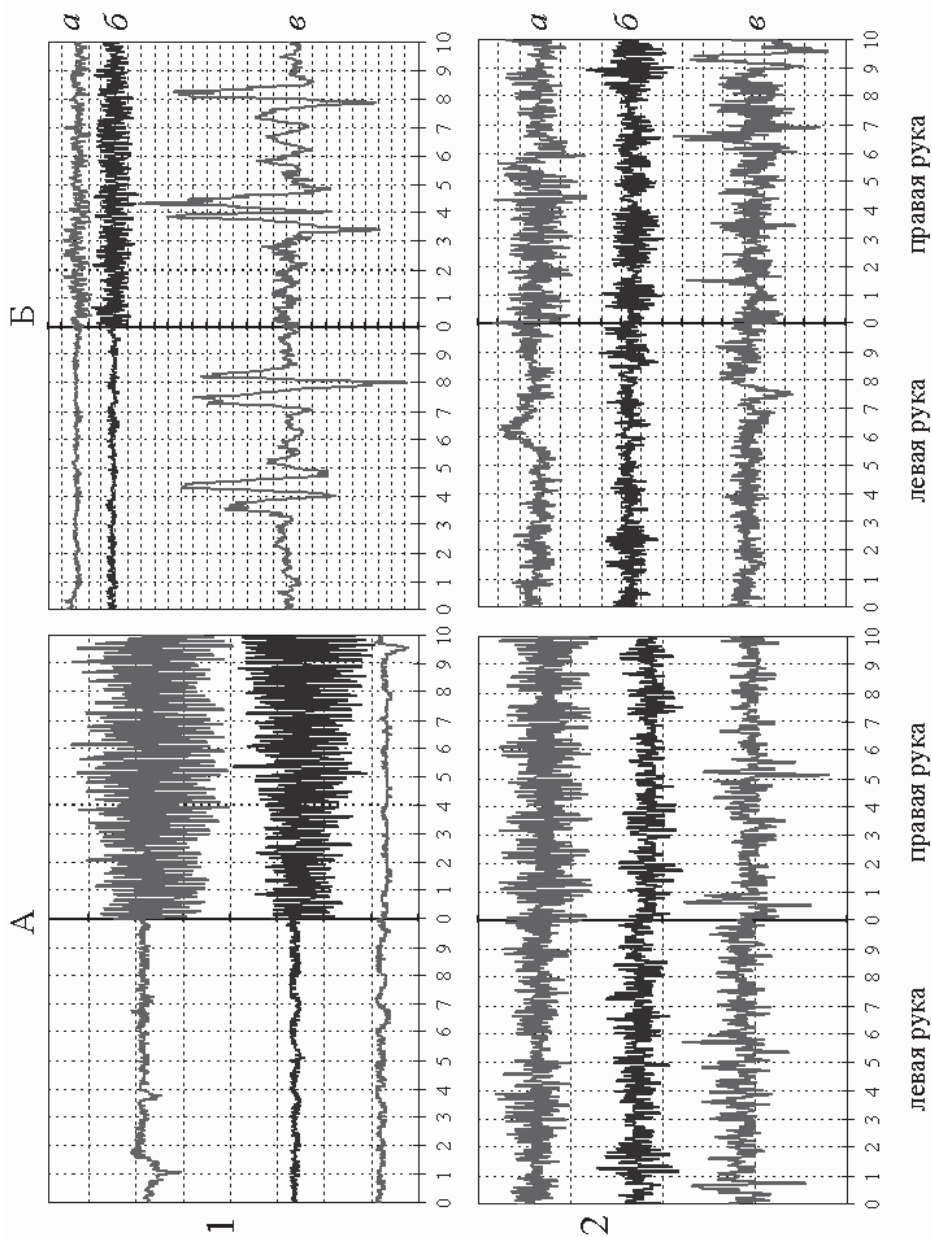


Рис. 4. Фрагменты произвольных колебаний изометрического усилия обследуемого МВА

А – максимальное усилие. Б – минимальное усилие. 1 – удержание усилия пальцами с опорой на тыльную сторону ладони. 2 – удержание усилия пальцами выпрямленных вперед рук. а – фон, б и в – на фоне L-допа-терапии. По вертикали: деление шкалы 50 г. По горизонтали: время, с

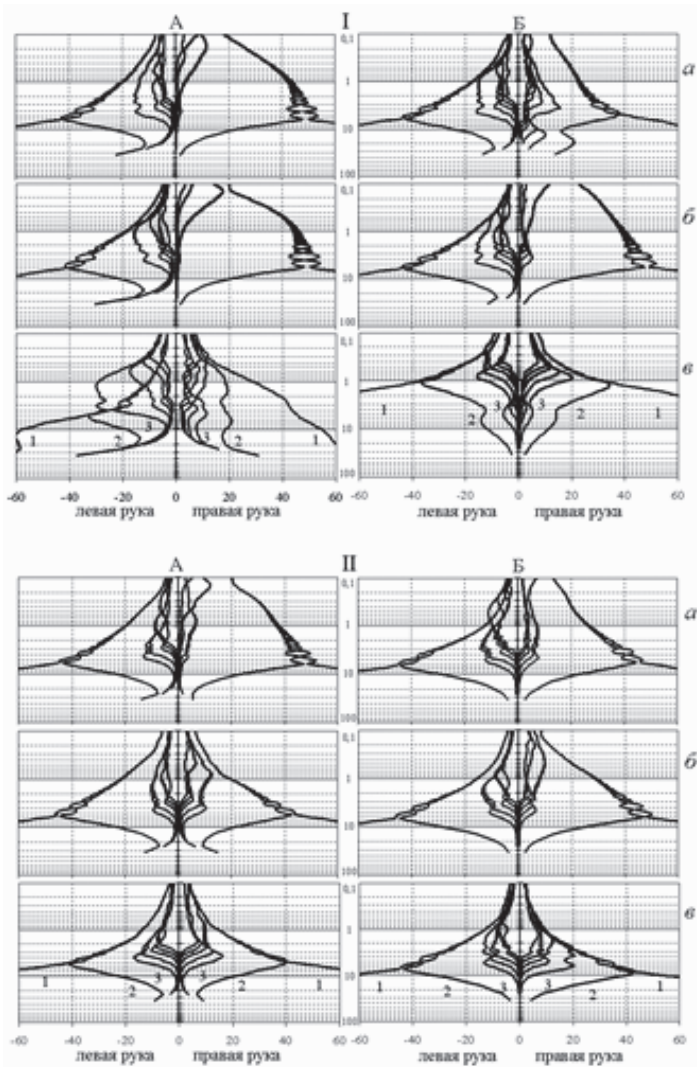


Рис. 5. Разложение временного ряда произвольных колебаний изометрического усилия на главные компоненты (обследуемый Мв)

I – пальцы. II – руки. А – минимальное усилие. Б – максимальное усилие. а, б, в – последовательные моменты тестирования. На диаграммах: 1, 2, 3 и т.д. – огибающие главных компонент. По вертикали: частота, Гц (логарифмический масштаб). По горизонтали: вклад, %

Действующий препарат не является эффективным, так как не изменяет существенно паттерны распределения огибающих ГК. Еще через 20 мин при удержании минимального усилия видим «хаотическое» представление огибающих ГК, отражающих «сумбур» в нисходящей по пирамидному пути активности к мотонейронным пулам. Удержание максимального усилия требует максимальной активности всех структур моторной системы. При этом восстанавливается симметричность в распределении ГК слева и справа, хотя в левой руке первая и вторая ГК, а также

третья и четвертая ГК характеризуют существующую патологическую активность с вовлечением пар соответствующих структур. Как мы отмечали выше, первая и вторая ГК характеризуют соответственно активность сегментарного уровня и в пирамидном пути. Верификация связи остальных ГК со структурами моторной системы требует дальнейшего изучения. Ясно, что искажение формы огибающих ГК, являющихся коррелятами функционального состояния ЦНС, отражает структурные перестройки или функциональные патологические состояния в нервной системе.

Тестирование экстрапирамидной системы при удержании усилия выпрямленными вперед руками показывает менее выраженную асимметрию в распределении активности справа и слева, а вовлеченные в периодические колебания огибающие первой и второй ГК с уменьшенным вкладом остальных ГК демонстрируют наличие патологического процесса в системе управления движениями, предположительно поражение пирамидной системы.

Так как мы оперируем новыми представлениями в анализе активности центральной (моторной) нервной системы, очевидно, пора привести распределение огибающих ГК у здоровых испытуемых, которое принимается за норму и к которому необходимо стремиться при работе с пациентами. Так как у пациентов в основном исследуем удержание минимального и максимального усилия, необходимо было знать поведение огибающих при промежуточных усилиях. Приведем пример анализа по методу «SSA-Гусеница» (GistaT Group, 2012) временных рядов произвольной компоненты произвольно удерживаемого изометрического усилия. Чтобы оценить изменения в паттернах огибающих ГК при различных удерживаемых изометрических усилиях, провели исследование усилия, градуально увеличивающегося в последовательных тестах. Испытуемый РИВ (60 лет) без явных неврологических нарушений в системе управления движениями удерживал усилие пальцами выпрямленных рук. Каждый тест длился 30 секунд. Частота квантования данных была выбрана 400 Гц для расширения диапазона анализа временного ряда до 12 000 точек с целью повышения точности определения превалирующей частоты циклической активности в максимумах огибающих каждой из ГК.

Паттерны огибающих ГК, характеризующих моторный выход или интегративную деятельность ЦНС, представлены на рис. 6.

Удержание изометрического усилия вовлекает в активность все структуры многоуровневой моторной системы, возбуждение в которых пропорционально прикладываемой к жесткой поверхности силы. Стационарный режим удержания усилия вызывает в контурах управления ЦНС циклическую активность, свойства которой определены «длиной» контура, скоростью проведения возбуждения в проводящих трактах и процессами преобразования сигналов в нейронных структурах (ансамблях или сетях нейронов) мозга. Самым коротким контуром с выходом на мотонейроны можем считать сегментарный, представляющий механизм гомеостатической (многопараметрической) регуляции мышечного сокращения (Романов, 1989). Первые 7 ГК имеют выраженные максимумы, которые в последовательности ГК смещаются к более низким частотам в диапазоне 10–1 Гц и уменьшаются по амплитуде. Считаем, что первая ГК характеризует активность сегментарного уровня. Огибающая этой ГК охватывает широкий диапазон частот. По мере увеличения

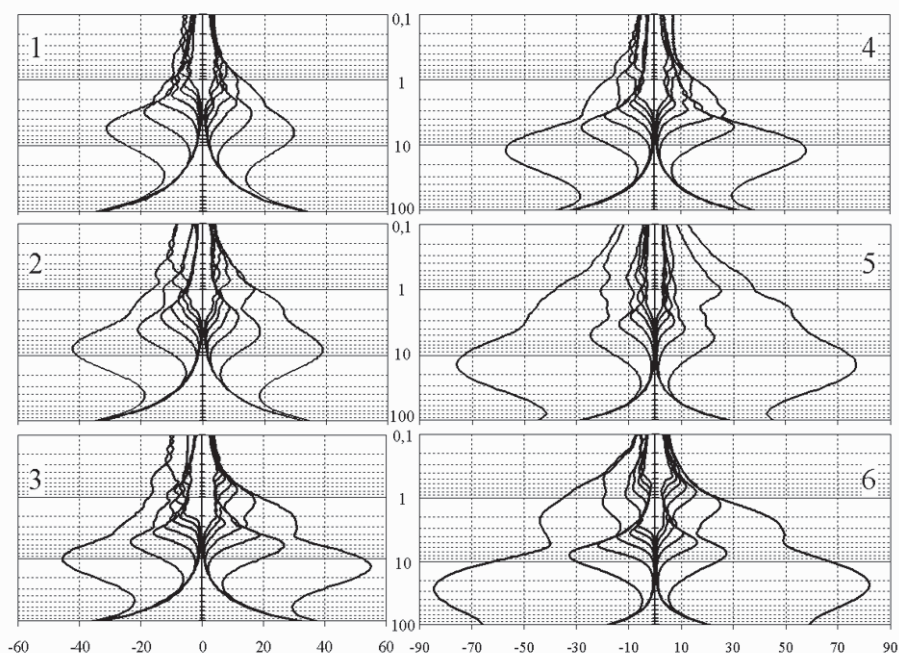


Рис. 6. Изменение паттернов огибающих главных компонент разложения временных рядов непроизвольной компоненты изометрического усилия, удерживаемого здоровым испытуемым

1–6 – диаграммы интегральной активности ЦНС (анализ моторного выхода) при увеличении произвольного усилия, удерживаемого одновременно правой и левой рукой. По вертикали: частота, Гц (логарифмический масштаб). По горизонтали: вклад, %

удерживаемого усилия, т.е. увеличения нисходящей к мотонейронным пулам активности, выраженные максимумы смещаются от 5,6 Гц слева и 6,4 Гц справа при минимальном усилии до 26,7 Гц слева и 23,53 Гц справа при максимальном усилии (у данного испытуемого) при соответствующем увеличении значения максимума от 31,2% слева и 29,55% справа до 84,5% слева и 82,01% справа как вклада в исходные временные ряды. Вторую ГК относим ко второму контуру регулирования моторного выхода, образованному моторной корой, пирамидным трактом, мотонейронами сегментарного уровня, моторным выходом как мышечным сокращением и проприоцепторным аппаратом мышц, замыкающим кольцо на моторную кору по восходящим афферентным путям. Максимумы второй ГК смещаются от 3,077 Гц слева и 3,2 Гц справа при минимальном усилии до 7,84 Гц слева и 7,27 Гц справа при максимальном усилии при соответствующем увеличении значений максимумов от 18,96% слева и 15,86% справа до 32,82% слева и 27,39% справа. В норме эти две ГК имеют наибольший сдвиг максимумов по частоте и линейный прирост их вклада с увеличением прикладываемой силы. Остальные из семи ГК, имеющих выраженные максимумы в области 1–10 Гц, относим к активности подкорковых структур, имеющих более длинные петли регуляции мышечного со-

кращения. Третью ГК характеризуют максимумы с вкладом 14,24% и 11,00% на частотах 2,14 Гц и 2,25 Гц соответственно для левой и правой руки при минимальном усилии, которые сдвигаются к частотам 5,48 Гц и 5,00 Гц и соответственно максимальным вкладам 21,6% и 5,96% для левой и правой руки при максимальном усилии. С увеличением усилия вклад этих компонент при малых усилиях возрастает, а затем уменьшается вследствие увеличения вклада первых двух ГК в исходный временной ряд. При патологии ЦНС вследствие структурных или функциональных нарушений эта идилическая картина активности в моторной системе нарушается и проявляется в различного рода дисфункциях выполнения движений.

Здесь самое подходящее время рассмотреть для сопоставления результаты первичного обследования (на фоне отмены терапии) данные БП-пациента и обследуемого с подозрением на лекарственный паркинсонизм (рис. 7, 8).

Для выявления различий между рассмотренными выше пациентами представлены фрагменты регистрации произвольной компоненты изометрического усилия в сопоставимом масштабе, а также результаты Фурье анализа регистрируемых нами временных рядов, т.е. произвольной компоненты изометрического усилия, которые могут быть сравнимы желаемыми с их данными регистрации тремора у пациентов с синдромом паркинсонизма. Пациент с диагнозом БП в сессии 1 удерживал минимальное ($0,360 \pm 0,147$ кг) и максимальное ($2,372 \pm 0,182$ кг) усилие пальцами левой руки и соответственно $0,265 \pm 0,060$ кг и $2,459 \pm 0,119$ кг пальцами правой руки. Стандартное отклонение произвольной компоненты соответственно составляло 0,082 и 0,063 для левой руки и 0,026 и 0,044 для правой руки, подтверждая тезис о подавлении при БП на мотонейронах сегментарного уровня произвольной активностью нисходящей по экстрапирамидным трактам патологической активности. Через 2 года (в сессии 2) этот же пациент показал следующие результаты: минимальное усилие удерживалось на уровне $0,234 \pm 0,043$ кг пальцами левой руки и $0,277 \pm 0,022$ кг пальцами правой руки, а максимальное усилие оказалось меньше и составляло соответственно $1,639 \pm 0,130$ кг и $1,773 \pm 0,131$ кг для пальцев левой и правой руки. Возможно, это связано с уменьшением произвольной активности, нисходящей к мотонейронным пулам сегментарного уровня по пирамидному пути. К тому же, стандартное отклонение произвольной компоненты увеличилось при увеличении усилия и составило соответственно 0,045 и 0,103 для левой руки и 0,013 и 0,042 для правой.

Обследуемый 3 в сессии 1 удерживал минимальное ($0,292 \pm 0,017$ кг) и максимальное ($1,431 \pm 0,056$ кг) усилие пальцами левой руки и соответственно $0,280 \pm 0,041$ кг и $1,438 \pm 0,044$ кг пальцами правой руки. Стандартное отклонение произвольной компоненты соответственно составляло 0,005 и 0,008 для левой руки и 0,043 и 0,017 для правой руки.

Видно, что произвольная компонента удерживаемого усилия обследуемого 3 отличается по форме и амплитуде колебаний от пациента с диагнозом БП. У БП-пациента в сессии 2 через два года после первого обследования изменяется реакция в пальцах левой руки на увеличение усилия, т.е. амплитуда произвольной компоненты также увеличивается, но становится значительно больше, чем в сессии 1, хотя удерживаемое усилие на треть меньше. Результаты Фурье-анализа непро-

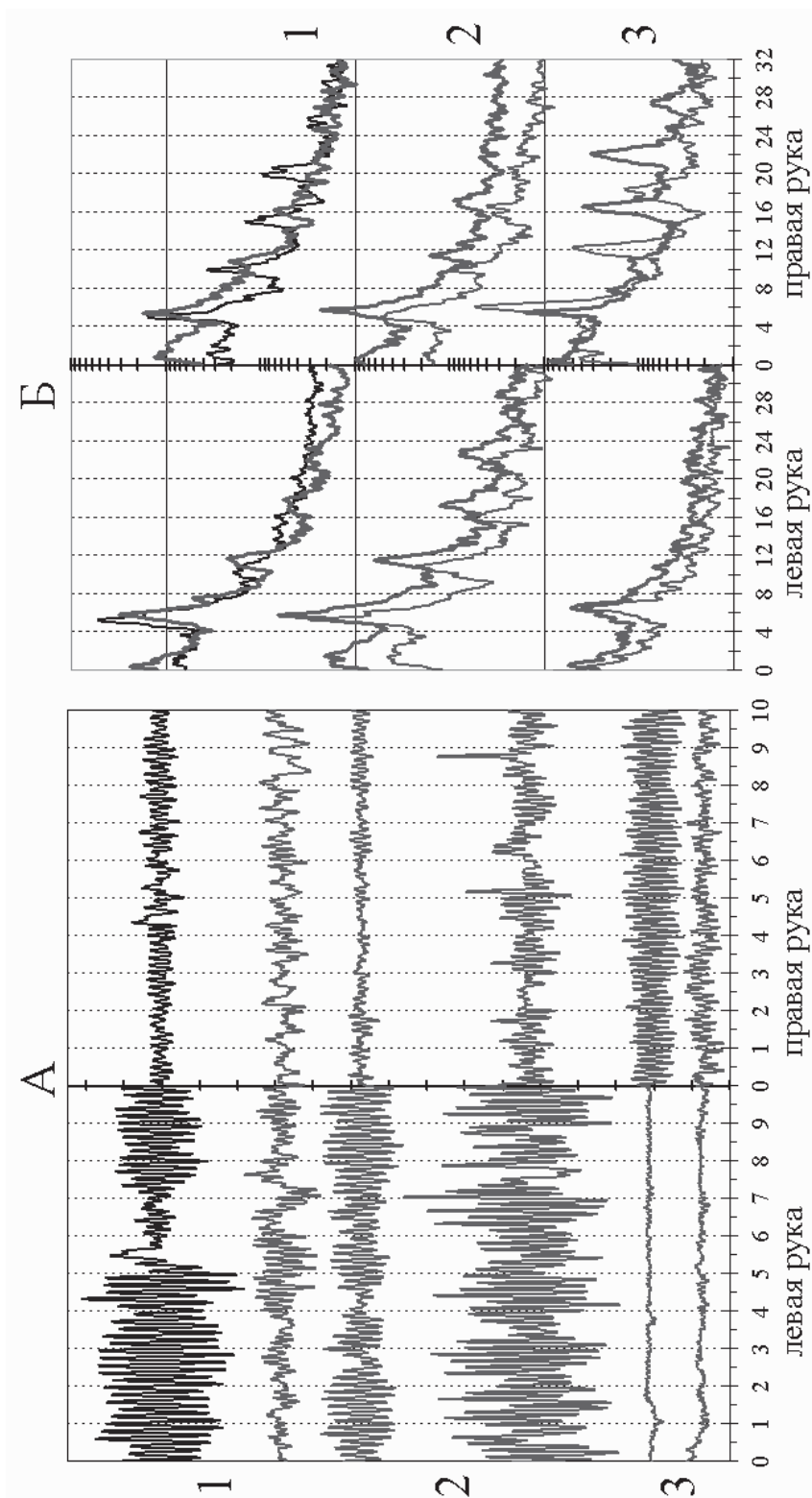


Рис. 7. Фрагменты произвольной компоненты удерживаемого только пальцами изометрического усилия (А) и соответствующие им спектры плотности Фурье (Б)

1 – БП-пациент. 2 – он же через 2 года поддерживающей терапии. 3 – обследуемый с подозрением на лекарственный паркинсонизм. Каждая пара кривых соответствует удержанию минимального и максимального (красные линии) усилия. На А – по вертикали: деление шкалы 100 г; по горизонтали: время, секунды. На Б – по вертикали: спектральная плотность, логарифмическая шкала; по горизонтали: частота, Гц

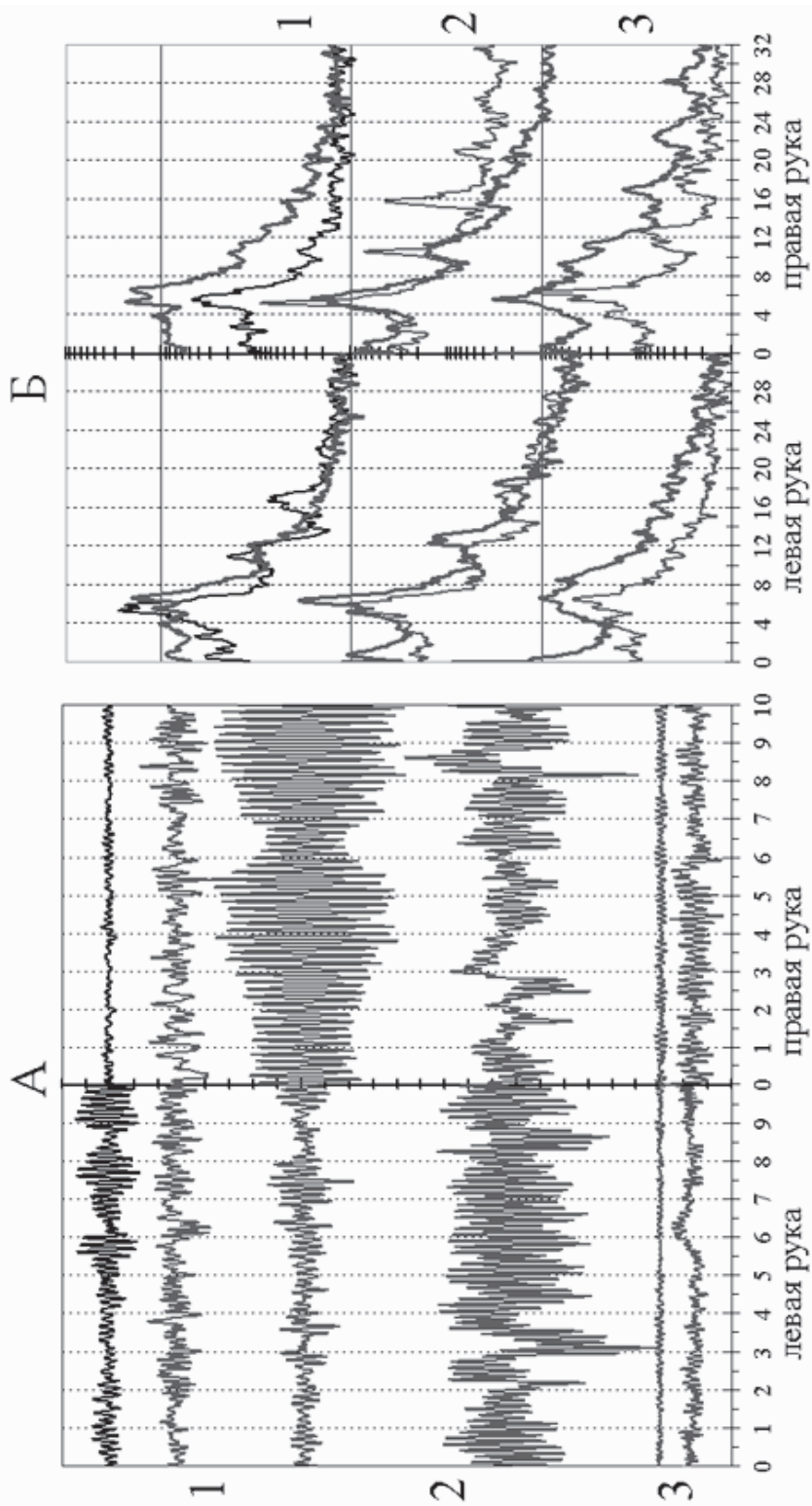


Рис. 8. Фрагменты произвольной компоненты изометрического усилия (А), удерживаемого выпрямленными руками, и соответствующие им спектры плотности Фурье (Б)
 Расположение и обозначения как на рис. 7

извольной компоненты усилия БП-пациента показывают его более удовлетворительное состояние в сессии 2 по заметному увеличению амплитуд спектральной плотности как реакции на удержание максимального усилия. Такого увеличения амплитуд спектральной плотности при удержании максимального усилия не наблюдали в сессии 1.

Существенными в диагностике и прогнозе терапии являются абсолютные значения и сдвиг частоты превалирующей (наибольшей) составляющей спектра при увеличении усилия (табл. 1).

Таблица 1

Значения частот у наибольших составляющих спектра и вычисленные сдвиги их периодов при увеличении усилия

Параметр	Частота, Гц				Изменение периода, мс		
	минимум		максимум				
усилие							
рука	левая	правая	левая	правая	левая	правая	
обследуемые	удержание усилия только пальцами рук						
	1	5,30	5,03	5,83	5,40	17,15	13,62
	2	5,37	4,93	5,73	5,73	11,70	28,32
	3	6,50	6,10	6,50	5,47	0,00	-18,88
	удержание усилия выпрямленными руками						
	1	5,90	5,63	6,60	6,63	17,98	26,79
	2	6,03	5,27	6,33	5,70	7,86	14,31
	3	6,53	6,60	6,33	5,60	-4,84	-27,06

Так, у обследуемого 1 и 2 (БП-пациент в сессиях 1 и 2) частота увеличивалась в пальцах левой и правой рук. Казалось бы, что это незначительный прирост частоты. Однако для временного интервала это значительная разница в изменении периода колебаний, составляющая десятки миллисекунд. Изменение длительности периодов циклической активности может характеризовать изменение латентных периодов прохождения возбуждения по структурам мозга при изменении уровня удерживаемой силы и, в конце концов, лабильность структур ЦНС. Уменьшение периодов колебаний соответствует уменьшению задержки прохождения сигналов в кольцевой структуре, при неизменности которой это может происходить только при уменьшении латентных периодов при переключениях сигналов на нейронах структурных образований ЦНС или при вовлечении параллельных трактов с большей скоростью проведения возбуждения. У обследуемого 3 частота превалирующих составляющих спектра больше в пальцах рук, чем у БП-пациента, но самое существенное, что при увеличении усилия период этих колебаний не уменьшается, а остается неизменным, как в левой руке, или увеличивается. По нашему мнению, такое увеличение длительности периодов может быть следствием первичных поражений корковых структур мозга, а не структур базальных ганглиев. Это существенное отличие в дифференциальной диагностике БП и пациентов с диагнозом синдром паркинсонизма.

Вид произвольной компоненты изометрического усилия и соответствующие ей спектры плотности зависят от характера теста и значительно отличаются при

удержании усилия выпрямленными руками от результатов, полученных в тесте с удержанием усилия только пальцами рук (см. рис. 8).

У БП-пациента в сессии 2 (через 2 года) изменилась более пораженная сторона. Если в сессии 1 регистрируется большее поражение в левой руке, то в сессии 2 более пораженной оказывается правая рука, которая является противоположной по отношению к усилию, удерживаемому только пальцами (активация пирамидного пути). Спектры плотности при удержании максимального усилия усложнены близко расположенными пиками в области 4–8 Гц, характеризующая «разобщенность» в активации структур базальных ганглиев. Распределение спектральной плотности в этом случае заметно отличается от спектров плотности при удержании усилия только пальцами рук. И если в сессии 1 наблюдали значительный прирост амплитуды спектральных составляющих при увеличении усилия, то в сессии 2 он практически отсутствует. Эти данные свидетельствуют о большем поражении структур базальных ганглиев (функциональном в начале заболевания) по отношению к пирамидному тракту вследствие деструктивных процессов, следующих за дисфункцией, и последующей гибелью дофаминергических нейронов черной субстанции.

У обследуемого 3 непроизвольная компонента левой руки при минимальном усилии проявляет патологическую активность в области 4–8 Гц, хотя при максимальном усилии может рассматриваться близкой к норме. В правой руке в спектрах плотности наблюдаются в более высоких областях частот кратные «гармоники» меньшей амплитуды, но они не так выражены, как у БП-пациента. Здесь следует сказать, что после того как мы убедили лечащего врача, что данный пациент не относится к группе, классифицируемой как БП, им была проведена восстановительная терапия для ликвидации последствий длительного применения препаратов с L-допа.

В заключение приведем еще один пример пациента с диагнозом БП, который длительно принимает препарат тидомет по назначению врача. К сожалению, невропатолог, назначая препарат, не может вести вне стационара наблюдение за пациентом, который обращается в поликлинику через несколько недель или более длительный срок, когда начинает чувствовать очередной дискомфорт и нечувствительность к назначенной терапии. Тем более, в поликлиниках нет объективного контроля воздействия препарата на пациента. Мы провели первое тестирование пациента перед очередным приемом 1 таб. препарата тидомет форте и затем второе через 40 мин после приема препарата. Стандартное тестирование заключалось в регистрации минимального и максимального усилия, удерживаемого сначала только пальцами рук с опорой на тыльную сторону ладони (тестирование пирамидного пути), а затем выпрямленными вперед руками (тестирование экстрапирамидной системы) в условиях зрительной обратной связи по положению меток на экране монитора. Кроме того, максимальное усилие удерживали без зрительной обратной связи, полагая, что этим ограничиваем участие ядер таламуса в регуляции усилия. Одновременно регистрировали усилие двух рук, слежение за величиной которого осуществлялось по положению меток на экране монитора. Таким образом, протокол тестирования состоял из 6 последовательных регистраций данных. Задача обследуемого заключалась в удержании меток на экране монитора для правой и

левой руки на одном уровне. Как и ранее, процесс слежения для последующей обработки и анализа данных регистрировали 30 с. Необходимую точность и длину временного ряда обеспечивала частота квантования 400 Гц. Первичный результат такого тестирования показан на рис. 9.

Здесь следует подчеркнуть, что параметрами произвольной компоненты (свыше 2 Гц) человек не может управлять сознательно. Они характеризуют состояние системы автоматической регуляции или сохранения позы, в нашем случае – при удержании заданной величины усилия. Частотный диапазон произвольных движений находится ниже 0,2 Гц, в котором осуществляется слежение за метками на экране монитора, оценка их положения и коррекция для ликвидации рассогласования, очевидно, по пирамидному тракту. В норме активность во всех параллельных проводящих трактах десинхронизируется по типу возвратного торможения мотонейронов через клетки Реншоу на сегментарном уровне (Романов, 1996). При патологии происходит синхронизация активности в нейронных образованиях мозга, которая на выходе моторной системы выражается в дисфункции двигательной активности.

Визуализация данных, получаемых аппаратно, и их интерпретация после применения соответствующего задаче математического анализа требуют определенных знаний и навыка. Но он (объективный анализ функционального состояния ЦНС) необходим, с одной стороны, если мы действительно хотим помочь пациенту, а с другой стороны, для понимания механизмов функционирования нервной системы как в норме, так и при развитии патологических состояний, тем более при восстановлении двигательной функции в результате назначаемой терапии.

Представленные записи произвольной компоненты по форме колебаний и реакциям на увеличение усилия не соответствуют таковым при БП. В левой руке наблюдается значительная амплитуда произвольной компоненты по сравнению с правой рукой. В ее колебаниях явно выражена несимметричность произвольной компоненты в пальцах (тест 1) и в руках (тест 4) при минимальном усилии, но направление асимметрии инвертировано. Значительное уменьшение амплитуды произвольной компоненты в тесте 6 (удержание максимального усилия руками без зрительной обратной связи) не характерно для БП. У этого пациента при различных условиях тестирования незначительно меняется частота патологических колебаний в диапазоне 3–6 Гц (см. спектры плотности на рис. 9А).

Выделяемая активность в спектрах плотности на частоте около 9 Гц при минимальном усилии в пальцах, а также в руках свидетельствует о повышенном физиологическом треморе, возможно, от которого и начали лечить данного пациента препаратами L-допа. В правой руке также присутствует активность в диапазоне 3–6 Гц, но она значительно меньше, так как в спектрах плотности выделяется активность в диапазоне 0–2 Гц, подавленная в левой руке. Примечательно, что при слежении без зрительной обратной связи уменьшается патологическая частота, т.е. увеличивается период колебаний. Мы предполагаем, что у данного обследуемого могут быть нарушения во взаимоотношениях сенсомоторной коры с соответствующими ядрами таламуса. Не зная этиологии заболевания, обследуемого можно характеризовать диагнозом синдром паркинсонизма, но никак не БП. Это подтверж-

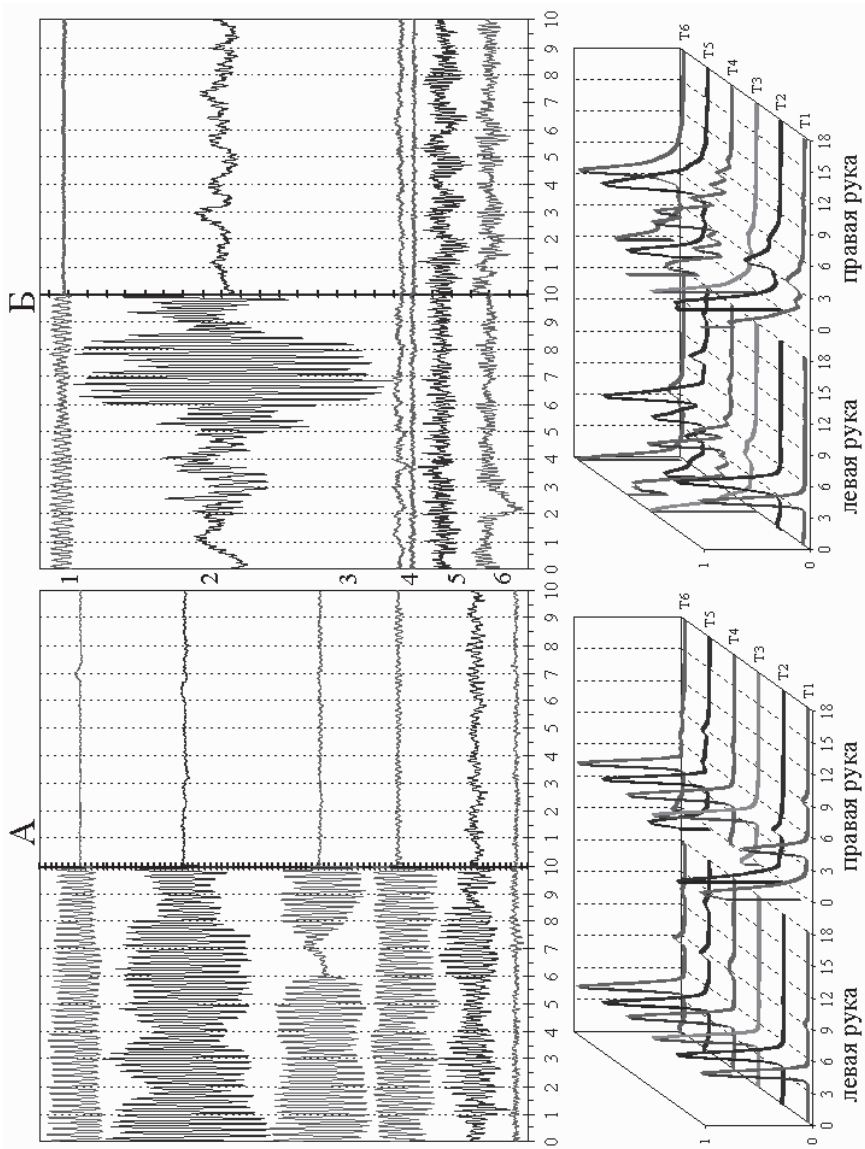


Рис. 9. Произвольные компоненты изометрического усилия, удерживаемого ЛГН76 до приема препарата (А) и через 40 мин (Б) после приема L-допа (1Г тидомет форте)

Вверху: десятисекундные фрагменты регистрации в шести (1-6) последовательных тестах. По вертикали: деление шкалы 100 г. По горизонтали: время, секунды. Внизу: нормированные спектры Фурье (Т1-Т6), соответствующие произвольным компонентам 1-6 изометрического усилия. По горизонтали: частота, Гц

дает результат тестирования пациента на фоне содержащего L-допа препарата, который снижает частоту произвольной активности в пальцах (тесты 1 и 2), но увеличивает ее при удержании усилия без зрительной обратной связи с участием тактильной и, очевидно, проприоцептивной чувствительности (тест 3). Критерием патологии является отношение амплитуд спектра в диапазоне 3–6 Гц к диапазону 0–2 Гц. Видно, что тидомет подавляет патологическую симптоматику 4–5 Гц, но в спектрах плотности выделяется повышенная активность в руках в диапазоне 6–8 Гц при максимальном усилии.

Представленные нами результаты исследования говорят о необходимости объективного анализа функционального состояния ЦНС и строго индивидуального подхода к назначению лекарственной терапии каждому предполагаемому пациенту, попадающему в категорию синдром паркинсонизма. Еще раз следует подчеркнуть, что на сегодня основная задача может заключаться не в дифференциальной диагностике БП, а в доказательстве, что данный, конкретный пациент не принадлежит к этой группе. Следует также отметить, что опровержение установленного диагноза требует значительно больших усилий для доказательства его ошибочности.

Понятно, что организация ЦНС, и системы управления движениями в частности, едина для всех пациентов и здоровых индивидов. Нарушения ее целостности в любой из областей мозга может приводить к такой внешне проявляемой однотипной симптоматике, как повышенный тремор. Уже классическим примером стала эпидемия гриппа XX века, приведшая в 20-х годах к массовому распространению паркинсонизма. Сочетанные нарушения в моторной системе неизвестной этиологии затрудняют диагностику устоявшимися за столетия методами разных двигательных проб или на основании только анамнеза. Загрязнение среды обитания, рост психологической напряженности, снижение физических нагрузок способствуют разрушению устоявшихся механизмов регуляции всех функций и систем организма.

Болезнь Паркинсона – нейродегенеративное заболевание, вызванное нарушениями в дофаминергической системе регуляции моторной функции. Согласно медицинскому справочнику, БП составляет почти 80% всех случаев паркинсонизма, «паркинсонизм-плюс»-синдромы – более 10% паркинсонизма, лекарственный паркинсонизм – около 8% паркинсонизма (Паркинсонизм, 2012). Согласно Справочнику: «Диагноз болезни Паркинсона в большинстве случаев может быть поставлен на основании обследования больного и не представляет трудностей». «Паркинсонизм-плюс»-синдромы и паркинсонизм при наследственных заболеваниях отличается наличие дополнительных неврологических нарушений, отсутствие или незначительный эффект от препаратов L-допа. Однако в большинстве случаев назначается L-допа-терапия для подавления симптомов. Если принять установленную норму в 1% заболевания паркинсонизмом в возрасте старше 60 лет, то на территории современной России проживает более 400 тысяч больных паркинсонизмом, более 320 тысяч которых относятся к БП, если учесть, что БП начинает развиваться за десятилетия до ее внешнего проявления. По данным American Parkinson Disease Association, в США насчитывается от 1 до 1,5 миллионов больных болезнью Паркинсона.

При современных методах воздействия на медиаторные системы мозга, очевидно, необходима объективная классификация функционального состояния центральной (моторной) нервной системы. Надеемся, что разработанные нами на основе анализа параметров произвольно удерживаемого изометрического усилия объективные критерии оценки функционального состояния моторной системы, учитывающие ее иерархическую организацию, позволят систематизировать и классифицировать патологические состояния применительно к дифференциальной диагностике БП относительно синдрома паркинсонизма.

* * *

Для изучения центральных механизмов регуляции двигательной активности человека был разработан неинвазивный метод, основанный на анализе параметров изометрического усилия, рассматриваемого как моторный выход, как конечный результат деятельности центральной нервной (моторной) системы. В качестве тестовой процедуры использовалось произвольное управление изометрическим усилием, удержание которого требует, с одной стороны, пропорциональной прилагаемому усилию активации структур моторной системы, а с другой стороны, инициирует циклическую активность на всех ее уровнях. Для оценки получаемых результатов параметры изометрического усилия (величина усилия, его произвольные колебания) регистрировались в виде временных рядов, что позволяло, используя современные математические методы анализа (быстрое преобразование Фурье и разложение временного ряда на главные компоненты (ГК) по методу Singular Spectrum Analysis: SSA – «Гусеница»), выделять в структурах моторной системы амплитудно-частотные диапазоны активности, нисходящей в норме, или при патологии к мотонейронам сегментарного уровня – по пирамидному пути и экстрапирамидным трактам. Применение программы SSA впервые в нейрофизиологии позволило визуализировать интегративную деятельность отдельных уровней управления моторной системы, отразив их в графическом виде. Результаты, полученные при анализе активности здоровых испытуемых, позволили перейти к оценке методом главных компонент функционального состояния центральной нервной (моторной) системы при различных двигательных патологиях, в том числе при БП и различных случаях паркинсонизма. Материал, приведенный в настоящем исследовании, показывает важность и необходимость дифференциального диагноза этих достаточно внешне подобных патологий, а также возможность его проведения при использовании разработанных нами методов, выявляющих параметры, отличающие БП от синдрома или лекарственного паркинсонизма. Объективность установления диагноза необходима для выбора индивидуальных адекватных методов восстановления двигательных функций.

В этом заключается определенная новизна настоящей работы, направленной на использование объективных аппаратных неинвазивных методов для определения характерных признаков в параметрах произвольного компонента изометрического усилия, отражающих функцию пирамидной и экстрапирамидной систем.

Литература

- Алексанян З.А., Романов С.П.* Оценка интегральной активности моторной системы человека при произвольном изометрическом сокращении мышц верхних конечностей // *Новости медико-биологических наук.* 2009. № 1-2. С. 92-103
- Бедров Я.А., Дик О.Е., Романов С.П., Ноздрачев А.Д.* Метод выявления количественных отличий в параметрах колебаний произвольного усилия у здоровых испытуемых и пациентов с синдромом паркинсонизма // *Бюлл. эксперим. биол. и мед.* 2008. Вып. 146. № 10. С. 477-481.
- Дик О.Е., Романов С.П., Ноздрачев А.Д.* Энергетические и фрактальные характеристики физиологического и патологического тремора руки человека // *Физиология человека.* 2010а. Вып. 36. № 2. С. 92-100.
- Дик О.Е., Романов С.П., Ноздрачев А.Д.* Анализ различий физиологического и патологического тремора пальцев руки человека // *Бюлл. эксперим. биол. и мед.* 2010б. Т. 149. № 4. С. 364-367.
- Паркинсонизм. Медицинский справочник заболеваний.* 2012. <http://www.amclinic.ru/content/view/635/265/>
- Романов С.П.* Нейрофизиологические механизмы гомеостаза двигательной функции. Дисс. докт. биол. наук. 03.00.02. АН СССР. Л.: Ин-т физиологии им. И.П. Павлова, 1989. <http://elibrary.rsl.ru>
- Романов С.П.* Тормозные обратные связи в цепи регуляции разрядов мотонейронов // *Росс. физиол. журнал им. И.М. Сеченова.* 1996. Т. 82. № 1. С. 33-44.
- Романов С.П.* Концептуальные подходы к выявлению функции структурной организации нейронной сети // *ЖВНД.* 2000. Т. 50. № 2. С. 320-343.
- Романов С.П., Алексанян З.А.* Применение динамометрии в исследовании интегральной активности моторной системы человека // *Биомедицинская радиоэлектроника. Биомедицинские технологии и радиоэлектроника.* 2009. № 2. С. 16-25.
- Романов С.П., Якимовский А.Ф., Пчелин М.Г.* Метод тензометрии для количественной оценки тремора // *Росс. физиол. журнал им. И.М. Сеченова.* 1996. Т. 82. № 2. С. 118-123.
- Романов С.П., Пчелин М.Г., Якимовский А.Ф.* Характеристики изометрически регистрируемого тремора при поражении экстрапирамидной системы // *Росс. физиол. журнал им. И.М. Сеченова.* 1997. Т. 83. № 3. С. 133-139.
- Романов С.П., Алексанян З.А., Лысков Е.Б.* Характеристики возрастной динамики активности моторной системы человека // *Физиология человека.* 2007. № 4. С. 82-94.
- GistaT Group. Гусеница: анализ и прогноз временных рядов. 2012. <http://www.gistatgroup.com/gus/>
- Romanov S.P., Pchelin M.G.* The motor control output forming in healthy subjects and parkinsonian disorder patients // *Basal Ganglia and Thalamus in Health and Movement Disorders.* Eds K. Kultas-Ilinsky, I.A. Ilinsky. NY: Kluwer/Academic/Plenum Press, 2001. P. 293-305.

Болезнь Паркинсона, дофаминергическая система мозга и регуляция сна

В.М. Ковальзон, И.М. Завалко, В.Б. Дорохов

Содержание

1. Введение
2. Сон и болезнь Паркинсона
3. Роль дофамина в регуляции цикла бодрствование–сон
4. Экспериментальные модели паркинсонизма
5. Болезнь Паркинсона и нарколепсия
6. Проблема избыточной дневной сонливости (EDS) при болезни Паркинсона
7. Нарушение поведения в фазе быстрого сна (RBD) при болезни Паркинсона
8. Синдром беспокойных ног (RLS) при болезни Паркинсона
9. Заключение

1. Введение

Болезнь Паркинсона (БП) – одна из наиболее социально значимых, и изучение ее биологических основ (наряду с болезнью Альцгеймера, депрессией и инсультом) является важнейшей задачей всех современных наук о мозге, что было специально отмечено Президентом РАН на научной сессии «Мозг», состоявшейся в декабре 2009 г. (Осипов, 2010). При этом заболевании происходит по неизвестным пока причинам очень медленная (в течение десятков лет), но неуклонная дегенерация дофаминергических нейронов компактной части черной субстанции среднего мозга (SNpc), проецирующихся в ядра стриатума. Процесс протекает бессимптомно в результате включения компенсаторных механизмов, и лишь на поздней стадии развития заболевания, когда остается меньше половины исходного количества дофамин-содержащих нейронов, а уровень дофамина (ДА), доставляемого в стриатум этими нейронами, падает в 4 раза, возникают двигательные, а в дальнейшем

Сокращения: АТФ – аденозинтрифосфат; БП – болезнь Паркинсона; ГАМК – гамма-амино-масляная кислота; ДА – дофаминергический; MAO – моноаминоксидаза; МКГ – меланин-концентрирующий гормон; МФТП (МРТР) - 1-метил-4-фенил-1,2,3,7-тетрагидропиридин; 5-HT (5-hydroxytryptamine) – серотонинергический; Ach (acetylcholine) – холинергический; DAT – белок-переносчик дофамина; DR (dorsal raphe nuclei) – дорзальные ядра шва; EDS (excessive daytime sleepiness) – избыточная дневная сонливость; FC (frontal cortex) – лобная кора; Glu – глутаматергический; HA – гистаминергический; LC (locus coeruleus) – синее (голубое) пятно; MPP⁺ – 1-метил-4-фенил-пиридин ион; NA – норадренергический; NAcc (nucleus accumbens) – прилежащие ядра перегородки; Орх (Hrc) – орексин (гипокретин)-ергический; PPT/LDT – педункулопонтинная/латеродорзальная покрышка моста; RBD (REM behavior disorders) – нарушения поведения в фазе быстрого сна; REM (rapid eye movement) сон – фаза быстрого (парадоксального) сна, сна с быстрыми движениями глаз; SNpc – компактная часть черной субстанции; TMH – туберомамиллярные ядра гипоталамуса; vPAG – вентральное околотоводопроводное серое вещество; VTA – вентральная покрышка среднего мозга.

– и когнитивные нарушения¹. Однако начинать лечение в этот период уже слишком поздно, и в истории мировой медицины не было еще ни одного больного, которого удалось бы исцелить. Современная медицина может лишь облегчить симптомы заболевания и в некоторых случаях немного замедлить развитие болезни. Поэтому создание адекватных экспериментальных моделей и поиск ранних маркеров являются сейчас первостепенными задачами (Угрюмов, 2010а,б).

В последние годы вышеизложенная традиционная точка зрения на БП как заболевание преимущественно двигательной системы, связанное главным образом с полным или по крайней мере весьма значительным избирательным разрушением ДА nigростриатной системы, подвергается пересмотру (Fernandez, 2008). Показано, что некий неизвестный фактор (возможно, экзотоксической, бактериальной или вирусной природы) при попадании в организм начинает свою разрушительную деятельность в головном мозге с двух его концов – рострального и каудального. От обонятельного и продолговатого мозга разрушения постепенно продвигаются к его геометрическому центру, захватывая «по дороге» все немиелинизированные или слабомиелинизированные нервные клетки и их отростки (при этом клетки и отростки, защищенные толстой миелиновой оболочкой, остаются неповрежденными). На этом пути к SNpc и двум другим ростральным областям среднего мозга, где находятся ДА-ергические нейроны – вентральной покрывке среднего мозга (VTA) и вентральному околосредствому серому веществу (vPAG) – более или менее значительному разрушению подвергаются многие скопления нейронов не только обонятельного и продолговатого мозга, но и покрывки моста и ростральной части среднего мозга (SNpc, VTA и vPAG), а затем гипоталамуса и структур переднего мозга (рис. 1). В ранний период развития заболевания уже отмечаются различные немоторные симптомы, в частности – нарушение обоняния и цикла бодрствования–сон. Таким образом, с современной точки зрения, разрушение nigростриатной системы и сопутствующие двигательные нарушения – не единственные и, быть может, даже не главные признаки БП, а скорее финальная и наиболее драматичная часть многолетнего процесса нейродегенерации (Пастухов, Чеснокова, 2010).

2. Сон и болезнь Паркинсона

Нарушения сна при БП многообразны, присутствуют у 45–98% больных (по разным данным) и представлены инсомниями, парасомниями, гиперсомниями и другими нарушениями сна и бодрствования (Гусев и др., 2010; DeCoc et al., 2008; Mehta et al., 2008; Trenkwalder, Arnulf, 2011; Zoccollella et al., 2011).

Инсомнии. У больных с БП значительно снижены *общее время* и *эффективность* сна (отношение времени сна ко времени нахождения в постели). К снижению общего времени сна приводят трудности с засыпанием, ранние утренние про-

¹ «Первым описанным изначально характерным для паркинсонизма свойством больного являются *суетливость* (семенящая походка) и *пропульсии* (толчки). Суетливость проявляется в ускорении (и одновременном укорочении) шагов, движений, произнесения слов и даже мыслей...» (Сакс, 2013)

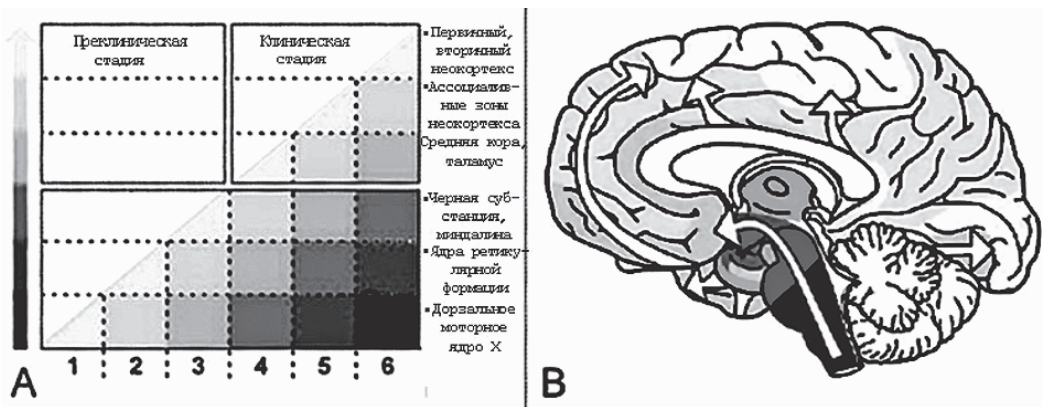


Рис. 1. Преклинические и клинические стадии БП

А – преклинические стадии характеризуются появлением телец/нейритов Леви в мозге. В клинических стадиях происходит дальнейшая прогрессия нейропатологических изменений. Интенсивность окрашивания (от светло-серого до черного) квадратов под диагональной линией показывает нарастающее тяжесте поражения в чувствительных областях мозга (справа).

В – на рисунке стрелками изображено распространение патологического процесса. Оттенки серого соответствуют рисунку А (Пастухов, Чеснокова, 2010; Braak et al., 2004), печатается с разрешения

буждения, но наиболее распространенным нарушением являются частые ночные пробуждения, приводящие к значительной *фрагментации* сна.

Парасомнии. К нарушению *структуры сна* приводят встречающиеся чаще, чем в общей популяции, нарушения дыхания во сне, синдром беспокойных ног (см. далее) и периодические движения конечностей. Распространены нарушения фазы *быстрого* (парадоксального, REM) сна²: наблюдаются укорочение и/или урежение его периодов; примерно треть больных жалуется на ночные кошмары и галлюцинации, также примерно у трети больных выявляются нарушения поведения в фазе быстрого сна (REM behavior disorders, RBD). При RBD происходит нарушение механизмов, ответственных за мышечную атонию во время быстрого сна, и больной, как «кошка Жуве» (см. далее), начинает демонстрировать свои сновидения. Часто наблюдается агрессивное поведение, пациент бьет руками и ногами, издает какие-то звуки или говорит. При этом нормальный двигательный контроль восстанавливается: движения перестают быть замедленными, не сопровождаются тремором, исчезает гипофония (DeCock et al., 2007). Хотя RBD могут встречаться и изолированно (идиопатические RBD), но среди больных с БП и рядом других нейродегене-

²Фаза быстрого (парадоксального, REM) сна – особое состояние организма теплокровных животных, периодически возникающее во время сна (у взрослого человека – каждые полтора часа) и характеризующееся чрезвычайно высокой активностью головного мозга, полным подавлением тонического мышечного тонуса (прерываемым эпизодическими фазическими подергиваниями) и нерегулярностью ритма сердечных сокращений и дыхания. Именно в этом состоянии снятся сны. Его эволюционное происхождение, функциональное назначение и молекулярные механизмы остаются загадочными, несмотря на более чем полувековую историю весьма интенсивного изучения (Ковальзон, 2011а,б, 2013а).

ративных заболеваний (синуклеопатиями) их частота значительно выше (Postume et al., 2009a,b). Более того, было показано, что у пациентов с изолированными RBD в будущем развивается одно из этих нейродегенеративных заболеваний. То есть *RBD может являться предвестником БП* (Schulte, Winkelmann, 2011). Кроме того, у пациентов с БП и RBD двигательные нарушения прогрессируют быстрее (по сравнению с больными с БП без RBD), чаще развивается деменция (Vendette et al., 2007).

Особенностью двигательных нарушений при БП является их динамика во время и после ночного сна и при его депривации. Тремор покоя исчезает перед началом сна, во многих случаях как раз перед исчезновением альфа-ритма на ЭЭГ, и не возобновляется на протяжении всего сна. Тремор вновь возникает во время пробуждений, микропробуждений, крупных движений и при смене стадий сна (Stern et al., 1968). Также он может появляться в начале и конце парадоксального сна и при быстрых движениях глаз (Stern et al., 1968). Вероятно, другие двигательные нарушения во время сна тоже меняются (брадикинезия, мышечная ригидность), но проверить это пока не представляется возможным. Имеются данные, что *лишение сна* может приводить к улучшению некоторых двигательных нарушений. После депривации сна в течение одной ночи отмечено уменьшение ригидности, брадикинезии, нарушений походки в течение 2 недель (Bertolucci et al., 1987). Однако другие авторы почти у половины больных наблюдали улучшение двигательной симптоматики после *нормального* ночного сна (Factor et al., 1990).

Гиперсомнии. К гиперсомническим проявлениям при БП можно отнести *избыточную дневную сонливость* (excessive day time sleepiness, EDS) и «атаки» сна (Силькис, 2009; Paus et al., 2003; Iranzo, 2011; Shpirer et al., 2007). До половины больных с БП испытывают избыточную дневную сонливость. Помимо этого у пациентов наблюдаются внезапные дневные засыпания, в том числе и во время активной деятельности, не сопровождающиеся предшествующей дневной сонливостью, так называемые «атаки сна». Ведутся споры, являются ли «атаки сна» проявлениями дневной сонливости или отдельными феноменами. Большинство исследователей склоняются к тому, что из-за амнестического эффекта сна больной не помнит, что засыпание возникло на фоне предшествующей сонливости. В пользу этого говорит тот факт, что, несмотря на отрицание предшествующей сонливости, пациенты с возникающими «атаками сна» отличаются высоким баллом по эпвортской шкале сонливости (Paus et al., 2003). *Гиперсомнические симптомы и RBD являются наиболее ранними предикторами БП*, возникая порой за несколько лет, а иногда даже за десятки лет до появления двигательных нарушений (Iranzo, 2011).

3. Роль дофамина в регуляции цикла бодрствование–сон

С чем же связаны нарушения сна при БП? Ранние гипотезы связывали их, естественно, с разрушением продуцирующей ДА nigростриатной системы. Однако роль ДА в нормальной регуляции бодрствования и сна долгие десятилетия оставалась загадочной. Другие аминергические системы мозга – норадренергическая (NA), клетки которой расположены в области синего пятна (LC), серотонинерги-

ческая (5-HT), локализованная главным образом в дорзальных ядрах шва (DR), и гистаминергическая (HA), находящаяся в туберомамиллярных ядрах заднего гипоталамуса (ТМН), оказывают мощные активирующие (тонические деполаризующие) воздействия, как восходящие (на нейроны неокортекса и архипалеокортекса), так и нисходящие (на мотонейроны спинного мозга). Нервные клетки этих систем, весьма активные в бодрствовании, прогрессивно снижают свою импульсацию в медленном сне и полностью (или почти полностью) «замолкают» в быстром (табл. 1). Таким образом, эти три мозговые системы, наряду с холинергической (Ach), глутаматергической (Glu) и сравнительно недавно открытой орексин/гипокретинергической (Orx/Hcr), участвуют в поддержании «тонуса неокортекса» и мышечного тонуса в бодрствовании (Ковальзон, 2011а,б; Datta, 2010; Datta, MacLean, 2007; Pace-Schott, Hobson, 2002).

Разрушение выделяющих дофамин нейронов vPAG у крыс приводит к увеличению продолжительности медленного и быстрого (парадоксального) сна за счет снижения суммарного времени бодрствования (Monti, Jantos, 2008), что позволило также отнести их к системе поддержания бодрствования. Более того, у мышей, нокаутных по гену дофаминового переносчика, с увеличенным содержанием внеклеточного дофамина, наблюдается повышенная представленность бодрствования и пониженная – медленного сна (примерно на 1/5) в светлый (неактивный) период суток по сравнению с гетерозиготными и контрольными (немутантными, wild-type) животными (Wisor et al., 2001).

Однако ранние исследования не выявили заметных изменений активности DA нейронов, расположенных в SNpc/VTA, в цикле сон–бодрствование у крыс и кошек (Miller et al., 1983; Steinfels et al., 1983; Trulson et al., 1981; Trulson, Preussler, 1984). Поэтому долгое время считалось, что, в отличие от вышеперечисленных мозговых

Таблица 1

Упрощенная схема выделения основных медиаторов головного мозга в цикле бодрствование–сон

Нейро-передатчики	Бодрствование	Медленный сон	Быстрый сон
Ацетилхолин	↑↑	↓→↓↓	↑↑
Глутамат	↑↑	↓→↓↓	↑↑
Норадреналин	↑↑	↓→↓↓	↓↓
Серотонин	↑↑	↓→↓↓	↓↓
Гистамин	↑↑	↓→↓↓	↓↓
Дофамин	= (↑)	= (↓)	↑
ГАМК	↓↓	↑→↑↑	↓
Орексин/ гипокретин*	↑↑	↓	↓↓
МКГ**	↓	↓	↑↑

*Орексин (гипокретин) – открытый в 1998 г. пептид-медиатор ЦНС. **МКГ – меланин-концентрирующий гормон холоднокровных позвоночных, открытый в 1983 г.; в 1985 г. была обнаружена роль пептида-медиатора в ЦНС млекопитающих.

Стрелка вверх – повышение выделения; двойная стрелка вверх – значительное повышение выделения; стрелка вниз – снижение выделения; двойная стрелка вниз – значительное снижение выделения; горизонтальная стрелка вправо – постепенное понижение/повышение выделения; знак равенства – выделение без изменений; стрелка в скобках – данные сомнительны.

аминергических систем, ДА-нейроны nigrostriatной системы не участвует в регуляции бодрствования и сна. В дальнейшем, однако, было обнаружено, что концентрация внеклеточного ДА в местах проекции nigrostriatных нейронов колеблется в цикле бодрствования-сна, снижаясь в медленном сне по сравнению с бодрствованием и вновь повышаясь в быстром (Lena et al., 2005). Оставалось непонятным, за счет чего же изменяется выброс ДА в стриатуме, если частота импульсации нейронов, его синтезирующих, не меняется? Однако более тщательное изучение характеристик ДА-нейронов VTA выявило существенные различия в рисунке (паттерне) разрядов в быстром сне по сравнению со спокойным бодрствованием и медленным сном (Dahan et al., 2007). В быстром сне значительно возрастает представленность разрядов в виде «вспышек», «пачек» (bursts), причем внутри каждой «вспышки» амплитуда разрядов прогрессивно снижается (рис. 2а,с). Аналогичные изменения рисунка разрядов ДА-нейронов VTA (нарастание представленности «пачек») отмечаются при переходе от спокойного бодрствования к эмоционально-мотивационному поведению с положительным подкреплением (например, поеданию крысой вкусной пищи, рис. 2b,d). Именно такие «вспышки» сопровождаются массивным выбросом ДА в синаптические щели и межклеточное пространство (Wightman, Robinson, 2002).

Иммуногистохимическое исследование экспрессии c-Fos белка ДА клетками головного мозга крыс показало, что нейроны VTA, в отличие от SNpc, увеличивают свою активность при «отдаче» быстрого сна после его 2-суточной депривации (Maloney et al., 2002). Недавнее исследование французских авторов, однако, не выявило изменений Fos-экспрессии в областях A9 и A10 (SNpc/VTA и vPAG) во время восстановительного сна («отдачи») после 3-суточной депривации быстрого сна или 3-часового пребывания в бодрствовании в сенсорно обогащенной среде. Было обнаружено лишь небольшое повышение активности группы ДА нейронов, расположенных в каудальном отделе гипоталамуса (A11). Кроме того, было отмечено повышение количества Fos-иммунореактивных ДА-содержащих клеток, локализованных в zona incerta (A13) (Leger et al., 2010). Однако те же авторы отмечают, ссылаясь на работу (Kovacs, 1998), что c-Fos-метод не является надежным маркером активации нейронов (Luppi et al., 2011).

Надо сказать, что в обеих приведенных выше работах (Maloney et al., 2002; Leger et al., 2010) для депривации быстрого сна авторы использовали разработанный в свое время в лаборатории М. Жуве метод «малых площадок». Хорошо известно, однако, что этот поведенческий метод хотя и прост в использовании, вызывает не только эффективное подавление быстрого сна, но и значительное снижение – медленного, а также сильный эмоциональный стресс у подопытных животных (мышей, крыс, кошек), вызванный страхом упасть в воду во время сна. Недаром он был назван известным патофизиологом Ф.З. Меерсоном методом «стресса по Жуве»! При этом происходит взаимодействие стресса и депривации сна и формирование особого фенотипа, сохраняющегося на протяжении по крайней мере первых суток после завершения депривации. Все это делает данную методику неадекватной для изучения эффектов избирательного лишения быстрого сна «в чистом виде», а результаты, полученные с ее помощью, – не интерпретируемыми. Для изучения

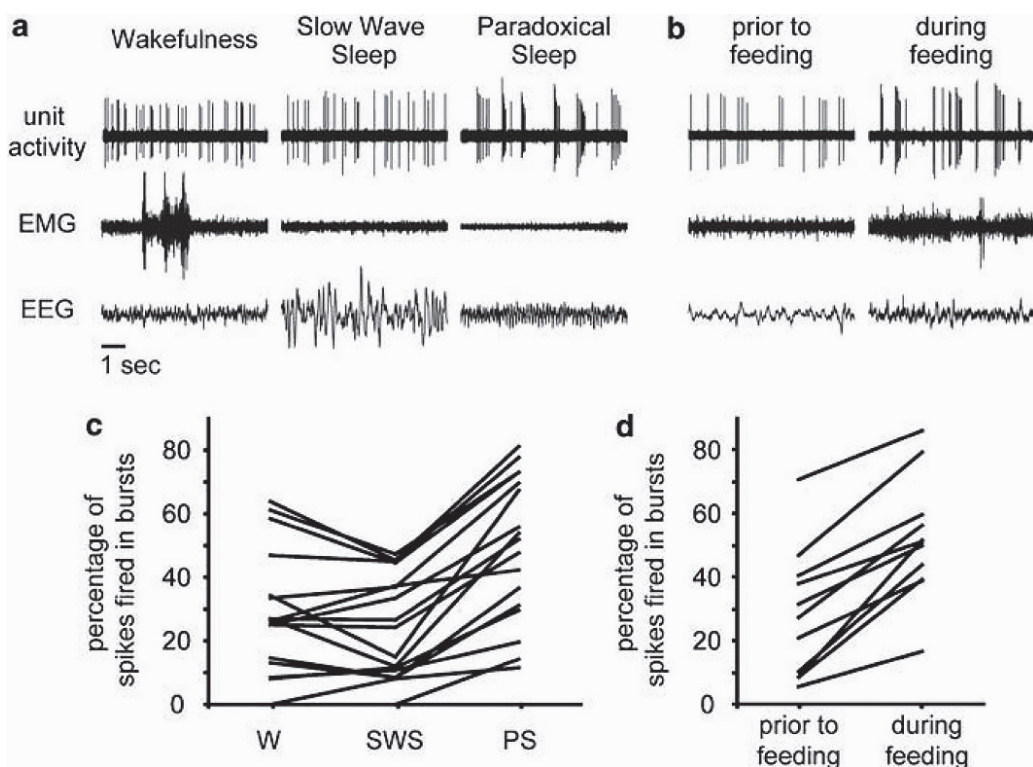


Рис. 2. ДА нейроны вентральной покрышки переходят в «пачечный» режим разрядов в быстром (парадоксальном) сне (а, с) и при потреблении крысой вкусной пищи (b, d). Вверху: разряды одиночных нейронов (unit activity), одного – в цикле бодрствование–сон (wakefulness, W – бодрствование, Б; slow wave sleep, SWS – медленноволновый сон, МС; paradoxical sleep, PS – парадоксальный сон, ПС), а другого – до- (prior to feeding) и во время (during feeding) поедания вкусной пищи. EMG – электромиограмма (ЭМГ); EEG – электроэнцефалограмма (ЭЭГ). Б – характеризуется выраженной активностью на ЭМГ и низкоамплитудной, десинхронизированной ЭЭГ; МС – пониженной активностью на ЭМГ и высоковольтными медленными волнами на ЭЭГ; ПС – исчезновением мышечного тонуса на ЭМГ и выраженным тета-ритмом на ЭЭГ. Отметка времени – 1 с. ДА нейроны переключаются от нерегулярных разрядов с редкими дуплетами в спокойном бодрствовании и МС – к «пачечному» рисунку в ПС и при еде, причем каждая пачка состоит из нескольких спайков с прогрессивно снижающейся амплитудой. Также видно, что физическая активация ЭМГ в Б не влияет на импульсацию. Внизу: представленность пачечной активности в процентах от всех зарегистрированных спайков (percentage of spikes fired in bursts) у 17 нейронов, зарегистрированных в цикле бодрствование–сон, и 11 нейронов, записанных до и во время поедания вкусной пищи. Видно, что представленность пачек нарастает во время ПС и еды у всей популяции ДА-нейронов. Между нейронной активностью в Б и МС достоверных различий не выявляется (Dahan et al, 2007), печатается с разрешения

эффектов депривации быстрого сна уже давно разработаны иные, гораздо более «деликатные» методы (Kovalzon, Tsibulsky, 1984; Ковальзон, Цибульский, 1985).

Какова же роль повышенного уровня дофамина в быстром сне? Обобщая свои наблюдения за больными с различными неврологическими нарушениями, британский нейропсихолог Марк Солмс писал о том, что у многих больных с пораже-

ниями ствола объективно регистрируемое подавление быстрого сна не сопровождается исчезновением субъективно переживаемых сновидений. Наоборот, полное выпадение отчетов о сновидениях отмечается у тех больных, у которых поражения находятся в области, казалось бы, никакого отношения к регуляции быстрого сна не имеющей – вентромезиального лобного белого вещества (Solms, 2009). Однако именно в этой области проходит проекционный ДА-путь от VTA/SNpc к прилежащим ядрам перегородки (NAcc) и далее – к лобной коре (FC, рис. 3). Эта же область оказывается разрушенной при фронтальной лейкотомии, после которой у больных исчезают галлюцинации, бред, а заодно и сновидения.

Наряду с нейрохирургическими были получены и психофармакологические доказательства важной роли системы ДА в возникновении сновидений. Хорошо известно, что шизофреническая симптоматика связана с избыточной продукцией мозгового дофамина (наряду со снижением глутамата, норадреналина и серотонина) и лечится подавлением ДА передачи с помощью галоперидола и других антипсихотиков, подавляющих сновидения. Наоборот, недостаточность дофаминовой передачи, характерная для БП и вызывающая двигательные нарушения, приводит к полному прекращению отчетов больных о сновидениях (Lima et al., 2007). Лечится же БП ДА препаратами (леводопой и другими), прием которых, судя по отчетам больных, резко активизирует переживание ими сновидений (Lena et al., 2004).

Таким образом, согласно точке зрения М. Солмса, быстрый сон и сновидения – явления связанные, в норме протекающие одновременно, но отнюдь не тождественные. Это коренным образом расходится с классической гипотезой М. Жуве, разработанной еще в 1960-е годы и представленной им не только в научной и научно-

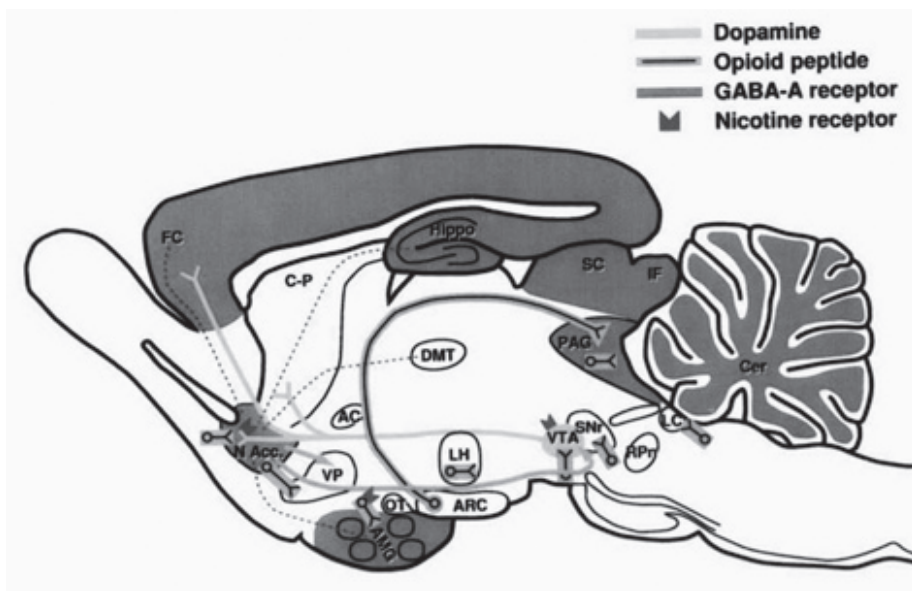


Рис. 3. Дофаминергическая система вентральной покрышки и ее проекции на парасаггитальном срезе головного мозга крысы (SNr=SNpc), с разрешения (Roehrs, 2007)

популярной, но и в художественной литературе (Жуве, 2006, 2008). Если быстрый сон связан с активацией ромбэнцефалических и гипоталамических структур, использующих в качестве нейротрансмиттеров глутамат, ацетилхолин, ГАМК и МКГ, то материальная основа такого сложного психологического явления, каким является переживание эмоционально насыщенных сновидений, состоит, по М. Солмсу, в активации ДА-ергических структур среднего и переднего мозга (Solms, 2009).

Резюмируя, можно сказать, что ДА-ергические нейроны связаны с регуляцией цикла сон–бодрствование главным образом тем, что участвуют в поддержании эмоциональных проявлений бодрствования и быстрого сна. Соответственно, недостаточность ДА, постепенно развивающаяся в ходе нейродегенерации при БП, должна, видимо, проявляться в первую очередь как нарастание сонливости и ослабление выраженности сновидений. Кроме того, она может косвенно (через усиление ГАМК-ергического торможения холинергического «центра быстрого сна» в области PPT/LDT за счет активации ретикулярной части черной субстанции) вызывать и некоторое снижение представленности быстрого сна (урежение и/или укорочение его эпизодов), которое снимается ДА-препаратами (Takakusaki et al., 2004; Силькис, 2006). Однако приведенный выше перечень нарушений сна при БП гораздо шире.

4. Экспериментальные модели паркинсонизма

Прогресс в изучении патогенеза нейродегенеративных заболеваний зависит в первую очередь от разработки адекватных экспериментальных моделей. Одной из общепризнанных является 1-метил-4-фенил-1,2,3,7-тетрагидропиридиновая (МФТП, англ. сокращение MPTP) модель паркинсонизма. Появление этой модели было связано с калифорнийскими наркоманами с выраженными симптомами паркинсонизма, обнаруженным в 1983 г. Оказалось, что эти молодые люди практиковали внутривенные инъекции неочищенного меперидина – синтетического аналога героина, содержавшего большие концентрации побочного продукта синтеза – МФТП. Проведенные в последующие годы тщательные исследования показали, что МФТП в силу высокой липофильности легко проходит через барьер, проникает в астроциты и там под воздействием фермента моноаминоксидазы типа В (МАО-В) превращается в ион MPP⁺ (1-метил-4-фенил-пиридин-ион). Этот ион связывается с высокоаффинным белком-переносчиком дофамина (DAT) и таким путем попадает внутрь митохондрий ДА нейронов. Проникнув туда, он ингибирует комплекс-1 (связанный с ферментом NADH-убихинон-оксидоредуктазой) митохондриальной цепочки передачи электрона и, таким образом, разобщает окислительное фосфорилирование. Это, в свою очередь, приводит к нарушению продукции АТФ, повышению уровня внеклеточного кальция, образованию свободных радикалов/активных форм кислорода, которые, взаимодействуя с клеточными белками, нуклеиновыми кислотами, липидами и другими молекулами, вызывают клеточные повреждения и, в конечном счете, гибель нейронов – т.е. проявления дофаминовой нейротоксичности (Yokoyama et al., 2011).

Токсичность МФТП по отношению к разным видам млекопитающих значительно различается и зависит главным образом от уровня MAO-B в головном мозге. Уровень этот высок у хищных и приматов и низок у грызунов, причем у крыс этот фермент почти полностью отсутствует (что обуславливают их высокую устойчивость к процедурам дератизации). Поэтому относительные дозы токсина, необходимые для формирования паркинсонического фенотипа у кошек и обезьян, раз в 15 ниже, чем у мышей. У крыс же вызвать признаки паркинсонизма в хронических опытах при системном введении МФТП практически невозможно (Giovanni et al., 1994).

Тем не менее, на черных мышах линии C57BL/7 разработана модель паркинсонизма, которая в настоящее время является общепризнанной и валидированной Международным обществом психофармакологов. В соответствии с этой моделью, черным мышам линии C57BL/7 системно вводят нейротоксин МФТП, избирательно разрушающий ДА систему. Эффект этого токсина зависит от дозировки и режима введения.

Изучение экспериментальных моделей паркинсонизма на мышах и обезьянах, полученных путем разрушения ДА нейронов SNpc и VTA, дало противоречивые результаты в отношении сходства с симптомами нарушений цикла бодрствование–сон, характерными для больных БП. Так, частичное разрушение всех ДА систем мозга мышей C57BL/7, вызванное 5-дневной ежедневной однократной системной инъекцией 25 мг/кг МФТП, приводило лишь к умеренному *увеличению* представленности быстрого сна в определенные часы регистрации (Monaca et al., 2004). Эффект возникал через 20 дней после интоксикации и исчезал через 40 дней, несмотря на необратимое 30-процентное разрушение ДА нейронов SNpc (Laloux et al., 2008). Интересно, что избирательное фармакологическое *повышение* синаптического содержания дофамина (путем системного введения ингибитора его обратного захвата) в этой модели приводило к *подавлению* быстрого сна, значительно более выраженному, чем у контрольных мышей. Аналогичный эффект вызывало и введение ингибитора обратного захвата *норадреналина* – антидепрессанта дезипрамина. В то же время, другой антидепрессант – ингибитор обратного захвата *серотонина* циталопрам – подавлял быстрый сон и у подопытных, и у контрольных мышей в одинаковой степени. А агонист мускариновых рецепторов ареколин вызывал *повышение* представленности быстрого сна у подопытных, но не у контрольных мышей. В целом, мыши с разрушением ДА системы оказались гораздо более чувствительными к введению фармакологических препаратов, модулирующих аминергические и холинергические системы мозга, чем контрольные животные (Laloux et al., 2007).

Локальная инъекция 0,2 мг того же нейротоксина МФТП в область SNpc, **вызывающая** 50-процентное разрушение ДА нейронов, приводила к изменению нескольких параметров цикла бодрствование–сон, в частности, почти двукратному увеличению представленности медленного сна в темный (активный) период на 2-е и 3-и сутки после интоксикации и двухфазному колебанию представленности быстрого сна. В 1-е и 2-е сутки после введения токсина наблюдалось значительное *снижение* представленности быстрого сна как в темный, так и в светлый период суток; на 3-и сутки – только в светлый (неактивный) период; на 4-е – значительное *повышение*

представленности быстрого сна и в светлый, и в темный период по типу «отдачи»; на 5-е, последние сутки регистрации, представленность быстрого сна возвращалась к норме. Интересно, что была обнаружена высокая корреляция между представленностью быстрого сна у данного животного в первые сутки после интоксикации и процентом потерянных ДА нейронов SNpc, выявленных по результатам гистохимического анализа ткани мозга через 5 суток после введения токсина (Lima et al., 2007).

Недавно было показано, что двукратное введение 12 мг/кг МФТП (с 2-часовым интервалом) имитирует доклиническую, а четырехкратное – раннюю клиническую стадии паркинсонизма (Ugrumov et al., 2011). Изучение цикла сон–бодрствование на этих моделях показало увеличение двигательной активности и суммарной продолжительности бодрствования в темный период на 7-е и 14-е сутки после введения МФТП по сравнению с контролем. Соответственно, происходило *снижение* продолжительности быстрого и (тенденция) медленного сна (Манолов и др., 2014).

Эффект *увеличения* быстрого сна вызывало весьма значительное избирательное разрушение нигростриатной системы, вызванное локальным введением в черную субстанцию другого нейротоксина – лактацистина (Пастухов и др., 2010). В то же время, в опытах на обезьянах (длиннохвостые макаки) системные токсические дозы МФТП вызывали *подавление* глубокого медленного и быстрого сна (Almirall et al., 1999). А у мармозеток системные дозы МФТП, вызывающие небольшие двигательные нарушения, вообще не влияли на структуру цикла бодрствование–сон (Verhave et al., 2011). Однако в двух последних работах отсутствовал морфоконтроль, так что о локализации и выраженности вызванных токсином разрушений в мозге приматов можно только догадываться.

Все эти результаты позволяют высказать предположение, что нисходящая дофаминергическая система функционально гораздо более уязвима по отношению к разрушительному действию нейротоксина МФТП, чем восходящая. Высокая функциональная устойчивость восходящих активирующих систем лиссэнцефалического мозга грызунов к нейротоксинам отмечена и в других работах (Blanco-Centurion et al., 2007). Так, в вышеупомянутой было показано, что локальные внутримозговые инъекции крысам сапорин-содержащих нейротоксинов, позволяющие «прицельно» разрушать химически специфичные нейронные тела, не приводят к значительным нарушениям цикла бодрствование–сон. Производимые этими авторами разрушения поражали до 75% гистаминергических нейронов туберомамиллярных ядер заднего гипоталамуса, а также до 90% норадренергических клеток синего пятна и холинергических базальных ядер переднего мозга, почти не затрагивая окружающих клеток. При этом оказалось, что одновременное разрушение одной, двух и даже трех активирующих систем у одних и тех же животных приводит через 20 дней лишь к минимальным изменениям цикла сон–бодрствование. Главным из этих изменений является двукратное снижение представленности бодрствования при переходе от светлого к темному периоду суток и быстрого сна – в светлое время суток. Предполагается, что другие восходящие активирующие системы, а их насчитывается уже десяток (Ковальзон, 2011а,б; Петров, Гиниатуллин, 2012), принимают на себя выпадающие функции и компенсируют потерю разрушенных

токсинам клеток. Однако возможны и альтернативные точки зрения; так что, по сути, эти эффекты остаются пока неизученными (Ковальзон, 2013а,б).

Резюмируя, можно отметить, что мышинная МФТП-модель паркинсонизма, по-видимому, вполне адекватная для изучения специфических *моторных* симптомов БП, может быть лишь с осторожностью применена для исследования нарушений *цикла бодрствование–сон* при БП. К такому выводу в последнее время приходят и другие авторы (Пастухов, 2013; Fifel et al., 2013; Le et al., 2014; Lima, 2012), так как до сих пор не получено ни одной нейротоксической модели досимптомной стадии болезни Паркинсона с нарушением сна.

5. Болезнь Паркинсона и нарколепсия

Возникает впечатление, что в комплексе нарушений сна при БП участвуют и какие-то другие системы, кроме ДА. В этой связи внимание исследователей привлекло заболевание нарколепсией, поскольку в целом нарушения сна при БП весьма напоминают таковые при нарколепсии, особенно так называемой «нарколепсии без катаlepsии» (табл. 2). Нарколепсия – значительно более редкое, чем БП, аутоиммунное заболевание неизвестной этиологии, механизмы которого были полностью раскрыты в 1998–2001 гг., после описания орексин/гипокретиновой системы мозга (Ковальзон, 2011а; Bonnavion, de Lecea, 2010; De la Herrán-Arita et al., 2011; Mignot, 2009). Именно эта медиаторная система оказывается разрушенной *полностью* у больных с типичной формой нарколепсии (т.е. с *катаlepsией*), у которых уровень орексина в ликворе падает ниже уровня чувствительности метода его определения, и *частично* – у больных с нарколепсией *без катаlepsии*, у которых уровень орексина определяется, но оказывается значительно ниже нормы.

Поэтому сразу же после открытия орексиновой системы возникло предположение о ее разрушении и при БП (Arnulf et al., 2000). Эту гипотезу удалось подтвердить лишь в 2007 г., когда две независимых группы неврологов – европейская и американская – обнаружили значительную дегенерацию орексиновых нейронов в мозге пациентов с БП при посмертном исследовании (Fronczek et al., 2007, 2008; Thannickal et al., 2007, 2008). Более того, как было показано группой Джерома Сигела (Thannickal et al., 2007), БП сопровождается разрушением также и меланинергической (МКГ) системы головного мозга, функционально реципрокной по отношению к орексин/гипокретиновой (Tortorolo et al., 2011), которая остается незатронутой у больных нарколепсией. При этом стадия заболевания оказалась связанной со степенью разрушения именно *орексиновых и МКГ-нейронов*, а не ДА-нейронов (рис. 4). Последние, видимо, лишь опосредуют моторные нарушения, вызванные разрушением орексиновой системы (Nakamura et al., 2000). Эти данные, революционные для понимания природы БП, были вначале встречены «в штыки» группой крупных европейских неврологов (Baumann et al., 2008), но в настоящее время являются общепризнанными (Bassetti et al., 2011; Wienecke et al., 2012).

Сравнение некоторых характеристик БП и нарколепсии

Характеристики	Болезнь Паркинсона	Нарколепсия
Природа	Нейродегенеративная	Аутоиммунная
Повреждающий фактор	Неизвестен, предположительно – экзотоксической, бактериальной или вирусной природы	Неизвестен; предположительно – предшествующая стрептококковая или вирусная инфекция
Распространенность	Довольно частая (150-200 случаев на 100 тыс. населения)	Редкая (в Европе 20-40 случаев на 100 тыс. населения)
Локализация разрушений в головном мозге	В начале заболевания – моторное ядро продолговатого мозга и обонятельные ядра переднего мозга, в дальнейшем – ДА SNpc/VTA система, ядра гипоталамуса (включая орексин/гипокретиновую и МКГ системы) и РФ ствола различной нейрохимической природы и в завершение болезни – ассоциативные зоны неокортекса	Исключительно орексин-гипокретиновая система головного мозга
Степень поражений	Для ДА системы – тотальная или субтотальная, для прочих, включая орексин/гипокретиновую и МКГ системы – значительная	Тотальная или субтотальная для орексин/гипокретиновой системы
Ограниченность поражений	Цитоморфологическая (наличие/отсутствие толстой миелиновой оболочки)	Нейрохимическая (синтез/выделение орексин/гипокретины)
Возраст, когда обычно появляются первые симптомы	После 40 лет	Обычно – после 20 лет, но бывает и в детском возрасте
Течение заболевания	Непрерывно прогрессирующее вплоть до полной инвалидизации	Возможно прогрессирование в течение первых 20-30 лет. Несмотря на некоторые ограничения и трудности, больной сохраняет возможность себя обслуживать и участвовать в социальной жизни
Лечение	Специфическое отсутствует. Применяется симптоматическое. Разрабатывается нейропротекторное	Специфическое разрабатывается (стадия клинических испытаний). Пока применяется симптоматическое
Нарушения цикла бодрствование–сон		
Катаплексия	Не встречается	Часто встречающаяся резкая утрата мышечного тонуса, обычно в ответ на положительные или отрицательные эмоции. По ее наличию или отсутствию нарколепсию делят на нарколепсию с катаплексией и без катаплексии

Капаплексия пробуждения и засыпания («сонный паралич»)	Не встречается, может быть спутана с гипо/акинезией «off»-периода	Невозможность пошевелиться при пробуждении или засыпании
Дневная сонливость	Часто сильная. «Атаки» сна, больной может засыпать даже во время активной деятельности (за рулем, при приготовлении пищи)	Сильная, приводящая к императивным засыпаниям (возникновению которых больной не может сопротивляться) даже в условиях активной деятельности (на работе, за рулем)
Нарушение ночного сна	Фрагментация сна. Снижение общего времени сна	Фрагментация сна
RBD	Встречается часто	Встречается изредка
Галлюцинации	Встречаются в 1/3 случаев, возникновение связывают с приемом агонистов дофаминовых рецепторов, являются прогностическим признаком развития психозов	Гипнагогические (при засыпании) и гипнопампические (при пробуждении). Отличны по сюжету от галлюцинаций при психозах. При нарколепсии не бывает психозов
При ночном полисомнографическом исследовании	Фрагментация сна, иногда трудности с засыпанием	Фрагментация сна, быстрое засыпание, сниженная латенция к парадоксальному сну
При дневном проведении множественного теста латенции ко сну (MSLT)	Встречаются пациенты с развитием быстрого сна в первые 15 минут в двух и более случаях и сниженной латенцией ко сну	Из 4 дневных укладываний в постель минимум 2 начинаются с фаз быстрого сна, среднее время засыпания менее 8 минут

6. Проблема избыточной дневной сонливости (EDS) при болезни Паркинсона

Как указывалось выше, одним из наиболее ранних маркеров БП является дневная сонливость (Силькис, 2009; Iranzo, 2011; Paus et al., 2003; Shpirer et al., 2007). Кажется очевидным, что дневная сонливость должна быть обусловлена предшествующим нарушением ночного сна, однако далеко не все работы по изучению связи этих двух феноменов при БП приводят к подобному выводу. Не было обнаружено корреляции степени сонливости (у предварительно отобранных пациентов с избыточной дневной сонливостью) с качеством предшествующего ночного сна и выраженностью его нарушений (продолжительностью сна, эффективностью сна, индексами активаций, апноэ-гипопноэ и периодических движений конечностей) (Arnulf et al., 2002). Более того, был обнаружен парадоксальный факт: по данным множественного теста латенции ко сну, бóльшая сонливость днем была ассоциирована с *более высокой* продолжительностью и эффективностью сна предшествующей ночью, а также с меньшей представленностью 1 стадии и меньшим латентным периодом ночного сна (Rye et al., 2000). То есть те пациенты, которые лучше спали ночью, имели большую сонливость (быстрее засыпали) на следующий день.

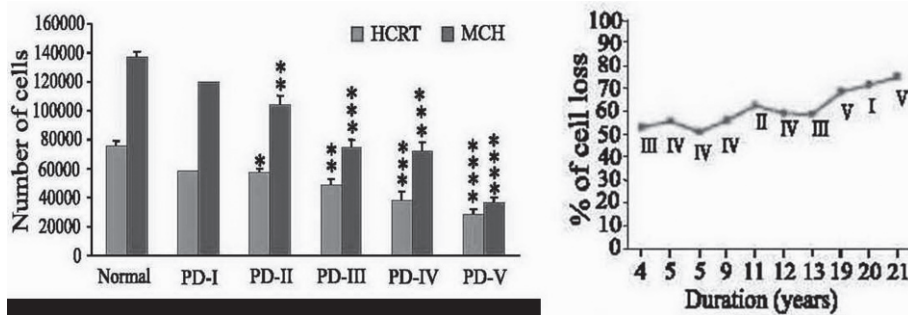


Рис. 4. Слева: количество орексин/гипокретиновых (HCRT, серые столбики) и МКГ (MCH, черные столбики) нейронов (по оси ординат – number of cells) в гипоталамусе здорового человека (Normal) и пациентов с болезнью Паркинсона (PD) I–V стадий (по оси абсцисс); * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$ по сравнению с нормой (критерий Стьюдента). Видно, что представленность нервных клеток прогрессивно снижается по мере нарастания тяжести заболевания. Справа: процент потери нейронов (по оси ординат – % of cell loss), пигментированных нейромеланином (предположительно дофаминергических), в гипоталамусе пациентов с БП. По оси абсцисс: длительность заболевания в годах (Duration – years). Римские цифры – стадия заболевания. Видно, что степень потери связана с длительностью заболевания, но не с его тяжестью (Thannickal et al., 2007), печатается с разрешения

Если дневная сонливость при БП обусловлена не нарушениями сна предшествующей ночью, то тогда чем? Напрашивается предположение о «первичном» характере дневной сонливости при БП, связанном с разрушением двух, по крайней мере, систем восходящей активации: ДА и орексинергической. Парадоксальным образом, однако, прием дофаминергических препаратов (предшественника дофамина L-DOPA и агонистов рецепторов дофамина), применяемый для лечения БП, не снимает, а значительно усиливает (или даже вызывает) дневную сонливость.

Как известно, существует два подсемейства рецепторов ДА. К первому относятся рецепторы D1 и D5, а ко второму – D2, D3 и D4. Показано, что стимуляция рецепторов D1 усиливает бодрствование и подавляет сон, а стимуляция рецепторов D2 вызывает двоякий эффект: малые дозы вызывают подавление бодрствования и увеличение представленности медленного и быстрого сна за счет преимущественной активации *пресинаптических* ауторецепторов дофамина. Большие же дозы вызывают обратный эффект, аналогичный действию D1-агонистов, за счет преимущественной активации *постсинаптических* D2-рецепторов. Антагонисты обоих типов рецепторов увеличивают представленность медленного сна и подавляют бодрствование. По некоторым данным, агонисты D3-рецепторов оказывают «снотворный» эффект на людей и лабораторных животных (Monti, Monti, 2007).

При создании *повышенного* уровня внеклеточного дофамина (путем нокаутирования мышей по гену транспортера обратного захвата дофамина) в гиппокампе возникают разряды, похожие на возникающие во время парадоксального сна без развития мышечной атонии. Эти разряды исчезают при введении антагониста дофаминовых D2-рецепторов – галоперидола. При значительном *снижении* содержания дофамина (нокаутирование того же гена + введение ингибитора синтеза дофамина) у мыши полностью исчезает фаза парадоксального сна, а в гиппокампе возникают медленные волны; этот эффект устраняется D2-агонистами, а D1-агонисты на него не влияют (Dzirasa et al., 2006).

С одной стороны, прием подобранных доз дофаминергических препаратов у пациентов с БП приводит к нормализации ночного сна за счет подавления ночной двигательной симптоматики (невозможности повернуться в кровати, ночной ригидности, ночного тремора). Однако клинические исследования показывают, что все дофаминергические препараты вызывают повышенную дневную сонливость, хотя наибольший эффект – у агониста D3-рецепторов прамипексола. Вероятно, терапевтические дозы препаратов соответствуют малым дозам при физиологических экспериментах. Прием агонистов дофаминовых рецепторов приводит также и к возникновению внезапных дневных засыпаний («атак» сна). Внезапные дневные засыпания развиваются, как правило, на пике концентрации этих препаратов в крови (Paus et al., 2003).

Возникло подозрение, что некоторые нарушения сна, традиционно связываемые с БП, могут оказаться последствиями не только и не столько самого заболевания, сколько его фармакологического лечения! Действительно, селективные агонисты дофаминовых рецепторов первого типа увеличивают время бодрствования и снижают время сна. Агонисты дофаминовых рецепторов второго (апоморфин, бромокриптин, квинпирол), третьего (прамипексол) и четвертого типов оказывают двойные дозозависимые эффекты. При введении в малых дозах, как уже говорилось выше, они снижают время бодрствования и увеличивают время медленного и быстрого (парадоксального) сна, а при введении в больших дозах действуют противоположным образом (Fernandez, 2008).

Теоретические выкладки показывают, что снижение дозы ДА препаратов в сочетании с приемом антагонистов рецепторов аденозина A1 и A2 (например кофеина) должно приводить к снижению дневной сонливости без усиления двигательных нарушений (Силькис, 2009). Механизм общеизвестного активирующего действия пищевых метилксантинов (кофеина из кофе, теофиллина из чая и теобромина из какао) связан с блокадой рецепторов аденозина. Это, в свою очередь, снимает тормозящий эффект эндогенного аденозина, поступающего в межклеточную жидкость в результате обычной метаболической деятельности нейронов и глии, на гистаминергический и орексинергический «центры бодрствования». Кроме того, антагонисты аденозина обладают и дофаминомиметической активностью на кортикостриатные входы, ослабляя двигательные нарушения, вызванные недостаточностью ДА при БП (Силькис, 2009).

Как указывалось выше (см. табл. 2), дневная сонливость характерна и для больных нарколепсией, что позволило выдвинуть гипотезу о нарколептоподобном (т.е. орексинергическом) механизме сонливости при паркинсонизме (Гусев и др., 2010; Силькис, 2009; Trenkwalder, Arnulf, 2011).

7. Нарушение поведения в фазе быстрого сна (RBD) при болезни Паркинсона

Другим ранним парасомническим нарушением при БП, как указывалось выше, является RBD (Гусев и др., 2010; Литвиненко и др., 2011) – явление, в определенной степени зеркальное по отношению к нарколептической катаlepsии. Последняя

характеризуется неадекватными выключениями мышечного тонуса (прямо из бодрствования, а не ближе к концу каждого цикла сна, при переходе от медленного сна к фазе быстрого сна). RBD же, наоборот, характеризуются неадекватными включениями мышечного тонуса и произвольных движений во время быстрого сна, когда они должны быть подавлены (Luppi et al., 2011). Двигательная и поведенческая активность в фазе парадоксального (быстрого) сна была обнаружена в середине шестидесятых годов прошлого века в экспериментах на кошках с электролитическими разрушениями в области синего пятна (LC) крупнейшим сомнологом Мишелем Жуве и его сотрудниками (Jouvet, Delorme, 1965) и названа ими «онейрическим поведением». Недели через три после операции, в течение которых отмечалось полное выпадение периодов парадоксального сна, кошки, не просыпаясь, начинали демонстрировать галлюцинаторное поведение – нападение на воображаемого врага – в те периоды, когда должен был наступать парадоксальный сон. Предварительно в лаборатории М. Жуве было показано, что *отдельные* проявления парадоксального сна (мышечное расслабление и подергивания, быстрые движения глаз, характерные изменения электрической активности мозга и пр.) связаны с активностью *отдельных*, пространственно разделенных групп нервных клеток в «центре быстрого сна». Эти скопления нервных клеток находятся, как они обнаружили, в наиболее древних, задних отделах мозга – в области варолиева моста, где располагается в том числе и синее (голубое) пятно. Это послужило основой для первоначально выдвинутой М. Жуве «норадренергической» гипотезы парадоксального сна.

В дальнейшем, однако, многочисленными работами различных лабораторий было показано, что так называемый «центр быстрого сна» расположен в латеродорзальной/педункулопонтинной области покрышки моста (LDT/PPT) и близлежащих отделах, и выделяет в качестве медиатора (передатчика) молекулы глутамата и ацетилхолина. Известно, что в области моста и в продолговатом мозге есть особая группа нейронов, посылающих свои длинные отростки – аксоны – вниз, в спинной мозг, для осуществления функции *торможения* произвольных движений. Основным тормозным медиатором этой системы является аминокислота глицин. Эти нейроны почти не разряжаются, когда человек или животное двигается, усиливают частоту разрядов в покое и сне и максимально активны – в быстром сне, когда возникают сновидения и мышечная деятельность полностью подавлена (Ковальзон, 2011а,б).

Затем это открытое М. Жуве с сотрудниками явление – появление двигательной и поведенческой активности в парадоксальном сне – было тщательно изучено Эдрианом Моррисоном (Моррисон, 1983; Morrison, 1988; Sanford et al., 2001) на кошках и крысах и названо «парадоксальным сном без атонии». Значительный вклад в изучение этой проблемы был внесен также работами лаборатории Джерома Сигела (Lai et al., 2010). Эти исследования показали, что «парадоксальный сон без атонии» может возникать уже через несколько дней после разрушения, причем существует взаимно однозначное соответствие между локализацией разрушения и демонстрируемым поведением. Наблюдались два типа эффектов: «парадоксальный сон без атонии и без поведения» и «парадоксальный сон без атонии с демонстрацией целенаправленного поведения».

В первом случае возникают необычно сильные подергивания конечностей, но голова кошки остается неподвижной, несмотря на сохранение тонуса мышц затылка, и поведенческие акты не возникают. Это происходит в случае небольших или односторонних разрушений, ограниченных медиальной частью ЛС и прилегающей к ней с медиальной стороны ретикулярной формацией. Такие разрушения затрагивают описанный М. Жуве и его сотрудниками тегмента-ретикулярный проводящий путь, опосредующий, по их предположению, атонию парадоксального сна.

При более обширных разрушениях возникают ориентировочные реакции, движения на полусогнутых лапах и нападения на несуществующие объекты, которые сохраняются на протяжении 2–12 недель, после чего постепенно сменяются менее выраженными эффектами 1-го типа. Особенно ярко атакующие формы поведения в опытах Э. Моррисона были выражены в случае, если разрушения захватывали путь, нисходящий из центрального миндалевидного ядра. Поскольку кошки с такими разрушениями и в бодрствовании демонстрировали повышенную двигательную активность (в открытом поле), Э. Моррисон предположил, что эти разрушения не только устраняют супраспинальное торможение мотонейронов, но и растормаживают так называемый «локомоторный генератор», или «средне-мозговой двигательный центр». Этот «центр» был открыт почти полвека назад отечественными нейрофизиологами Г.Н. Орловским, Ф.В. Севериным и М.Л. Шиком.

В течение двух десятилетий «парадоксальный сон без атонии» не привлекал внимания клиницистов, считаясь чисто лабораторным феноменом. Однако в 1986 г. Карлос Шенк с соавторами впервые описал подобную патологию у пяти пожилых мужчин с серьезными неврологическими нарушениями, назвав ее «REM Behavioral (или Behavior) Disorders» (RBD) (Schenck et al., 1986; Гусев и др., 2010). После этого было опубликовано множество сообщений о различных вариантах RBD при поражениях ствола, возникающих по самым разным причинам: развитии нейродегенеративных и аутоиммунных заболеваний, инсультах, травмах и опухолях. Наконец, в 2007 г. двадцать ведущих специалистов – неврологов и нейрофизиологов США и Германии, объединившись, опубликовали фундаментальный обзор, исчерпывающий (на тот момент) все имеющиеся знания по этому вопросу (Voeve et al., 2007). Проанализировав все, что известно о механизмах генерации быстрого сна на классической модели мозга кошки и значительно более детально изученной модели мозга крысы, авторы попытались экстраполировать эти данные на мозг человека, в котором эти механизмы по понятным причинам изучены гораздо хуже (рис. 5) (Voeve, 2010).

Один из авторов «крысиной» модели регуляции быстрого сна, ученик и преемник Мишеля Жуве, Пьер-Эрве Люппи в недавнем обширном обзоре, написанном им совместно с группой своих сотрудников, пришел к сходному выводу о том, что развитие RBD в этой модели может быть обусловлено двумя причинами. Во-первых, специфическим разрушением небольшой группы глутаматергических «PS-on» нейронов, расположенных в SLD и ответственных за мышечную атонию в парадоксальном (быстром) сне. Во-вторых, специфическим разрушением ГАМК/

глицинергических премотонейронов, локализованных в вентральном гигантоклеточном ядре продолговатого мозга (примерно соответствует MCRF) (Luppi et al., 2011). Характерно, что в этой работе (Luppi et al., 2011) вообще отсутствуют упо-

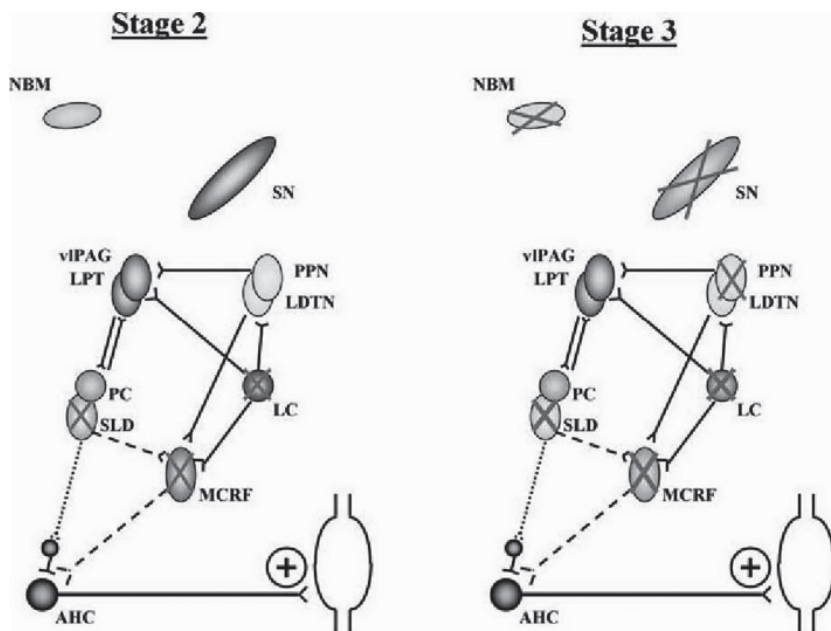


Рис. 5. Схематическое изображение стволовых ядер и связей, имеющих отношение к быстрому сну, движениям и когнитивной деятельности

В соответствии с шестью стадиями Браака (см. рис. 1), последовательное развитие альфа-синуклеиновой патологии и нейродегенерации начинается с продолговатого и обонятельного мозга и заканчивается новой корой. В 1-й стадии (не представлено) поражением затрагиваются двигательные ядра IX/X нервов, промежуточная ретикулярная зона и обонятельная луковица. В стадии 2 (слева) представленность телец Леви в структурах, уже вовлеченных в процесс в стадии 1, увеличивается и, кроме того, вовлекаются каудальные ядра шва, крупноклеточное ядро ретикулярной формации (MCRF), структуры, непосредственно прилежащие к синему пятну (peri-LC), и, возможно, сублатеродорзальное ядро (SLD). Предполагается, что RBD возникают тогда, когда достигается достаточная степень разрушения в этих трех последних ядрах. В стадии 3 (справа) нарастает патология в структурах, вовлеченных в процесс в стадии 2, а также захватываются педункулопонтинные ядра покрышки моста (PPN), черная субстанция (SN) и базальные ядра Мейнерта (NBM). При достижении определенной степени разрушения SN появляются признаки паркинсонизма, а дегенерации NBM – и когнитивные нарушения. В стадиях 4–6 (не представлено) в альфа-синуклеиновую патологию и нейродегенерацию вовлекаются лимбические и неокортикальные структуры. Такая временная последовательность развития патологии объясняет, почему у многих больных с тельцами Леви RBD предшествуют паркинсонизму и деменции.

Сокращения: AHC – anterior horn cells, клетки передних рогов; LC – locus coeruleus, синее пятно; LDTN, laterodorsal tegmental nucleus, латеродорзальное ядро покрышки; LPT – lateral pontine tegmentum, латеральная покрышка моста; MCRF – magnocellular reticular formation, крупноклеточная ретикулярная формация; NBM – nucleus basalis of Meynert, базальное ядро Мейнерта; PC – pre-coeruleus, пре-церулеус; PPN – pedunculopontine nucleus, педункулопонтинное ядро; SLD – sublaterodorsal nucleus, сублатеродорзальное ядро; SN – substantia nigra, черная субстанция; vIPAG – ventrolateral part of the periaqueductal gray matter, вентролатеральная часть околотоводопроводного серого вещества (Boeve, 2010), печатается с разрешения

минания о существовании «локомоторного генератора» и ссылки на фундаментальный обзор Б.Ф. Беве с соавторами (Boeve et al., 2007).

Учитывая важнейшую роль RBD как фактора, предшествующего развитию синуклеопатий у 80% больных, разработаны модели этого нарушения путем разрушения сублатеродорзального ядра моста или гигантоклеточного ретикулярного ядра продолговатого мозга у взрослых кошек, крыс и мышей, а также у ювенильных крыс. А у обезьян-мармозеток системные дозы МФТП, вызывающие небольшие двигательные нарушения в бодрствовании, приводили к появлению мышечного тонуса в быстром сне – предвестнику RBD (Peever et al., 2014).

8. Синдром беспокойных ног (RLS) при болезни Паркинсона

Еще одним интересным феноменом, возникающим, вероятно, вследствие недостатка дофамина, является синдром беспокойных ног (СБН; restless legs syndrome, RLS). Эта патология является сенсомоторным нарушением. Пациенты жалуются на неприятные (жжение, покалывание, «бегание мушек»), а иногда и болезненные ощущения, чаще развивающиеся в ногах, но могут быть также вовлечены руки и туловище. Эти ощущения чаще возникают вечером и ночью во время расслабленного бодрствования, отхода ко сну, и уменьшаются или практически исчезают при движении (Montplaisir et al., 2011).

При СБН пациент испытывает трудности при засыпании, связанные с возникновением неприятных ощущений при отходе ко сну, и необходимостью двигать ногами или даже вставать, чтоб пройтись. И даже когда удастся заснуть – сон неполноценен, так как синдрому беспокойных ног всегда сопутствуют периодические движения конечностей. Периодические движения конечностей – это непроизвольные движения, как правило, ногой, варьирующие от движения большого пальца до движения всей ногой, приводящие к частым активациям и пробуждениям.

Почему же СБН связывают с патологией ДА-системы? Конкретной патологии дофаминергической системы при СБН не обнаружено, есть только косвенные данные. Была показана гиперсенсбилизация пациентов к леводопе, которая в большей степени, чем в контрольной группе, снижала уровень пролактина и увеличивала уровень гормона роста (что является одним из действий дофамина) (García-Bogreguero et al., 2004). При СБН концентрация метаболитов дофамина ниже, чем в контроле, кроме того, она ниже вечером, чем утром (Montplaisir et al., 2011). Из пяти генов, участвующих в наследовании СБН, минимум один связан с дофаминергической передачей.

СБН чаще возникает при недостатке железа (в том числе у беременных) и при ряде неврологических патологий (в том числе БП) (Early et al., 2006). Доказано, что снижение уровня железа приводит к СБН, а недостаток железа может приводить к нарушению обмена дофамина. В пользу этого говорят следующие факты: железо распространено в головном мозге неравномерно, больше всего его в дофаминергических областях, в частности, в стриатуме и черной субстанции; железо является

ко-фактором тирозин-гидроксилазы (фермента, необходимого для синтеза дофамина) и входит в состав D2-рецепторов (Montplaisir et al., 2011). О важной роли дофамина в развитии СБН неопровержимо свидетельствует то, что эта проблема полностью уходит при приеме агонистов дофаминовых рецепторов.

9. Заключение

БП, как, быть может, никакое другое заболевание ЦНС, характеризуется необычайно обширным спектром нарушений сна, среди которых есть как неспецифические, свойственные и многим другим заболеваниям (избыточная дневная сонливость, частые ночные пробуждения, апноэ во сне), так и специфические, присущие главным образом именно этой патологии (RBD). Поэтому БП, будучи трагедией для больных, получающих это неизлечимое заболевание по неизвестной причине, представляет в то же время исключительный интерес для науки. БП – уникальный эксперимент, поставленный самой природой, раскрывающий роль различных нейрохимических систем головного мозга в регуляции фундаментальных механизмов жизнеобеспечения, таких как цикл бодрствование–сон. Накопление α -синуклеина, потеря дофамин-содержащих, орексин-содержащих и МКГ-содержащих нейронов межзачаточного и среднего мозга приводит к снижению общего уровня восходящей активации, нарушению контроля внутренней цикличности работы мозга, подавлению быстрого сна и снижению его качества (Rothman, Mattson, 2012). Особенно важно, что некоторые из нарушений цикла бодрствование–сон наступают задолго до появления моторных симптомов БП и, таким образом, могут служить довольно надежным ранним предиктором этого заболевания.

Однако, несмотря на значительное количество экспериментальных моделей, лишь в нескольких работах описаны нарушения сна, сходные с БП и паркинсонизмом вообще, – в первую очередь, подавление быстрого сна и нарушение его регуляции. Это и неудивительно, если принять во внимание, что до настоящего времени используются исключительно модели с нейротоксическими, нейрохирургическими и нейрогенетическими разрушениями лишь ДА-системы мозга, в то время как в формирование патологии сна при БП вовлечен и ряд других нейрохимических систем, в первую очередь – орексинергическая и меланинергическая, а также, возможно, и глутаматергическая.

Таким образом, представленные обширные клинические и экспериментальные данные относительно нарушений цикла бодрствование–сон при БП и предположительно вовлеченных в эти процессы физиологических и биохимических механизмов указывают на необходимость более детального их изучения и разработки для этого новых экспериментальных моделей. Весьма перспективными, в частности, представляются такие недавно предложенные модели паркинсонизма у мышей, как, например, полученные путем системных введений нарастающих доз токсина МФТП (Goldberg et al., 2011) или создания трансгенной линии с избыточной экспрессией человеческого α -синуклеина (Kudo et al., 2011).

Литература

- Гусев Е.И., Гехт А.Б., Попов Г.Р. и др. Болезнь Паркинсона: клиника, диагностика и лечение // Нейродегенеративные заболевания. Фундаментальные и прикладные аспекты. М.: Наука, 2010. С. 52-86.
- Жуве М. Замок снов (пер. с франц. В.М. Ковальзона, серия Наука для всех). Фрязино: Век-2, 2006. 317 с.
- Жуве М. Похититель снов (пер. с франц. В.М. Ковальзона, В.В. Незговоровой, серия Самое время!). М.: Время, 2008. 314 с.
- Ковальзон В.М. Основы сомнологии. Физиология и нейрохимия цикла бодрствование–сон. М.: Бинном. Лаборатория знаний, 2011а. 240 с.
- Ковальзон В.М. Центральные механизмы регуляции цикла бодрствование–сон // Физиология человека. 2011б. Т. 37. №4. С. 124-134.
- Ковальзон В.М. Мозг и сон: от нейронов – к молекулам // ЖВНД. 2013а. Т. 73. № 1. С. 48-70.
- Ковальзон В.М. Роль гистаминергической системы головного мозга в регуляции цикла бодрствование–сон // Физиология человека. 2013б. Т. 39. № 7. С. 13-23.
- Ковальзон В.М., Цибульский В.Л. Депривация парадоксального сна, стресс и эмоциональность у крыс // ЖВНД. 1985. Т. 35. № 1. С.117-124.
- Литвиненко И.В., Красаков И.В., Тихомирова О.В. Нарушения сна при болезни Паркинсона: патофизиологические механизмы, клинические варианты и направления коррекции // Болезнь Паркинсона и расстройства движений. М.: НЦН РАМН, 2011. С. 92-98.
- Манолов А.И., Долгих В.В., Украинцева Ю.В. и др. Изменение двигательной активности и цикла бодрствование–сон на МФТП-модели болезни Паркинсона у мышей // Рос. физиол. журнал. 2014. Т. 100. № 11. С. 1252-1260.
- Моррисон Э.Р. Окно в спящий мозг // В мире науки. 1983. № 6. С. 62-71.
- Осинов Ю.С. Предисловие // Мозг. Фундаментальные и прикладные проблемы. М.: Наука, 2010. С. 3-5.
- Пастухов Ю.Ф. Изменения характеристик парадоксального сна – ранний признак болезни Паркинсона // ЖВНД. Т. 73. № 1. С. 75-85.
- Пастухов Ю.Ф., Чеснокова А.Ю. Альфа-синуклеин в патогенезе болезни Паркинсона и других нейродегенеративных заболеваний // Нейродегенеративные заболевания. Фундаментальные и прикладные аспекты. М.: Наука, 2010а. С. 189-211.
- Пастухов Ю.Ф., Чеснокова А.Ю., Якимчук А.А. и др. Изменения сна при дегенерации нейронов черной субстанции, вызванной ингибитором протеасомы лактацистином // Рос. физиол. журнал. 2010б. Т. 96. № 12. С. 1190-1202.
- Петров А.М., Гиниатуллин А.Р. Нейробиология сна: современный взгляд (учебное пособие). Казань: КГМУ, 2012.
- Сакс О. Пробуждения. М.: Астрель, 2013.
- Силькис И.Г. Гипотетический механизм взаимовлияний нейромодуляторов при парадоксальном сне // Нейрохимия. 2006. Т. 23. № 4. С. 283-293.
- Силькис И.Г. Поиск подходов к коррекции дневной сонливости, вызванной дофаминергическими препаратами при лечении болезни Паркинсона: нейрохимические аспекты // Нейрохимия. 2009. Т. 26. № 3. С. 253-264.
- Угрюмов М.В. Регуляторные функции мозга: от генома до поведения // Мозг. Фундаментальные и прикладные проблемы. М.: Наука, 2010а. С. 29-49.
- Угрюмов М.В. Традиционные и новые представления о патогенезе, диагностике и лечении нейродегенеративных заболеваний // Нейродегенеративные заболевания. Фундаментальные и прикладные аспекты. М.: Наука, 2010б. С. 8-35.
- Almirall H., Pigarev I.N., de la Calzada M.D. et al. Nocturnal sleep structure and temperature slope in MPTP treated monkeys // J. Neural. Transm. 1999. Vol. 106. P. 1125-1134.
- Arnulf I., Bonnet A.-M., Damier P. et al. Hallucinations, REM sleep, and Parkinson's disease: a medical hypothesis // Neurology. 2000. Vol. 55. P. 281-288.
- Arnulf I., Konofal E., Merino-Andreu M. et al. Parkinson's disease and sleepiness: An integral part of PD // Neurology. 2002. Vol. 58. № 7. P. 1019-1024.

- Bassetti C.L., Baumann C.R., Scammell T.E.* (eds.). *Narcolepsy: Pathophysiology, Diagnosis, and Treatment*. Berlin: Springer, 2011.
- Baumann C.R., Scammell T.E., Bassetti C.L.* Parkinson's disease, sleepiness and hypocretin/orexin // *Brain*. 2008. Vol. 131. P. e91.
- Bertolucci P.H., Andrade L.A., Lima J.G., Carlini E.A.* Total sleep deprivation and Parkinson disease // *Arq. Neuropsiquiatr.* 1987. Vol. 45. № 3. P. 224-230.
- Blanco-Centurion C., Gerashchenko D., Shiromani P.J.* Effects of saporin-induced lesions of three arousal populations on daily levels of sleep and wake // *J. Neurosci.* Vol. 27. № 51. P. 14041-14048.
- Boeve B.F.* REM Sleep Behavior Disorder: Updated review of the core features, the RBD-neurodegenerative disease association, evolving concepts, controversies, and future directions // *Ann. NY Acad. Sci.* 2010. Vol. 1184. № 1. P. 15-54.
- Boeve B.F., Silber M.H., Saper C.B. et al.* Pathophysiology of REM sleep behaviour disorder and relevance to neurodegenerative disease // *Brain*. 2007. Vol. 130. P. 2770-2788.
- Bonnavion P., de Lecea L.* Hypocretins in the control of sleep and wakefulness // *Curr. Neurol. Neurosci. Rep.* 2010. Vol. 10. P. 174-179.
- Braak H., Ghebremedhin E., Rub U. et al.* Stages in the development of Parkinson's disease related pathology // *Cell Tissue. Res.* 2004. Vol. 318. P. 121-134.
- Dahan L., Astier B., Vautrelle N. et al.* Prominent burst firing of dopaminergic neurons in the ventral tegmental area during paradoxical sleep // *Neuropsychopharmacology*. 2007. Vol. 32. P. 1232-1241.
- Datta S.* Cellular and chemical neuroscience of mammalian sleep // *Sleep Med.* 2010. Vol. 11. P. 431-440.
- Datta S., MacLean R.R.* Neurobiological mechanisms for the regulation of mammalian sleep-wake behavior: Reinterpretation of historical evidence and inclusion of contemporary cellular and molecular evidence // *Neurosci. Biobehav. Rev.* 2007. Vol.31. P. 775-824.
- De Cock V.C., Vidailhet M., Leu S. et al.* Restoration of normal motor control in Parkinson's disease during REM sleep // *Brain*. 2007. Vol. 130. № 2. P. 450-456.
- De Cock V.C., Vidailhet M., Arnulf I.* Sleep disturbances in patients with parkinsonism // *Nat. Clin. Pract. Neurol.* 2008. Vol. 4. № 5. P. 254-266.
- De la Herrán-Arita A.K., Guerra-Crespo M., Drucker-Colín R.* Narcolepsy and orexins: an example of progress in sleep research // *Front. Neurol.* 2011. Vol. 2. Article 26.
- Dzirasa K., Ribeiro S., Costa R. et al.* Dopaminergic Control of Sleep–Wake States // *J. Neurosci.* 2006. Vol. 26. № 41. P. 10577-10589.
- Earley C.J., Barker B.P., Horska A., Allen R.P.* MRI-determined regional brain iron concentrations in early- and late-onset restless legs syndrome // *Sleep Med.* 2006. Vol. 7. № 5. P. 458-461.
- Factor S.A., McAlarney T., Sanchez-Ramos J.R., Wiener W.J.* Sleep disorders and sleep effect in Parkinson's disease // *Mov. Dis.* 1990. Vol. 5. № 4. P. 280-285.
- Fernandez H.H.* What we have learned about sleep disorders and psychosis after nearly two centuries of Parkinson's disease // *CNS Spectr.* 2008. Vol. 13. № 3. Suppl. 4. P. 34-35.
- Fifel K., Dkhissi-Benyahya O., Cooper H.M.* Lack of long-term changes in circadian, locomotor, and cognitive functions in acute and chronic MPTP (1-methyl-4-phenyl-1,2,3,7-tetrahydropyridine) mouse models of Parkinson's disease // *Chronobiol. Int.* 2013. Vol. 30. № 7. P. 741-755.
- Fronczek R., Overeem S., Lee S.Y.Y. et al.* Hypocretin (orexin) loss in Parkinson's disease // *Brain*. 2007. Vol. 130. P. 1577-1585.
- Fronczek R., Overeem S., Lee S.Y.Y. et al.* Hypocretin (orexin) loss and sleep disturbances in Parkinson's disease // *Brain*. 2008. Vol. 131. P. e88.
- Garcia-Borreguero D., Larrosa O., Granizo J.J. et al.* Circadian variation in neuroendocrine response to L-Dopa in patients with restless legs syndrome // *Sleep*. 2004. Vol. 27. № 4. P. 669-673.
- Giovanni A., Steber B.A., Heikkila R.E., Sonsalla P.K.* Studies on species sensitivity to the dopaminergic neurotoxin 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. Part 1: Systemic administration // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1994. Vol. 270. № 3. P. 1000-1007.
- Goldberg N.R., Haack A.K., Lim N.S. et al.* Dopaminergic and behavioral correlates of progressive lesioning of the nigrostriatal pathway with 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine // *Neuroscience*. 2011. Vol. 180. P. 256-271.
- Iranzo A.* Sleep-wake changes in the premotor stage of Parkinson disease // *J. Neurol. Sci.* 2011. Vol. 310. P. 283-285.

- Jouvet M., Delorme F. Locus coeruleus et sommeil paradoxal // C. R. Soc. Biol. 1965. Vol. 159. P. 895-899.
- Kovacs K.J. c-Fos as a transcription factor: a stressful (re)view from a functional map // Neurochem. Int. 1998. Vol. 33. P. 287-297.
- Kovalzon V.M., Tsibulsky V.L. REM-sleep deprivation, stress and emotional behavior in rats // Behav. Brain Res. 1984. Vol. 14. № 3. P. 235-245.
- Kudo T., Loh D.H., Truong D., Wu Y., Colwell C.S. Circadian dysfunction in a mouse model of Parkinson's disease // Exp. Neurol. 2011. Vol. 232. P. 66-75.
- Lai Y.-Y., Kodama T., Schenkel E., Siegel J.M. Behavioral response and transmitter release during atonia elicited by medial medullary stimulation // J. Neurophysiol. 2010. Vol. 104. P. 2024-2033.
- Laloux C., Derambure P., Jacquesson J.-M. et al. The effects of serotonergic, noradrenergic, cholinergic and dopaminergic drugs on vigilance states in MPTP-treated mice // Brain Res. 2007. Vol. 1161. P. 79-87.
- Laloux C., Derambure P., Kreisler A. et al. MPTP-treated mice: long-lasting loss of nigral TH-IR neurons but not paradoxical sleep alterations // Exp. Brain Res. 2008. Vol. 186. P. 635-642.
- Le W., Sayana P., Jankovic J. Animal models of Parkinson's disease: A gateway to therapeutics? // Neurotherapeutics. 2014. Vol. 11. P. 92-110.
- Léger L., Sapin E., Goutagny R. et al. Dopaminergic neurons expressing Fos during waking and paradoxical sleep in the rat // J. Chem. Neuroanat. 2010. Vol. 39. № 4. P. 262-271.
- Lena I., Deschaux O., Muffat S. et al. Dreaming and schizophrenia have the same neurochemical background // J. Sleep Res. 2004. Vol. 13. Suppl. 1. P. 141.
- Lena I., Parrot S., Deschaux O. et al. Variations in extracellular levels of dopamine, noradrenaline, glutamate, and aspartate across the sleep-wake cycle in the medial prefrontal cortex and nucleus accumbens of freely moving rats // J. Neurosci. Res. 2005. Vol. 81. P. 891-899.
- Lima M.M.S. Sleep disturbances in Parkinson's disease: The contribution of dopamine in REM sleep regulation // Sleep Medicine Rev. 2012. Vol. 17. № 5. P. 377-375.
- Lima M.M.S., Andersen M.L., Reksidler A.B. et al. The role of the substantia nigra pars compacta in regulating sleep patterns in rats // PLoS ONE. 2007. Vol. 2. № 6. P. e513.
- Luppi P.-H., Clément O., Sapin E. et al. The neuronal network responsible for paradoxical sleep and its dysfunctions causing narcolepsy and rapid eye movement (REM) behavior disorder // Sleep Medicine Rev. 2011. Vol. 15. № 3. P. 153-163.
- Maloney K.J., Mainville L., Jones B.E. c-Fos expression in dopaminergic and GABAergic neurons of the ventral mesencephalic tegmentum after paradoxical sleep deprivation and recovery // Eur. J. Neurosci. 2002. Vol. 15. P. 774-778.
- Mehta S.H., Morgan J.C., Sethi K.D. Sleep disorders associated with Parkinson's disease: role of dopamine, epidemiology, and clinical scales of assessment // CNS Spectr. 2008. Vol. 13. № 3. Suppl. 4. P. 6-11.
- Mignot E. Narcolepsy as a model for brain autoimmune diseases // Front. Neurosci. 2009. Vol. 3. № 3. P. 426-427.
- Miller J.D., Farber J., Gatz P. et al. Activity of mesencephalic dopamine and non-dopamine neurons across stages of sleep and waking in the rat // Brain Res. 1983. Vol. 273. P. 133-141.
- Monaca C., Laloux C., Jacquesson J.-M. et al. Vigilance states in a parkinsonian model, the MPTP mouse // Eur. J. Neurosci. 2004. Vol. 20. № 9. P. 2474-2478.
- Monti J.M., Monti D. The involvement of dopamine in the modulation of sleep and waking // Sleep Med. Rev. 2007. Vol. 11. P. 113-133.
- Monti J.M., Jantos H. The roles of dopamine and serotonin, and of their receptors, in regulating sleep and waking // Prog. Brain Res. 2008. Vol. 172. P. 625-646.
- Montplaisir J., Allen R.P., Walters A., Ferini-Strambi L. Restless legs syndrome and periodic limb movements during sleep // Principles and Practice in Sleep Medicine, 5th ed. Eds. M.H. Kryger, T. Roth, W.C. Dement. St. Louis, Missouri: Elsevier, 2011. P. 1026-1037.
- Morrison A.R. Paradoxical sleep without atonia // Arch. Ital. Biol. 1988. Vol. 126. P. 275-289.
- Nakamura T., Uramura K., Nambu T. et al. Orexin-induced hyperlocomotion and stereotypy are mediated by the dopaminergic system // Brain Res. 2000. Vol. 873. P. 181-187.
- Pace-Schott E.F., Hobson J.A. The neurobiology of sleep: genetics, cellular physiology and subcortical networks // Nat. Rev. Neurosci. 2002. Vol. 3. P. 591-605.

- Paus S., Brecht H.M., Köster J. et al.* Sleep attacks, daytime sleepiness, and dopamine agonists in Parkinson's disease // *Mov. Disord.* 2003. Vol. 18. № 6. P. 659-667.
- Peever J., Luppi P.-H., Montplaisir J.* Breakdown in REM sleep circuitry underlies REM sleep behavior disorder // *Trends in Neurosciences.* 2014. Vol. 37. № 5. P. 279-288.
- Postuma R.B., Gagnon J.-F., Vendette M., Montplaisir J.Y.* Idiopathic REM sleep behavior disorder in the transition to degenerative disease // *Movement Disorders.* 2009a. Vol. 24. № 15. P. 2225-2232.
- Postuma R.B., Gagnon J.F., Vendette M., Montplaisir J.Y.* Markers of neurodegeneration in idiopathic rapid eye movement sleep behaviour disorder and Parkinson's disease // *Brain.* 2009b. Vol. 132. № 12. P. 3298-3307.
- Rothman S.M., Mattson M.P.* Sleep disturbances in Alzheimer's and Parkinson's diseases // *Neuromol. Med.* 2012. Vol. 14. P. 194-204.
- Rye D.B., Bliwise D.L., Dihenia B., Gurecki P.* Daytime sleepiness in Parkinson's disease // *J. Sleep Res.* 2000. Vol. 9. P. 63-69.
- Sanford L.D., Cheng C.S., Silvestri A.J. et al.* Sleep and behavior in rats with pontine lesions producing REM without atonia // *Sleep Res. Online.* 2001. Vol. 4, № 1. P. 1-5.
- Schenck C.H., Bundlie S.R., Ettinger M.G., Mahowald M.W.* Chronic behavioral disorders of human REM sleep: A new category of parasomnia // *Sleep.* 1986. Vol. 9. № 2. P. 293-308.
- Schulte E.C., Winkelmann J.* When Parkinson's disease patients go to sleep: specific sleep disturbances related to Parkinson's disease // *J. Neurol.* 2011. Vol. 258. Suppl. 2. P. S328-S335.
- Shpirer I., Miniowitz A., Klein C. et al.* Excessive daytime sleepiness in patients with Parkinson's disease: A polysomnography study // *Movement Disorders.* 2007. Vol. 21. № 9. P. 1432-1438.
- Solms M.* Freudian dreams today // *Front. Neurosci.* 2009. Vol. 3. № 3. P. 453.
- Steinfels G.F., Heym J., Strecker R.E., Jacobs B.L.* Behavioral correlates of dopaminergic unit activity in freely moving cats // *Brain Res.* 1983. Vol. 258. № 2. P. 217-228.
- Stern M., Roffwarg H., Duvoisin R.* The parkinsonian tremor in sleep // *J. Nerv. Ment. Dis.* 1968. Vol. 147. № 2. P. 202-210.
- Takakusaki K., Saitoh K., Harada H. et al.* Evidence for a role of basal ganglia in the regulation of rapid eye movement sleep by electrical and chemical stimulation for the pedunculopontine tegmental nucleus and the substantia nigra pars reticulata in decerebrate cats // *Neuroscience.* 2004. Vol. 124. P. 207-220.
- Thannickal T.C., Lai Y.-Y., Siegel J.M.* Hypocretin (orexin) cell loss in Parkinson's disease // *Brain.* 2007. Vol. 130. P. 1586-1595.
- Thannickal T.C., Lai Y.-Y., Siegel J.M.* Hypocretin (orexin) and melanin concentrating hormone loss and the symptoms of Parkinson's disease // *Brain.* 2008. Vol. 131. P. e87.
- Tortorolo P., Lagos P., Monti J.M.* Melanin-concentrating hormone: a new sleep factor? // *Front. Neurol.* 2011. Vol. 2. Art. 14.
- Trenkwalder C., Arnulf J.* Parkinsonism // *Principles and Practice in Sleep Medicine*, 5th ed. Eds. M.H. Kryger, T. Roth, W.C. Dement. St. Louis, Missouri: Elsevier, 2011. P. 980-992.
- Trulson M.E., Preussler D.W.* Dopamine-containing ventral tegmental area neurons in freely moving cats: activity during the sleep-waking cycle and effects of stress // *Exp. Neurol.* 1984. Vol. 83. P. 367-377.
- Trulson M.E., Preussler D.W., Howell G.A.* Activity of substantia nigra units across the sleep-waking cycle in freely moving cats // *Neurosci. Lett.* 1981. Vol. 26. № 2. P. 183-188.
- Ugrumov M.V., Khaindrava V.G., Kozina E.A. et al.* Modeling of presymptomatic and symptomatic stages of parkinsonism in mice // *Neurosci.* 2011. Vol. 181. P. 175-188.
- Vendette M., Gagnon J.F., Soucy J.P. et al.* Brain perfusion and markers of neurodegeneration in rapid eye movement sleep behavior disorder // *Mov. Disord.* 2011. Vol. 26. № 9. P. 1717-1724.
- Verhove P.S., Jongsma M.J., Van den Berg R.M. et al.* REM sleep behavior disorder in the marmoset MPTP model of early Parkinson disease // *Sleep.* 2011. Vol. 34. № 8. P. 1119-1125.
- Wienecke M., Werth E., Poryazova R. et al.* Progressive dopamine and hypocretin deficiencies in Parkinson's disease: is there an impact on sleep and wakefulness? // *J. Sleep Res.* 2012. Vol. 21. № 6. P. 710-717.
- Wightman R.M., Robinson D.L.* Transient changes in mesolimbic dopamine neurons and their association with 'reward' // *J. Neurochem.* 2002. Vol. 82. P. 721-735.
- Wisor J.P., Nishino S., Sora I. et al.* Dopaminergic role in stimulant-induced wakefulness // *J. Neurosci.* 2001. Vol. 21. № 5. P. 1787-1794.

Yokoyama H., Kuroiwa H., Kasahara J., Araki T. Neuropharmacological approach against MPTP (1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine)-induced mouse model of Parkinson's disease // *Acta Neurobiol. Exp.* 2011. Vol. 71. P. 269-280.

Zoccolella S., Savarese M., Lamberti P. et al. Sleep disorders and the natural history of Parkinson's disease: The contribution of epidemiological studies // *Sleep Medicine Rev.* 2011. Vol. 15. P. 41-50.

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304394081903463> – implicit0. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304394081903463> – implicit0

Электрофизиологические подходы к ранней и дифференциальной диагностике болезни Паркинсона

Ю.В. Обухов, А.В. Габова, З.А. Залялова, С.Н. Иллариошкин, А.В. Карабанов, М.С. Королев, Г.Д. Кузнецова, А.А. Морозов, Р.Р. Нигматуллина, К.Ю. Обухов, О.С. Сушкова

Содержание

1. Введение
2. Больные и методы исследования
3. Анализ ЭЭГ с помощью вейвлет-преобразования Морле
4. Совместный анализ частотно-временных характеристик ЭЭГ, ЭМГ и механического тремора
5. Заключение

1. Введение

В целом ряде случаев клиническая электроэнцефалография (ЭЭГ) является необходимым звеном при дифференциальной диагностике и при оценке проводимого лечения. В других случаях результаты менее информативны, потому что обнаруживаемые патологические изменения ЭЭГ недостаточно специфичны, чтобы на их основе поставить надежный диагноз. Возможно, однако, для разных типов мозговой патологии необходимо использовать различные, адекватные для каждого случая методы анализа ЭЭГ.

Одной из актуальных проблем клинической электроэнцефалографии является исследование особенностей ЭЭГ пациентов на разных стадиях развития заболевания. При этом наиболее важным для диагностики представляется поиск ЭЭГ-маркеров самых ранних признаков патологии мозга. В целом ряде работ было отмечено, что для болезни Паркинсона (БП) характерно снижение частоты доминирующих ритмов ЭЭГ и изменение относительной мощности основных частотных диапазонов (England et al., 1959; Ganglberger, 1961; Soikkeli et al., 1991; Fogelson et al., 2006; Stoffers et al., 2007; Moazami-Gourdarzi et al., 2008). Эти результаты были получены с помощью традиционных методов спектрального анализа. Кроме этого, при исследовании ЭЭГ пациентов на ранних этапах развития БП в некоторых работах (Pezard et al., 2001), проведенных с использованием нелинейных методов анализа, было обнаружено повышение величины энтропии сигнала. По мнению авторов, это могло быть ранним признаком патологического рассогласования работы различных структур головного мозга.

Правильная диагностика ранних клинических проявлений болезни Паркинсона (БП) до сих пор является достаточно трудной задачей. Признаки самых ранних

Сокращения: БП – болезнь Паркинсона; МТ – механический тремор; МЭГ – магнитная энцефалография; ЭЭГ – электроэнцефалография.

стадий этого заболевания весьма многочисленны, однако в большинстве случаев они лишь относительно специфичны, каждый из них может встречаться и при другой мозговой патологии. Информативными для диагностики болезни Паркинсона считаются современные методы нейровизуализации, однако они очень дороги и не могут широко использоваться во врачебной практике. Доступные и достаточно распространенные методы клинической электроэнцефалографии (ЭЭГ) применяются при обследовании пациентов с БП уже в течение пяти десятилетий, но до последнего времени успехи в этой области были достаточно скромными. Уже в первых работах было отмечено, что для пациентов с БП характерно снижение частоты доминирующего ритма ЭЭГ (England et al., 1959; Ganglberger, 1961).

Достаточно критическое отношение к данным, полученным при БП на основе традиционной клинической записи ЭЭГ, связано с тем, что электроэнцефалограмма отражает прежде всего электрические процессы, происходящие в коре головного мозга, и может лишь косвенно свидетельствовать о тех патологических процессах и функциональных перестройках, которые происходят в сложных корково-подкорковых сетях при развитии заболевания.

Успеху понимания взаимосвязи патологических изменений ритмической электрической активности и специфических нарушений в структурах мозга, связанных с моторными функциями, способствовали исследования, проведенные в клинических условиях у пациентов, которым в терапевтических целях были имплантированы электроды в различные базальные ядра. Кроме стимуляции стриатума, субталамуса и некоторых других структур эти электроды использовались также для регистрации электрической активности. Одновременно проводилась запись ЭЭГ и оценка типа и степени моторных нарушений. В последнем подробном обзоре этих работ (Oswal et al., 2014) была рассмотрена электрическая активность в очень широком частотном диапазоне: от θ -колебаний до осцилляций частотой в 200–350 Гц. Наибольшее внимание уделено высокочастотному диапазону. Доказана взаимосвязь выраженности β - и γ -полосы ЭЭГ с дефицитом дофамина в мозге, показана корреляция мощности β -диапазона в субталамусе с глубиной патологических изменений моторной сферы. Патологическое усиление β -диапазона ЭЭГ зависит от типа моторных нарушений, оно наблюдается при дискинезии и ригидности и не коррелирует с тремором. Следует специально отметить, что пациенты, которым были имплантированы электроды в мозг и у которых анализировались ЭЭГ субталамуса, стриатума и таламуса и рассматривались корреляции активности коры и базальных структур, находились на достаточно поздних стадиях БП.

Что касается α - и θ -частотных диапазонов, то в литературе достаточно подробно представлены данные о связи θ -активности разных структур мозга с тремором. Четкие пики θ -активности, коррелирующие с частотой тремора (или гармониками этой частоты), обнаружены в субталамусе, бледном шаре, таламусе (Timmermann et al., 2003). Тета-ритм, отражающий ритмику тремора, с помощью магнитной энцефалографии (МЭГ) обнаруживается в контралатеральной моторной коре, премоторной области, соматосенсорной области, а также в мозжечке (Bergman et al., 1999; Levy et al., 2001). На основании электрофизиологических и морфологических

данных можно предположить наличие осцилляторов тремора в нервной сети «базальные ганглии–таламус–кора».

Почти все работы, связанные с анализом особенностей ЭЭГ при БП, традиционно использовали для анализа преобразование Фурье, которое рассматривает ЭЭГ как стационарный процесс и дает средние данные о частотном составе ЭЭГ за анализируемый отрезок времени. Исключением являются лишь некоторые работы (Pezard et al., 2001), в которых были использованы нелинейные методы анализа и обнаружено повышение энтропии сигнала при развитии патологии.

В настоящее время появляются новые подходы к анализу ЭЭГ. В частности, появляются работы, использующие различные варианты вейвлет-преобразований при самых разных патологиях мозга (d'Atellis et al., 1997; Габова и др., 2004; Bosnyakova, Obukhov, 2005.). Такой подход открывает новые возможности, потому что позволяет подробно исследовать ЭЭГ в ее динамике. В работе (Обухов и др., 2010) вейвлет-преобразование было применено для анализа ЭЭГ пациентов с болезнью Паркинсона в ранней стадии. Так же как и в работах, выполненных с помощью спектрального анализа, было отмечено достоверное снижение частоты доминирующего диапазона ЭЭГ. Однако наиболее интересным результатом была обнаруженная в этой работе дезорганизация, нестабильность во времени вейвлет-спектрограмм ЭЭГ, особенно ярко выраженная в доминирующем частотном диапазоне. Эти данные согласуются с хорошо известными литературными данными о том, что характерной чертой БП признается синдром дезинтеграции, проявляющийся на разных системных уровнях, прежде всего в двигательной сфере (Вейн и др., 1974; Голубев и др., 1999).

В связи с такими представлениями об особенностях электрической активности мозга при БП была предпринята разработка новых методов анализа, позволяющих оценивать частотно-временную и пространственно-временную динамику сигналов. Вейвлет-преобразование ЭЭГ начали использовать для анализа электрической активности мозга еще в девяностые годы (D'Atellis et al., 1997; Senhadji, Wendling, 2002; Siff et al., 1994). Однако этот высокоинформативный метод анализа до сих пор не получил достаточно широкого практического применения, по-видимому, вследствие того, что в нем вейвлет-преобразования применяются лишь для визуализации частотно-временной динамики ЭЭГ. Вместе с тем, существует целый ряд разработок, показывающих адекватность этого метода для диагностики и предсказания патологических нарушений мозговой активности, например при различных видах эпилепсии (Gabor et al., 1996; Blanco et al., 1998; Sun et al., 2001; Battiston et al., 2003; Adeli et al., 2003; Bosnyakova et al., 2007).

В этой связи количественная оценка частотно-временных спектрограмм ЭЭГ, таких как межполушарная асимметрия, наличие θ -ритма, степени дезорганизации и др., может быть полезным инструментом для исследования особенностей электрической активности мозга на ранних стадиях БП. Ниже будут представлены методы количественной оценки вейвлет спектрограмм, в первую очередь оценки степени их дезорганизации, и результаты применения этих методов для анализа частотно-временных особенностей ЭЭГ пациентов с БП на ранних и более поздних этапах развития данного заболевания.

2. Больные и методы исследования

Анализировались 19-канальные фоновые ЭЭГ, включая совместные измерения ЭЭГ, ЭМГ. Для исследований ЭЭГ использовались 19-канальные электроэнцефалографы фирм АТЕС МЕДИКА и Нейрософт. Полоса пропускания сигналов была от 0,3 до 35 Гц. Для одновременной записи ЭЭГ и ЭМГ использовался 41-канальный многофункциональный комплекс для проведения нейрофизиологических исследований Нейрон-спектр-5 фирмы Нейрософт с полосой пропускания сигналов более 0,3 Гц. Частота дискретизации при измерении сигналов ЭЭГ и ЭМГ составляла 500 Гц, а при измерении тремора с помощью акселерометров – 1378 Гц (<http://www.neurosoft.ru/rus/product/neuron-spectrum-5/index.aspx>).

Рис. 1 иллюстрирует расположение ЭЭГ-электродов на голове пациента по схеме 10×20, ЭМГ-электродов на руках и акселерометров на тыльной стороне ладони и/или на ногах. Измерялись фоновые записи ЭЭГ и записи при напряженном положении ладоней пациента с закрытыми глазами. Полоса пропускания усилителей ЭЭГ составляла 0,3-35 Гц, ЭМГ – 60–120 Гц.

Было проведено ЭЭГ-обследование 82 людей, из них 34 пациента с дрожательной формой болезни Паркинсона, 18 пациентов с ригидной формой и 30 человек группы контроля.

Среди пациентов с ригидной формой было поровну мужчин и женщин, средний возраст ($M+\sigma$) $59,75\pm 8,5$; средний возраст дебюта заболевания $57,4\pm 12,3$; сред-



Рис. 1. Расположение электродов

ний балл по шкале UPDRS $18,4 \pm 8,6$. Только 1 пациент был с ранним началом БП (45 лет).

Среди пациентов с дрожательной формой женщин было 26, а мужчин 8. Средний возраст пациентов с дрожательной формой составил $64,1 \pm 8,6$; средний возраст дебюта заболевания $62,4 \pm 8,7$; средний балл по шкале UPDRS $23,1 \pm 11,1$. Таким образом, пациенты с дрожательной формой сопоставимы с пациентами с ригидной формой по возрасту и возрасту дебюта заболевания, но среди пациентов с дрожательной формой преобладают женщины и данные пациенты имеют больший балл по шкале UPDRS ($p > 0,05$), что, вероятно, можно объяснить наличием выраженного дрожания в симптоматике заболевания.

Для совместных обследований ЭЭГ, ЭМГ и механического тремора было отобрано 15 больных, страдающих болезнью Паркинсона. Диагноз был поставлен с применением клинико-диагностических критериев болезни Паркинсона Банка Мозга, Великобритания (Gibb, Lees, 1988) – 8 женщин и 6 мужчин. Возрастной интервал с 60 до 74 лет. Длительность заболевания: у 14 человек менее года, а 1 человек болен 1,5 года. Для определения стадии заболевания использована шкала Хен-Яра (Hoehn, Yahr, 1967), у 14 больных выявлена I стадия, у 1 больного – II стадия. Все больные были правшами. По принятой классификации форм заболевания: у 15 больных смешанная (акинетико-ригидно-дрожательная) форма БП, больные с акинетико-ригидной и дрожательной формой – 0 человек. Начало заболевания с тремора и брадикинезии с левой руки – 8 человек, с правой руки – 7 человек. Для оценки двигательных нарушений была использована унифицированная рейтинговая шкала оценки болезни Паркинсона – шкала UPDRS (Fahn, Elton, 1987). По шкале UPDRS 5 человек набрали 10 баллов, 7 человек – 11 баллов, 3 человека – 12 баллов. На момент исследования пациенты противопаркинсоническую терапию не получали.

3. Анализ ЭЭГ с помощью вейвлет-преобразования Морле

Известно, что характерной чертой болезни Паркинсона является синдром дезинтеграции, проявляющийся на разных системных уровнях (двигательные нарушения, вегетативная, нейрогуморальная дезинтеграция, эмоциональные и психические нарушения). Обнаруженные методом вейвлет-анализа изменения частотно-временной структуры ЭЭГ свидетельствовали о том, что дезинтеграция может проявляться также в динамике электрической активности мозга. В работе (Обухов и др., 2010) были анализированы данные в основном у пациентов на 2–3 стадии заболевания (по шкале Хен-Яра). Ниже будут приведены результаты вейвлет-анализа ЭЭГ не леченых пациентов на 1-й стадии БП в сравнении с контрольной группой и группой пациентов на 2-й и 3-й стадиях.

Частотно-временная спектрограмма непрерывного вейвлет-преобразования Морле задается формулой:

$$S_x(\tau, f) = |W(\tau, f)|^2, \quad (1)$$

$$W(\tau, T) = \frac{1}{\sqrt{T}} \int x(t) \psi^* \left(\frac{t - \tau}{T} \right), \quad (2)$$

$$\psi(\eta) = \frac{1}{\sqrt{\pi F_b}} e^{2i\pi F_c \eta} e^{-\frac{\eta^2}{F_b}}, \quad (3)$$

где $S(\tau, f)$ – спектральная плотность мощности, $f = 1/T$, F_b , F_c – параметры, обычно принимают $F_b = F_c = 1$.

Вейвлет-спектрограмма ЭЭГ состоит из серий пиков, отражающих изменения амплитуды спектральных коэффициентов в различных частотных диапазонах. Это неудивительно, учитывая то, что ЭЭГ состоит из цугов колебаний различной частоты и длительности. На рис. 2 представлены вейвлет-преобразования ЭЭГ здорового испытуемого (слева) и пациента с болезнью Паркинсона на 1 стадии по шкале Хен-Яра (справа).

Из рис. 2 видно, что как у нормальных испытуемых, так и у пациентов с БП вейвлет спектрограммы состоят из серии пологих пиков (примерно один–три пика в секунду) спектральной плотности мощности на частотно-временной плоскости. У нормальных испытуемых эти пики возникают на примерно одной частоте и образуют регулярные хребты, которые при Фурье-анализе дают общепринятые ритмы, – δ , θ , α , β и т.д. У пациентов с БП положение (координаты на частотно-временной плоскости) и разброс частот пиков существенно сильнее изменяется во времени и их спектральная мощность перераспределяется между частотными диапазонами.

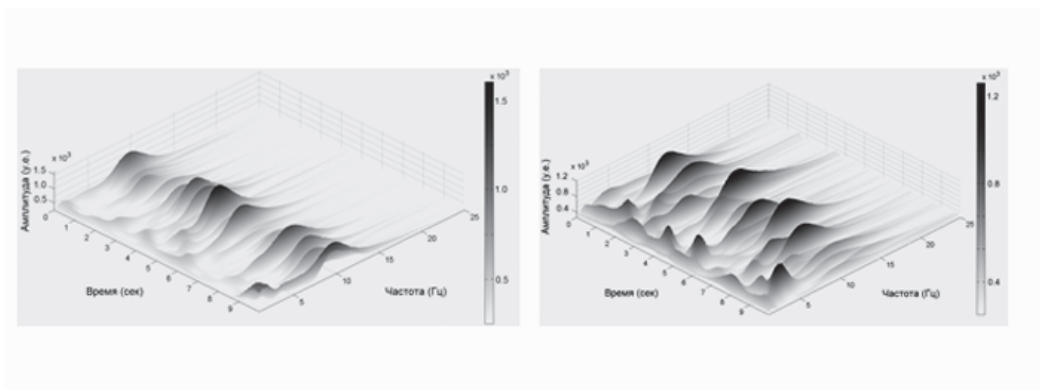


Рис. 2. Вейвлет-спектрограммы ЭЭГ отведения С3. Слева – контроль, справа – пациент на 1-й стадии БП

В частности, существенно возрастают пики в низкочастотном диапазоне (4–6 Гц). Корреляция частоты тремора и колебаний ЭЭГ в θ -диапазоне была отмечена в ряде работ (обзор работ см., например, в (Oswal et al., 2014)).

Доминирующий ритм ЭЭГ имеет амплитуду, превосходящую амплитуду ритмов в других частотных диапазонах. Множество частот отдельных локальных максимумов отражает диапазон доминирующего ритма ЭЭГ. В норме все вершины пиков составляют четко выраженный хребет, представляющий собой α -ритм, что говорит о достаточной стабильности частоты доминирующего ритма ЭЭГ у здорового человека. У пациентов на 1-ой стадии БП происходит значительная дезорганизация этой трехмерной картины: хребет вейвлет-преобразования состоит из пиков, имеющих разную по сравнению с нормой частоту.

Идея работ (Обухов и др., 2013б; Королев, Обухов, 2012) заключается в том, что, выделяя экстремумы пиков вейвлет спектрограмм и анализируя статистику распределения частотно-временных координат экстремумов и их мощности, можно обнаружить признаки БП в ранней стадии. Кроме того, эта статистика может быть разной у пациентов с различными стадиями заболевания. В качестве статистики используются гистограммы распределения по частоте количества экстремумов и/или их суммарной спектральной плотности мощности в некотором узком диапазоне частот.

Суть обработки и анализа вейвлет-спектрограмм сигналов ЭЭГ заключается в том, что определяются амплитуды $A_i(F, t)$ пиков спектрограмм. Далее плоскость время-частота (от $0-T$, $F_{\min}-F_{\max}$) разбивается на окна с размерами $(\Delta T, \Delta F)$. Размеры окна целесообразно выбирать по времени $\Delta T=(0,05-1,00)T$ с, а по частоте $-\Delta F=(0,02-0,03)F_{\max}$ Гц. Затем в каждом окне вычисляются суммы амплитуд пиков спектрограмм ΣA_i и строятся гистограммы распределения сумм ΣA_i от частоты.

На рис. 3 приведены примеры распределений сумм амплитуд экстремумов в частотно-временных окнах. Вверху – для волонтера из контрольной группы, внизу – для пациента на 1-й стадии БП. Слева – отведение С3, справа – симметричное отведение С4. Эти распределения показывают асимметрию электрической активности мозга в начальной стадии БП по сравнению с контролем, заключающуюся в дезорганизации доминирующего ритма, а именно – в увеличении частотного разброса его пиков в «больном» полушарии.

Сигналы ЭЭГ по своей природе являются нестационарными, поэтому представляется целесообразным введение количественной оценки этой нестационарности (дезорганизации) и сопоставление ее в норме с ранними стадиями БП. Такая нестационарность соответствует представлениям о дезорганизации ритмов ЭЭГ при паркинсонизме. Суть предлагаемой оценки заключается в оценке попарных корреляций частотных распределений сумм амплитуд экстремумов по временным окнам (Обухов и др., 2013а; Obukhov et al., 2013b).

Для примеров, представленных на рис. 3, число таких окон составляет 14. Соответственно, получается симметричная матрица коэффициентов корреляции с единичной диагональю размером 14×14 . В норме корреляционные матрицы содержат значительное число больших коэффициентов корреляции, и наоборот, у пациента с

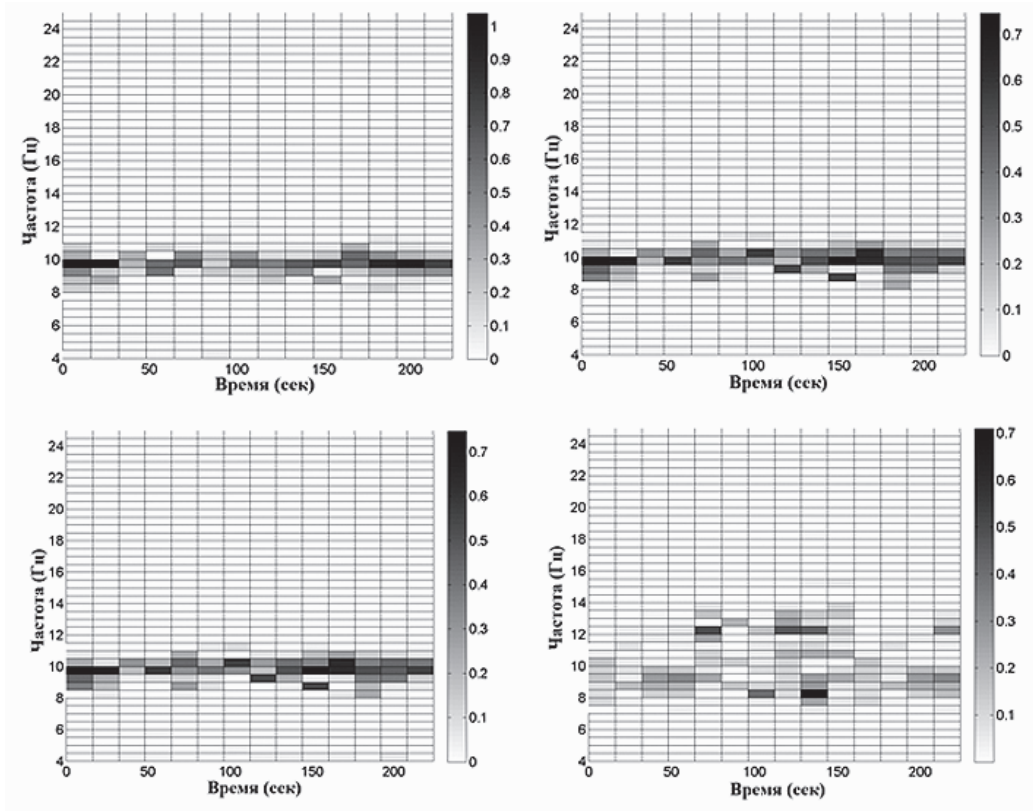


Рис. 3. Распределение сумм амплитуд экстремумов вейвлет-спектрограмм в частотно-временных окнах

Вверху – для волонтера из контрольной группы, внизу – для пациента на 1-й стадии БП с левосторонними проявлениями. Слева – отведение С3, справа – симметричное отведение С4

БП корреляционные матрицы содержат значительное число малых коэффициентов корреляции. Поэтому целесообразно для оценки степени дезорганизации (нестационарности) ритмов строить гистограммы коэффициентов корреляции в корреляционной матрице. На рис. 4 представлены гистограммы коэффициентов корреляции для отведений С3 и С4 тех же испытуемых. Видно, что в норме значения гистограмм коэффициентов корреляций сосредоточены с области больших значений, и наоборот, у пациента эти значения разбросаны по всем значениям коэффициентов корреляции.

На рис. 5 представлены средние и медианы коэффициентов корреляции по группам пациентов и контроля. Для группы пациентов на 1-й стадии БП взяты отведения С3 или С4 «больного» полушария, для групп контроля и пациентов на 2-й стадии – отведения от обоих полушарий. Видно, что с ростом стадии заболевания средние и медианы коэффициентов корреляции уменьшаются, соответственно возрастает степень дезорганизации доминирующего ритма.

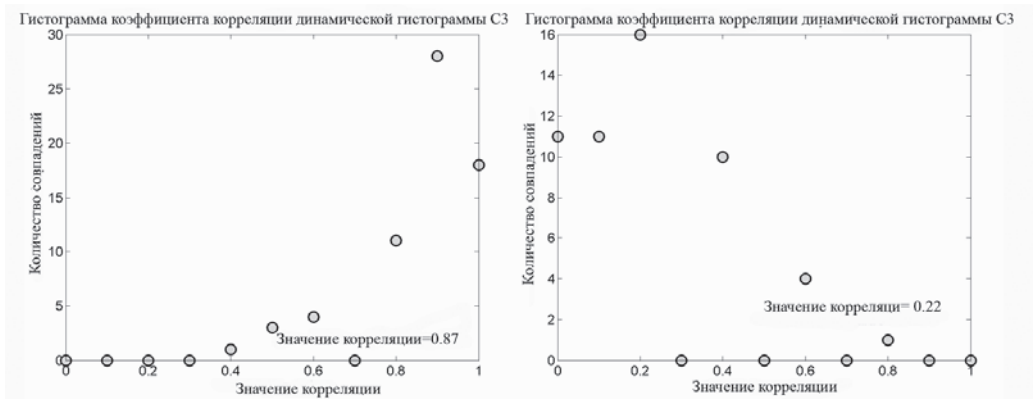


Рис. 4. Гистограммы коэффициентов корреляции доминирующих ритмов в норме (слева) и пациента на 1-й стадии БП (справа)

На рисунках указана средняя арифметическая величина распределения коэффициентов корреляции

При сравнении ЭЭГ симметричных участков правого и левого полушарий у обследованных пациентов постоянно обнаруживались существенные различия в распределении локальных максимумов вейвлет-спектрограмм. Признаки дезорганизации ЭЭГ могли быть выражены сильнее либо справа, либо слева. Эти данные вполне соответствуют представлениям об асимметрии первых проявлений болезни Паркинсона (Brockmann, Berg, 2014).

В табл. 1 приведены оценки стадии заболевания по результатам анализа ЭЭГ и сравнение их с клиническим диагнозом. Оценка стадии осуществлялась по наличию θ -ритма, частоте α -ритма, межполушарной асимметрии и дезорганизации доминирующего ритма в отведениях C3, C4, O1 и O2.

4. Совместный анализ частотно-временных характеристик ЭЭГ, ЭМГ и механического тремора

Одним из путей поиска признаков болезни Паркинсона (БП) является совместный анализ сигналов разной модальности – электроэнцефалограммы (ЭЭГ), электромиограммы (ЭМГ) и механического тремора (МТ), измеряемого с помощью акселерометров. Такой анализ может привести к пониманию особенностей частотной структуры ЭЭГ, а также к более надежному распознаванию БП в ранних стадиях. Синхронизацию ЭЭГ, ЭМГ и МТ можно оценивать по частотно-временному распределению экстремумов вейвлет-спектрограмм ЭЭГ, МТ и огибающей амплитудно-модулированного высокочастотного ЭМГ.

В нейрофизиологии создан метод компьютерной регистрации и количественной оценки тремора, возникающего при неизменном поддержании позы суставного угла. Более детально этот метод описан ниже в следующем разделе. Метод

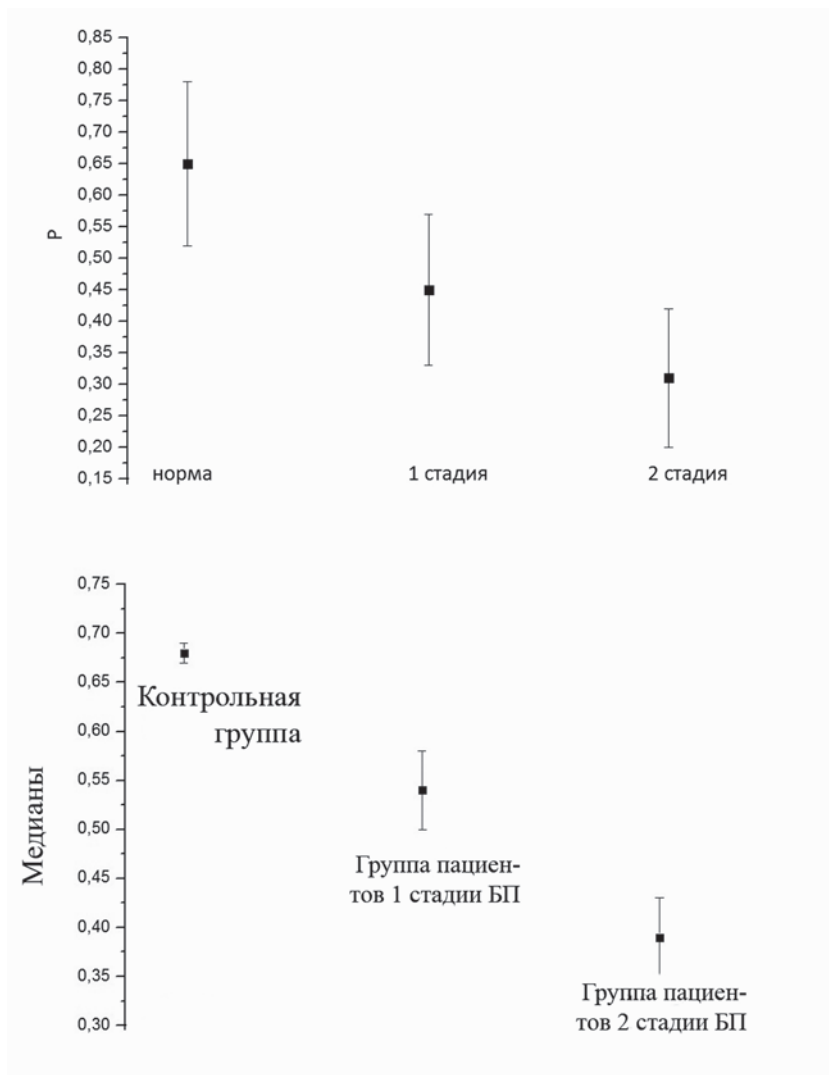


Рис. 5. Средние арифметические (слева) и медианы коэффициентов корреляции для отведений С3 и С4 контрольной группы и отведений в «большом» полушарии групп пациентов на 1-й и 2-й стадиях БП

Таблица 1

Оценка стадии БП по анализу ЭЭГ и сравнение с клиническим диагнозом

Группы испытуемых	Количество людей с клиническими диагнозами	Количество совпадений диагнозов по ЭЭГ с клиническими	Процент совпадений
контроль	30	27	90%
1 стадия	34	29	85%
2 стадия	18	12	66%
Всего испытуемых	82	68	83%

позволяет из широкого спектра электромиограммы выделить тот частотный диапазон сигнала, который создает двигательный акт. Основой метода является представление о том, что усилия мышц, действующие на сустав, создают движение, вид которого близок к кривой, огибающей ЭМГ (Андреева, Хуторская, 1987).

Информация о треморе руки лежит не в самом сигнале ЭМГ, а в его огибающей, которую можно вычислить с помощью преобразования Гильберта (Вакман, Вайнштейн, 2000). Для выделения амплитуды и фазы произвольного амплитудно модулированного сигнала $u(t)$ необходимо создать на его основе аналитический сигнал:

$$w(t) = u(t) + iv(t). \quad (4)$$

Вещественная часть аналитического сигнала совпадает с исходным сигналом $u(t)$. Мнимая часть $v(t)$ называется преобразованием Гильберта сигнала $u(t)$. Вычисляется с помощью преобразования Гильберта:

$$v(t) = \int_{-\infty}^{+\infty} \frac{u(\tau)}{\pi(t - \tau)} d(\tau). \quad (5)$$

Подставляя (5) в формулу (4) и преобразуя формулу (4) в представленной форме (6), можно идентифицировать огибающую ЭМГ (4).

$$w(t) = u(t) + iv(t) = a(t)e^{i\pi(\alpha t)}, \quad (6)$$

где $a(t)$ – огибающая сигнала

$$a(t) = \sqrt{(u(t))^2 + (v(t))^2}. \quad (7)$$

Оцифрованные записи ЭЭГ были обработаны фильтром Баттерворта 4-го порядка для удаления частот 50 и 100 Гц.

На рис. 6 и 7 представлены частотно-временные распределения экстремумов вейвлет-спектрограмм ЭЭГ в отведения С3 и С4 моторной зоны коры, а также экстремумы огибающей ЭМГ и механического тремора (МТ) в контралатеральных конечностях.

Соответствующие интегральные частотные гистограммы локальных максимумов отображаются на рис. 8, 9.

На рис. 9 видно, что экстремумы в большой моторной зоне правого полушария частотно скоррелированы с экстремумами МТ и ЭМГ. Напротив, в еще клинически здоровом левом полушарии мозга такой корреляции нет (см. рис. 8).

В табл. 2 приведены оценки стадии БП по количественным характеристикам ЭЭГ и тремора и сравнение их с клиническими диагнозами. В качестве количественных признаков ЭЭГ используется отношение амплитуд пиков частотных гис-

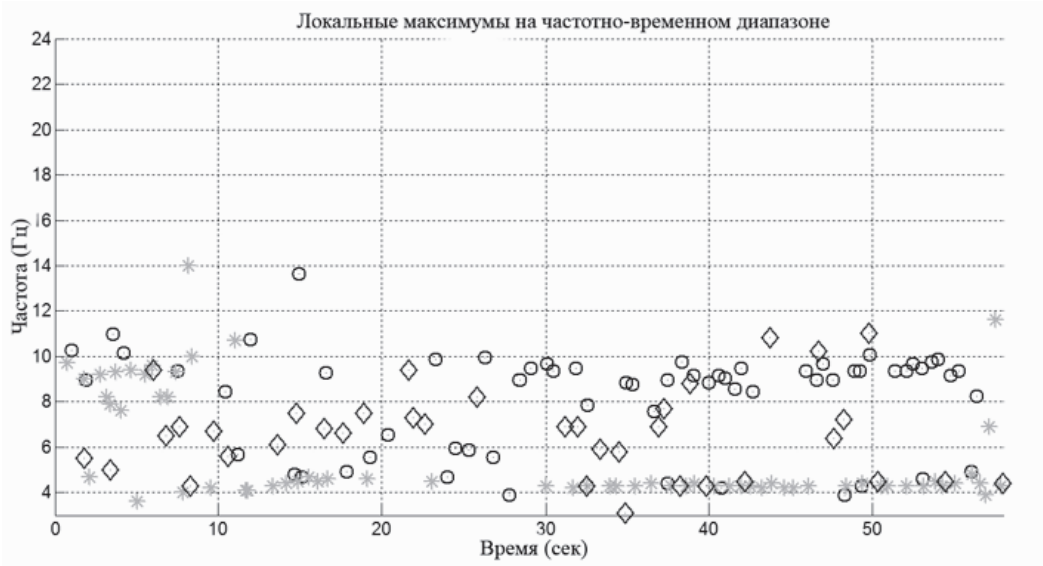


Рис. 6. Локальные максимумы на частотно-временном диапазоне отведений ЭЭГ в моторной зоне коры мозга С3 (кружочки) и контралатеральных МТ (звездочки) и ЭМГ (ромбики) больного на 1-й стадии БП по шкале Хен–Яра

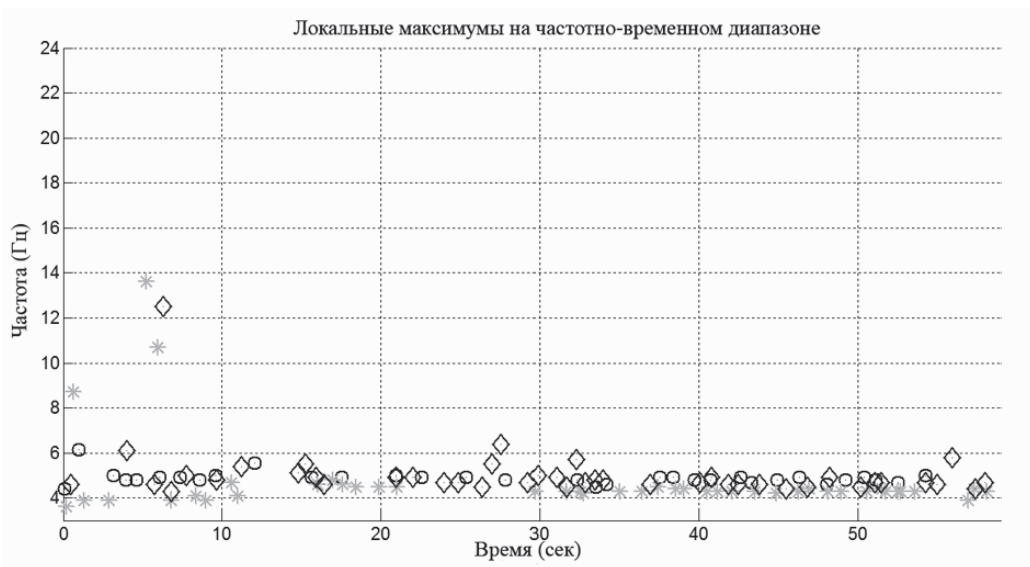


Рис. 7. Локальные максимумы на частотно-временном диапазоне межполушарно-симметрично-го отведения С4 и контралатеральных МТ и ЭМГ больного на 1-й стадии БП по качественной шкале Хен–Яра

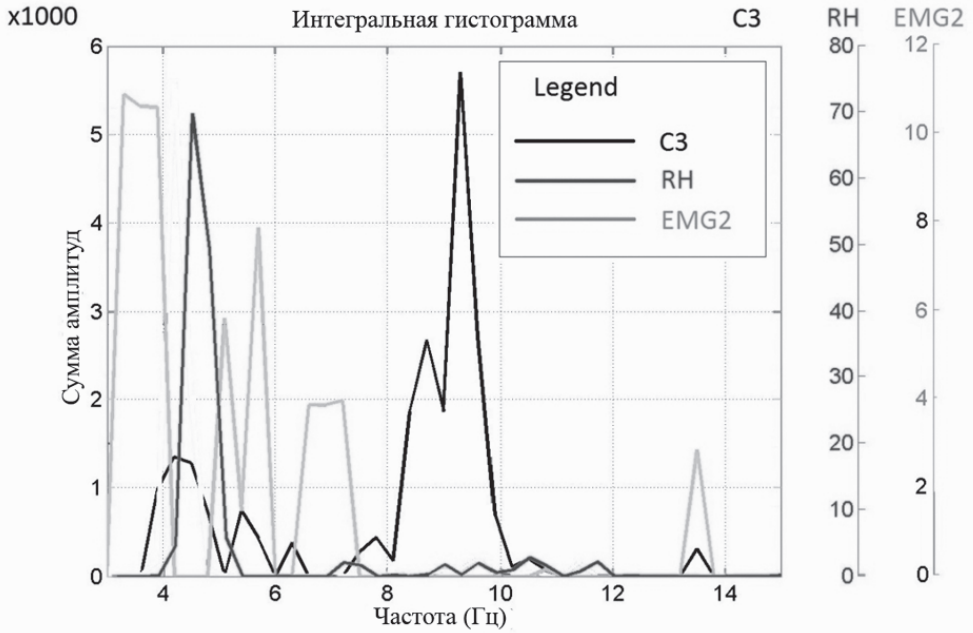


Рис. 8. Интегральные частотные гистограммы локальных максимумов («здоровое» полушарие) с частотной рассинхронизацией в θ -диапазоне

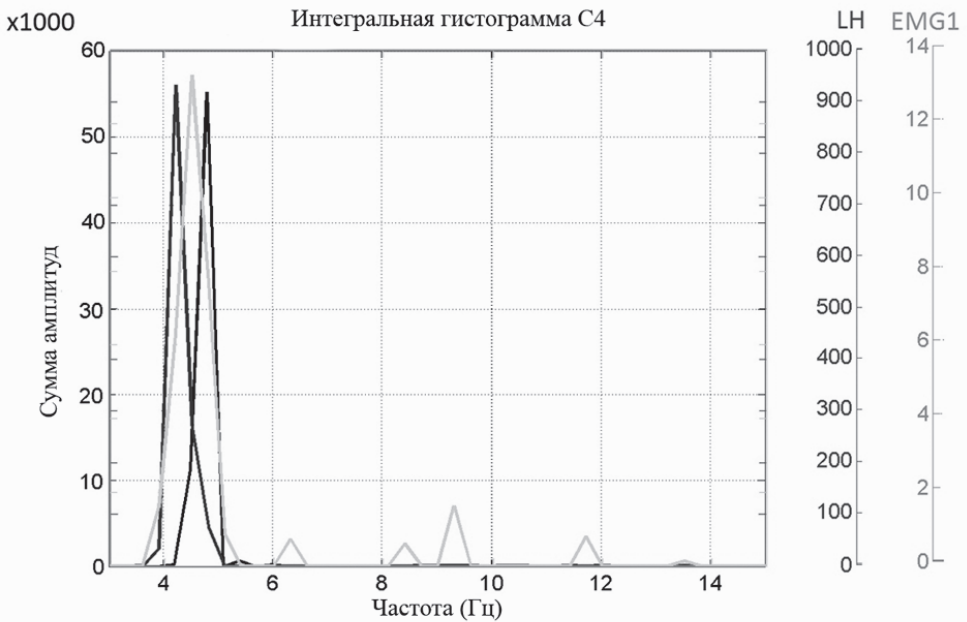


Рис. 9. Интегральные частотные гистограммы локальных максимумов («больное» полушарие) с частотной синхронизацией в θ -диапазоне

тограмм экстремумов вейвлет спектрограмм в тета диапазоне и доминирующего ритма A_θ/A_α в отведениях C3 и C4, отношение аналогичных пиков тремора LH/RH, отношение средних $r(C3)/r(C4)$ и среднеквадратичных отклонений $\sigma(C3)/\sigma(C4)$ распределения коэффициентов корреляции динамических гистограмм доминирующего ритма в отведениях C3 и C4. Из этих величин можно сформировать оценку близости R испытуемого к некоторому абстрактному идеалу:

$$R = \sqrt{\frac{(A_\theta / A_\alpha (C3))^2 + (A_\theta / A_\alpha (C4))^2 + (1 - LH / RH)^2 + (1 - r(C3) / r(C4))^2 + (1 - \sigma(C3) / \sigma(C4))^2}{(1 - \sigma(C3) / \sigma(C4))^2}} \quad (8)$$

у которого отсутствует ритм в θ -диапазоне, следовательно $A_\theta/A_\alpha = 0$ в обоих отведениях C3 и C4, амплитуды тремора конечностей, средние коэффициенты корреляции динамических гистограмм доминирующего ритма и их среднеквадратичные отклонения одинаковы. Оценка близости R является евклидовым расстоянием в пространстве этих признаков испытуемого от абстрактного идеала.

Таблица 2

Оценка стадии заболевания БП по количественному анализу признаков ЭЭГ и тремора и сравнение ее с клиническим диагнозом

№	Клинический диагноз	Результат анализа ЭЭГ	A_θ/A_α		LH/RH	$r(C3)/r(C4)$	$\sigma(C3)/\sigma(C4)$	R
			C3	C4				
Пациенты								
1	2	1	0	0,6	5	0,58	0,23	4,2
2	1	1	0,6	0	0,04	0,97	1,25	1,2
3	1	1	0,8	0,6	0,15	0,77	1,23	1,3
4	1	1	0,5	0,95	0,14	0,88	0,89	1,4
5	1	1	0	0	14,3	0,81	1,4	13,3
6	2	1	0,15	0	117	1,01	1,04	116,0
7	1	?	0	0,3	0,1	0,98	1,03	0,95
8	1	1	0,7	1,7	0,06	1,8	0,76	2,2
9	1	1	0,47	0	0,01	1,38	1,13	1,2
10	1	1	0	0	87,5	0,96	0,95	86,5
11	1	1	0,4	0	20	0,71	1,43	19,0
12	1	1	0	33	2,5	1,16	0,81	33,0
13	1	1	125	1,3	0,002	1,45	1,09	125,0
14	1	1	3	0	80	0,82	1,06	79,1
15	1	1	2,17	70	112	2,4	1,44	131,3
Контроль								
1	0	?	0	0	0,33	0,85	1,76	1,0
2	0	0	0	0	1,7	0,86	1,32	0,8
3	0	0	0	0	1,43	0,97	0,93	0,4
4	0	0	0	0	0,91	1,28	0,83	0,3
Абстрактный идеал								
			0	0	1	1	1	0

Из табл. 2 видно, что для представителей контрольной группы – расстояние $R < 1$, в то время как для пациентов оно существенно превышает $R = 1$. Следует отметить, что оценка R подчеркивает, в первую очередь, межполушарную асимметрию и поэтому она ориентирована на диагностику начальной 1-й стадии БП.

5. Заключение

С помощью разработанных методов и программ получены основные признаки БП в ранней стадии: межполушарная асимметрия частотно-временных характеристик ЭЭГ, особенно в центральных отведениях (С3, С4); возникновение ритма в частотном диапазоне 4–6 Гц и его частотная синхронизация с электромиографической активностью и механическим тремором конечностей; дезорганизация доминирующего ритма ЭЭГ, соответствующая общим представлениям о дезорганизации различных систем при БП. Получены количественные оценки дезорганизации доминирующего ритма в центральных отведениях, которые позволяют отличать группы практически здоровых людей от пациентов с БП на 1-й стадии и пациентов на 1-й стадии от пациентов на 2-й стадии. Сравнение распознавания БП с помощью количественных признаков ЭЭГ с клиническими диагнозами показало более чем 80-процентное совпадение для контрольной группы и группы пациентов на 1-й стадии БП. Худшее совпадение с группой пациентов на 2-й стадии БП можно объяснить малой выборкой и тем, что методики распознавания БП ориентированы на диагностику начальной 1-й стадии. Надежность количественной диагностики начальной стадии БП существенно повышается при использовании для распознавания результаты одновременных измерений ЭЭГ и тремора. Кроме того, с помощью вейвлет-преобразования и его дальнейшего количественного анализа в работе был подтвержден ряд фактов, характеризующих особенности ЭЭГ на 2–3-й стадиях болезни Паркинсона, и обнаружен ряд специфических особенностей частотно-временной организации ЭЭГ 1-й стадии заболевания. Предложенные в данной работе подходы и разработки оказались адекватными для исследования различных этапов развития БП, в том числе ранних. Гистограммы экстремумов вейвлет-преобразований ЭЭГ более четко по сравнению со спектрами Фурье подчеркивают признаки БП и позволяют изучать их динамику. Полученные данные намечают дальнейшие пути поиска специфических ЭЭГ-маркеров самых ранних, в том числе доклинических, стадий заболевания.

Литература

- Андреева Е.А., Хуторская О.Е. Спектральный метод анализа электромиографической активности мышц. М.: Наука, 1987. 192 с.
- Вакман Д.Е., Вайнштейн Л.А. Амплитуда, фаза, частота – основные понятия теории колебаний // Успехи физических наук. 2000. Т. 123. № 4. С. 657-682.
- Вейн А.М., Голубев В.Л., Яхно Н.Н. Паркинсонизм с позиций функционально-неврологического анализа // Паркинсонизм: вопросы клиники, патогенеза и лечения. М., 1974. С. 57-65.

- Габова А.В., Боснякова Д.Ю., Босняков М.С. и др. Частотно-временная структура разрядов пик-волна генетической absence-эпилепсии // Докл. РАН. 2004. Т. 396. С. 557-560.
- Голубев В.Л., Левин Я. И., Вейн А.М. Болезнь Паркинсона и синдром паркинсонизма. М.: МЕДпресс, 1999. 415 с.
- Королев М.С., Обухов Ю.В. Поиск признаков раннего паркинсонизма в электроэнцефалограммах // Нелинейный мир. 2012. № 2. С. 131-132
- Обухов Ю.В., Анциперов А.В., Гехт А.Б., Попов Г.П., Габова, А.В., Жарикова А.В., Кузнецова Г.Д. Частотно-временной анализ электрической активности мозга при болезни Паркинсона // Нейродегенеративные заболевания. Теория и практика. Ред. М.В. Угрюмов. М.: Наука, 2010. С. 112-129.
- Обухов Ю.В., Королев М.С., Обухов К.Ю. О количественной оценке нестационарности ритмов электроэнцефалограмм в норме и при паркинсонизме в ранних стадиях // Математические методы распознавания образов ММРО-10, Тезисы докладов 16 Всероссийской конференции, Казань, 6-12 октября 2013 г. М.: Тезаурус Пресс, 2013а. С. 79.
- Обухов Ю.В., Королев М.С., Габова А.В., Кузнецова Г.Д., Угрюмов М.В. Способ ранней электроэнцефалографической диагностики болезни Паркинсона. Патент РФ. 2484766, 20.06.2013б.
- Adeli H., Zhou Z., Dadmehr N. Analysis of EEG records in an epileptic patient using wavelet transform // J. Neurosci. Meth. 2003. Vol. 123. P. 69-87.
- Battiston J.J., Darcey T.M., Sigel A.M. et al. Statistical mapping of scalp-recorded ictal EEG records using wavelet analysis // Epilepsia. 2003. Vol. 44. P. 664-672.
- Bergman H., Wihmann T., Karmon B., De Long R. The primate subthalamic nucleus. II. Neuronal activity in parkinsonism // J. Neurophysiol. 1999. Vol. 72. P. 507-520.
- Blanko S., Quian-Quiroga R., Rosso O.A., Serrano E. Time-frequency analysis of electroencephalogram series. III. Wavelet packets and information cost function // Phys. Rev. E. 1998. Vol. 57. P. 932-940.
- Bosnyakova D.Yu., Obukhov Yu.V. Extraction of dominant feature in biomedical signals // Pattern Recogn. Image Anal. 2005. Vol. 15. P. 513-515.
- Bosnyakova D., Gabova A., Zharikova A. et al. Some peculiarities of time-frequency dynamics of spike-wave discharges in human and rats // Clin. Neurophysiol. 2007. Vol. 118. P. 1736-1743.
- Brockmann K., Berg D. Diagnosis of Parkinson's disease. Parkinson disease and other movement disorders. Int. Ass. of Parkinsonism and Related Disorders. Eds. E. Wolters. C. Baumann. VU University Press, 2014. P. 229-242.
- D'Atellis C.E., Isaacson S.I., Sime R.O. Detection of epileptic events in electroencephalograms using wavelet analysis // Ann. Biomed. Eng. 1997. Vol. 25. P. 286-293.
- England A.C., Schwab R.S., Peterson E. The electroencephalogram in Parkinson's syndrome // EEG Clin. Neurophysiol. 1959. Vol. 11. P. 723-721.
- Fahn S., Elton R.L. Recent developments in Parkinson's disease. Eds. S. Fahn, C.D. Marsden. NY, 1987. P. 153-163.
- Fogelson N., Williams D., Tijssen M. et al. Different functional loops between cerebral cortex and subthalamic area in Parkinson disease // Cerebral Cortex. 2006. Vol. 16. P. 64-75.
- Gabor A.J., Leach R.R., Dowla F.U. Automated seizure detection using a self-organizing neuronal network // EEG Clin. Neurophysiol. 1996. Vol. 66. P. 257-266.
- Ganglberger J.A. The EEG in parkinsonism and its alteration by stereotaxically produced lesions in pallidum // EEG Clin. Neurophysiol. 1961. Vol. 13. P. 82.
- Gibb W.R., Lees A.J. The relevance of the Lewy body to the pathogenesis of idiopathic Parkinson's disease // J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry. 1988. Vol. 51. P. 745-52.
- Hoehn M. Parkinsonism: on set, progressions and mortality. Eds. M. Hoehn, M.D. Jahr // Neurology. 1967. Vol. 17. № 5. P. 427-442.
- Levy R., Dostrovsky J.O., Lang A.E., Sime E., Hutchison W.D., Lozano A.M. Effects of apomorphine in subthalamic nucleus and globus pallidus internus neurons in patients with Parkinson's disease // J. Neurophysiol. 2001. Vol. 86. P. 249-260.
- Moazami-Gourdarzi M., Sarnthein J., Michels L. et al. Enhanced frontal low and high frequency power and synchronization in the resting EEG of parkinsonian patients // Neuroimage. 2008. Vol. 41. P. 985-997.
- Obukhov Yu.V., Korolev M.S., Obukhov K.Yu. et al. Time-frequency spontaneous eeg features of early stage Parkinson's disease // 11th International Conference on Pattern Recognition and Image Analysis: New

- Information Technologies (PRIA-11-2013). Samara, September 23-28, 2013a. Conference Proceedings, Vol. I, Samara: IPSI RAS, 2013a. P. 50-53.
- Obukhov Yu.V., Korolev M.S., Obukhov K.Yu. et al.* EEG features in early-stage Parkinson disease patients. XX World Congress on Parkinson's Disease and Related Disorders. Geneva, Switzerland, 8-11 December, 2013b. <http://www2.kenes.com/parkinson/abs/Pages/AbstractSubmission.aspx>. P.37.
- Oswal A., Litvak V., Brown P.* Synchronized neural oscillations and the parkinsonian state // Parkinson Disease and Other Movement Disorders. Eds. E. Wolters, C. Baumann. Int. Ass. of Parkinsonism and Related Disorders. VU University Press, 2014. P. 163-181.
- Pezard L., Jech R., Ruzicka E.* Investigation of non-linear properties of multichannel EEG in the early stages of Parkinson's disease // Clin. Neurophysiol. 2001. Vol. 112. P. 38-45.
- Senhadji L., Wendling F.* Epileptic transient detection wavelet and time-frequency approaches // Neurophysiol. Clin. 2002. Vol. 32. P. 175-192.
- Siff S.J., Aldroubi A., Unser M. et al.* Fast wavelet transformation of the EEG // EEG Clin. Neurophysiol. 1994. Vol. 91. P. 442-445.
- Soikkeli, R., Partenen J., Soininen H. et al.* Slowing of EEG in Parkinson's disease // EEG Clin. Neurophysiol. 1991. Vol. 79. P. 159-165.
- Stoffers D., Bosboom J.L.W., Dejen J.B. et al.* Slowing of oscillatory brain activity is a stable characteristic of Parkinson's disease without dementia // Brain. 2007. Vol. 130. P. 1847-1860.
- Sun M., Scheuer M.I., Sclabbassi R.J.* Extraction and analysis of early ictal activity in subdural electroen cephalogram // Ann. Biomed. Eng. 2001. Vol. 29. P. 878-896.
- Timmermann L., Gross J., Dirks M., Volkmann J., Freund H.J., Schnitzel A.* The cerebral oscillatory network of parkinsonian resting tremor // Brain. 2003. Vol. 126. P. 199-212.

Использование компьютерной электромиографии для ранней и дифференциальной диагностики экстрапирамидных заболеваний

О.Е. Хуторская

Одним из методов исследования двигательной функции человека является запись электрической активности мышц человека – электромиограмма (ЭМГ). Сигналы электрической активности мышц, отведенные поверхностными электродами, содержат информацию как о состоянии самой мышцы, так и об управлении двигательным актом. Электромиограмма (ЭМГ) имеет широкий частотный спектр с максимальной площадью в диапазоне 50–200 Гц. В то же время спектры механограммы (сигнала, отражающего изменение суставного угла) или суставного тремора здорового человека лежат в диапазоне 8–20 Гц, а частоты патологического тремора еще ниже, 4–9 Гц. Вследствие этого в исследованиях управления двигательной активностью человека интерес представляет та часть сигнала ЭМГ, которая создает эту активность, т.е. низкочастотная часть спектра ЭМГ.

В Институте проблем управления РАН был создан метод компьютерной регистрации и количественной оценки тремора человека при поддержании неизменного суставного угла (Андреева, Хуторская, 1987). Метод позволяет из широкого спектра электромиограммы выделить тот частотный диапазон сигнала, который создает двигательный акт. Путем большой серии экспериментальных исследований, как с участием животных, так и человека, из сигнала ЭМГ был выделен сигнал, создающий двигательную активность. Такой сигнал назван огибающей ЭМГ (ОЭМГ). Сигнал ОЭМГ формируется путем детектирования ЭМГ и фильтрации. Разработанный метод позволяет проводить анализ частотных составляющих ОЭМГ, лежащих в полосе от 0 до 40 Гц. Таким образом, ОЭМГ создается в той области частот, которая соответствует треморным движениям сустава. Это позволяет использовать сигналы ОЭМГ в исследованиях двигательных расстройств при экстрапирамидных нарушениях.

На рис. 1 приведен пример спектра ОЭМГ, характеризующий тремор мышцы лучезапястного сустава (*m. extensor carpi radialis longus*) здорового испытуемого.

Разработанный метод использовался в исследованиях ряда клинических форм экстрапирамидных нарушений, в том числе болезни Паркинсона (БП). Методика позволяет регистрировать и обрабатывать одновременно до 4 сигналов ЭМГ. Сигналы ЭМГ регистрируются стандартными накожными электродами с мышц лучезапястных (*m. extensor carpi radialis longus*) и голеностопных суставов (*m. tibialis anterior*) правой и левой стороны. Далее на компьютере проводится формирование сигнала ОЭМГ и его спектральный анализ. Для статистической надежности в про-

Сокращения: БП – болезнь Паркинсона; ОЭМГ – огибающая электромиограммы; ПКС – приборно-компьютерная система; СК – спастическая кривошея; ЭМГ – электромиограмма; ЭТ – эссенциальный тремор.

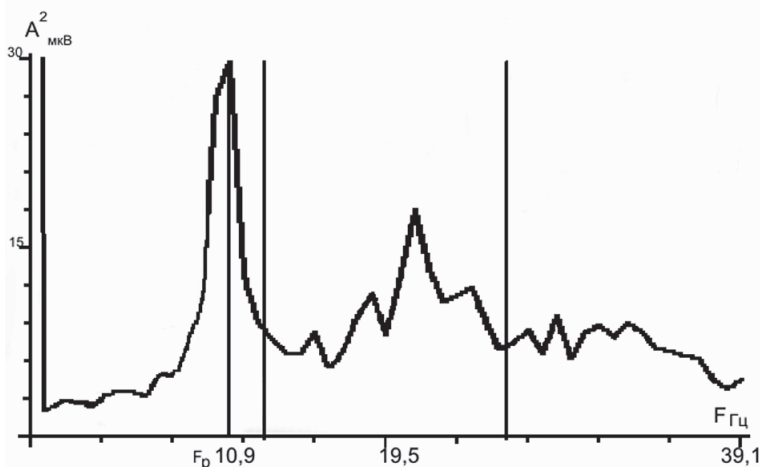


Рис. 1. Спектр ОЭМГ, мышцы лучезапястного сустава (*m. extensor carpi radialis longus*) здорового испытуемого. По оси ординат отложены значения частот (F), а по оси абсцисс значения мощности (A^2) частот спектра. Значение F_p – характеризует основную частоту физиологического тремора

цессе одного обследования регистрируется до 20 одноминутных реализаций ЭМГ. Таким образом, в ходе одного обследования накапливаются массивы, состоящие из 20 спектров ОЭМГ для каждой исследуемой мышцы, и по ним строятся средние спектры («портрет»), определяющие характерные особенности двигательных проявлений. Кроме портрета для каждой мышцы определяются среднестатистические значения определенных спектральных параметров. Этими параметрами являются: частота пика F_p , т.е. значение частоты максимальной точки спектра; мощность пика A_p^2 , т.е. высота максимальной точки спектра, A_0^2 – мощность нулевой составляющей спектра, т.е. средний уровень напряжения мышцы. Кроме того, подсчитывается значение $K_m = A_p^2 / A_d^2$, названное «коэффициент тремора» (где A_d^2 – среднее значение мощности всех частот спектра за исключением A_p^2 и A_0^2). Значение этого коэффициента определяет превалирование тремора над остальными составляющими сигнала. Так, для нормального физиологического тремора «коэффициент тремора» лежит в диапазоне от 5 до 12. Для параметра F_p строятся полигоны распределений, на которых определяются максимальные значения – мода (F_{mod}), указывающая на основную частоту тремора. Полигон распределения позволяет оценить диапазоны изменений частоты пика. Напомним, что основная частота нормального физиологического тремора для мышц лучезапястного сустава 9–12 Гц, а для мышц голеностопного сустава 8–11 Гц.

Исследования больных БП на разных стадиях заболевания Институт проблем управления им. В.А. Трапезникова РАН проводил совместно с Институтом неврологии РАМН, кафедрой невропатологии Академии последипломного образования МЗ РФ, Московским областным научно-исследовательским клиническим институтом им. М.Ф. Владимирского. В этих исследованиях были выявлены основные информационные признаки, отражающие состояние двигательного аппарата человека

и сформированы диагностические критерии (маркеры) двигательных нарушений (Andreeva, Khutorskaya, 1996). Большой объем проведенных исследований (более 500 обследований) позволил выделить статистически достоверные диапазоны значений спектральных параметров для разных групп больных с экстрапирамидными нарушениями (Левин и др., 2003, 2006) и в частности различных форм и стадий БП (Хуторская, 1998). Полученные диагностические маркеры различных форм БП позволяют также проводить индивидуальный подбор фармакотерапии (Khutorskaya, Fjodorova, 1996; Богданов и др., 2005).

Клиника БП складывается из так называемой триады двигательных нарушений: тремора, мышечной ригидности и гипокинезии. В чистом виде один из симптомов встречается крайне редко, обычно у больных проявляется смешанная симптоматика. Поэтому в клинике в зависимости от преобладания одного симптома и выраженности сопутствующего диагностируются различные формы заболевания: дрожательно-ригидная, ригидно-дрожательная, ригидно-акинетическая форма и т.п. (Шток, Федорова, 1997).

На рис. 2 приведены типичные спектральные «портреты» ОЭМГ мышц лучезапястного сустава больных БП с доминированием тремора, ригидности и гипокинезии. Так, дрожательная форма БП (см. рис. 2а) характеризуется высокоамплитудным пиком в области от 3 до 6 Гц, что клинически выражается высокоамплитудным патологическим тремором (дрожанием). Смещение пика в область более высоких частот до 9 Гц свидетельствует о ригидности (см. рис. 2б). При этом амплитуда пика уменьшается. Акинетическая форма БП характеризуется отсутствием пика и равномерностью амплитуд (см. рис. 2в). Следует отметить, что пик физиологического тремора человека лежит в диапазоне 9–12 Гц. (см. рис. 1)

Особенности различий симптоматик больных проявляются как в виде «спектральных портретов», так и в отличиях спектральных параметров. В зависимости от формы заболевания, а именно – от преобладания в клинически смешанной форме – тремора, ригидности или гипокинезии, отмечались изменения в характеристиках ОЭМГ. В частности у пациентов с преобладанием тремора мода в распределении частот пиков (F_{mod}) находится в области 3–6 Гц, при этом чем меньше частота, тем более выражен симптом дрожания. С увеличением частоты тремора к дрожанию присоединяется симптом ригидности. При преобладании в клинике ригидности над тремором и гипокинезией F_{mod} находится в пределах от 6 до 9 Гц, а при преобладании в клинике гипокинезии над тремором и ригидностью мода лежит в диапазоне от 9 до 40 Гц. Аналогично были определены диапазоны значений амплитудных характеристик тремора. Однако известно, что моносимптоматика у больных БП встречается редко и наблюдается обычно на начальных стадиях заболевания. Разработанная методика позволяет диагностировать как «чистые», так и «смешанные» формы БП.

Остановимся подробнее на выявлении ранних признаках БП. Исследование клинически здоровой стороны больных гемипаркинсонизмом показало, что уже на ранних этапах, когда отсутствуют внешние признаки заболевания, в спектрах ЭМГ в области низких частот, характерных для БП, появляются дополнительные низкоамплитудные пики. Наличие такого патологического пика совместного с пиком фи-

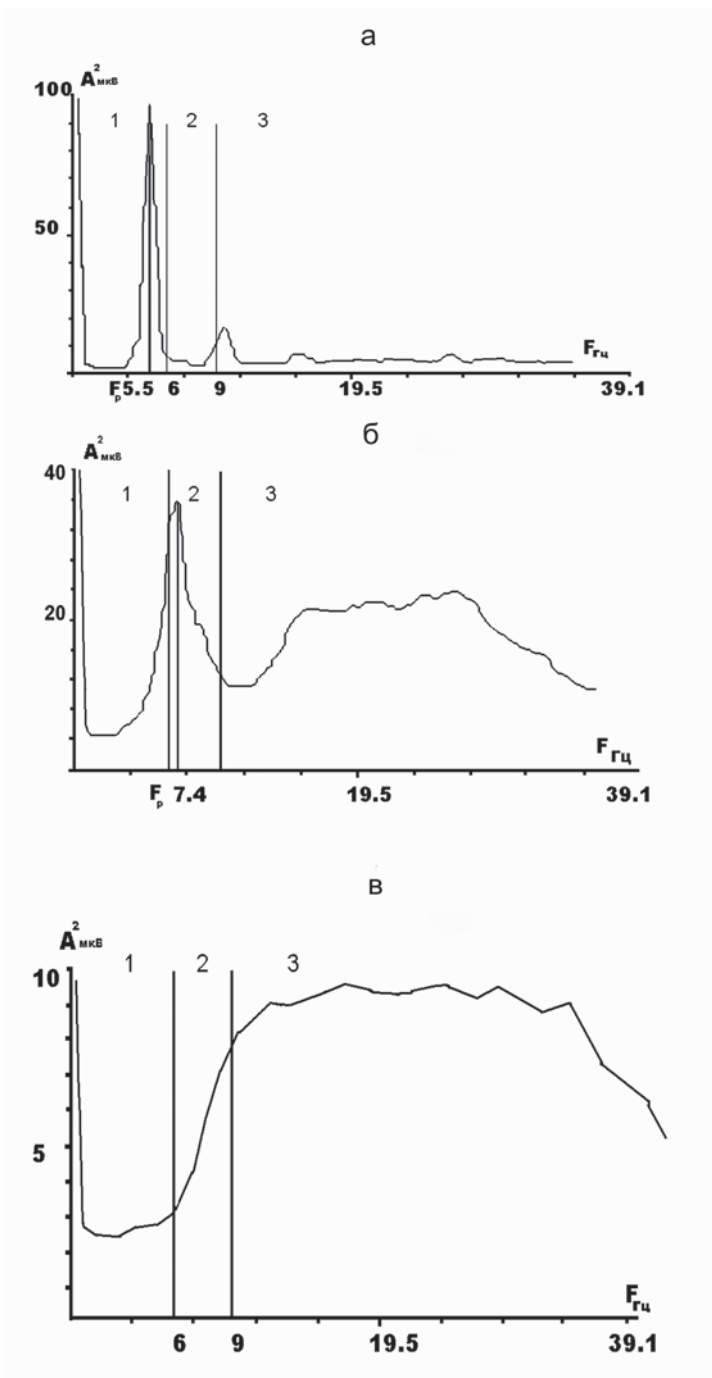


Рис. 2. Спектральные «портреты» ОЭМГ мышц лучезястного сустава больших БП с доминированием тремора (а), ригидности (б) и гипокинезии (в)

По оси ординат отложены значения частот (F), а по оси абсцисс значения мощности (A^2) частот спектра. На спектрах обозначены области нахождения пиков, характерных для симптомов дрожания (1), ригидности (2) и акинезии (3)

зиологического тремора не дает внешних проявлений заболевания, т.е. амплитуда патологического тремора настолько мала, что визуально он не заметен и врач его не диагностирует. При развитии динамики заболевания патологический пик растет по амплитуде и полностью замещает пик физиологического тремора. На этой стадии болезнь дает внешние проявления и клинически диагностируется. Таким образом, одним из ранних маркеров заболевания может служить низкоамплитудный пик в патологической области частот. На рис. 3 приведены примеры спектральных портретов ОЭМГ мышц клинически больной (правая сторона) и клинически интактной (левая сторона) больной М, 1935 г.р. (DS правосторонний гемипаркинсонизм, дрожательная форма). На рис. 3а показаны усредненные спектры ОЭМГ для мышц лучезапястных суставов, а на рис. 3б – для мышц голеностопных суставов правой и левой стороны. Как видно из приведенных «спектральных портретов», на правой стороне больной выделяется четкий пик в области 5,47 Гц. Среднее значение мощности этого пика для мышцы разгибателя лучезапястного сустава (CDE) 390 ± 95 мкВ², а мышцы разгибателя голеностопного сустава (TDE) 220 ± 34 мкВ². Коэффициент тремора K_m соответственно 47 и 38. Полученные значения диагностических маркеров четко указывают на дрожательную симптоматику, что и не противоречит клиническому диагнозу. В то же время, на клинически здоровой левой стороне также наблюдается пик в области 5,47 Гц. Мощность этого пика значительно меньше, чем на правой стороне ($5,9 \pm 2,1$ мкВ² – для мышцы лучезапястья и 41 ± 17 мкВ² – для мышцы голеностопа), поэтому визуально тремор на левой стороне не выявляется. Однако наличие этого патологического пика свидетельствует о начале заболевания и на левой стороне. Начальная стадия ригидно-акинетической симптоматики выявлена у другой больной – больная А, 1956 г.р., DS – правосторонний гемипаркинсонизм, дрожательная форма. На рис. 4 приведен спектральный «портрет» ОЭМГ мышц лучезапястного сустава обеих сторон этой больной. На правой стороне (CDE) отмечен пик $F_p = 5,47$ Гц мощностью $A_p^2 = 112$ мкВ², а на левой (CFE) – пик на частоте $F_p = 7,03$ Гц мощностью $A_p^2 = 2,82$ мкВ². Наряду с пиком небольшой мощности ($F_p = 7,03$ Гц) на спектре левой стороны отмечается характерное для гипокинезии равномерное плато.

Таким образом, обследования большого массива больных с различными формами и стадиями БП позволило установить соответствия количественных оценок определенных параметров электромиограммы, формам и стадиям заболевания.

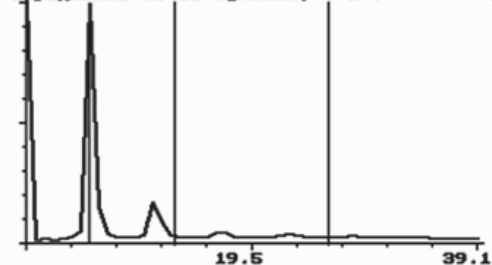
По разработанной методике проводились экспериментальные исследования еще двух форм экстрапирамидных расстройств – эссенциального тремора (ЭТ) и цервикальной дистонии (спастической кривошеи (СК)). Эти экстрапирамидные заболевания имеют схожую симптоматику, особенно на начальных стадиях заболевания. Обработка и анализ полученного экспериментального материала позволили получить и для этих заболеваний электромиографические маркеры (Иванова-Смоленская и др., 1986; Левин и др., 2006). Была создана компьютерная база данных, содержащая информацию об определенных параметрах спектральных оценок ОЭМГ, полученных при каждом обследовании больного. На основе метода, используя значения диагностических маркеров, была разработана приборно-компьютерная система (ПКС) диагностики, предназначенная для помощи врачам невропатологам и

ПРАВАЯ

ЛЕВАЯ

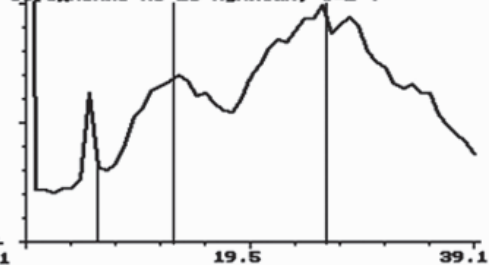
No 29.П, канал 1-СРЕ .

Усреднение по 28 пунктам; T=1 .



No 29.П, канал 2-СРЕ .

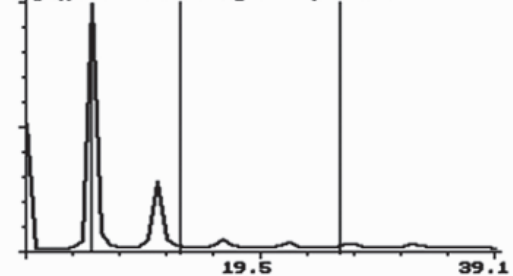
Усреднение по 28 пунктам; T=2 .



а

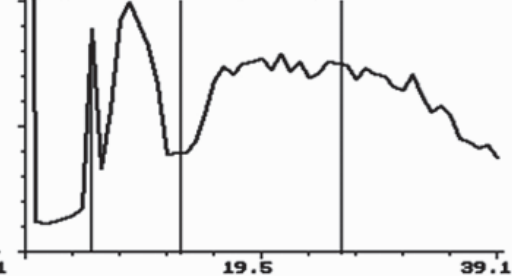
No 29.П, канал 3-ТРЕ .

Усреднение по 28 пунктам; T=1 .



No 29.П, канал 4-ТРЕ .

Усреднение по 28 пунктам; T=2 .



б

Рис. 3. Спектральные «портреты» ОЭМГ мышц лучезястного (а) и голеностопного (б) суставов правой и левой стороны больной М. с диагнозом гемипаркинсонизм

По оси ординат отложены значения частот (F), а по оси абсцисс значения мощности (A^2) частот спектра. На рисунке отмечен пик (F), выделенный в спектре

нейрохирургам в сложных случаях постановки диагноза, особенно на ранних стадиях заболевания, оценки эффективности фармакотерапии при ее индивидуальном подборе, оценки эффективности хирургических или иных форм лечения, а также прогноза динамики состояния больного (Хуторская, 2007).

ПКС состоит из базы данных пациентов и диагностического блока. В диагностическом блоке ПКС для диагноза болезни Паркинсона предусмотрена возможность автоматической диагностики основных симптомов заболевания для каждой исследуемой мышцы – тремора (T), ригидности (R) и акинезии (A). Таким образом, диагноз больного представляется как комбинация букв. Разные симптомы могут иметь, по оценке врача, одинаковую степень выраженности, один из симптомов

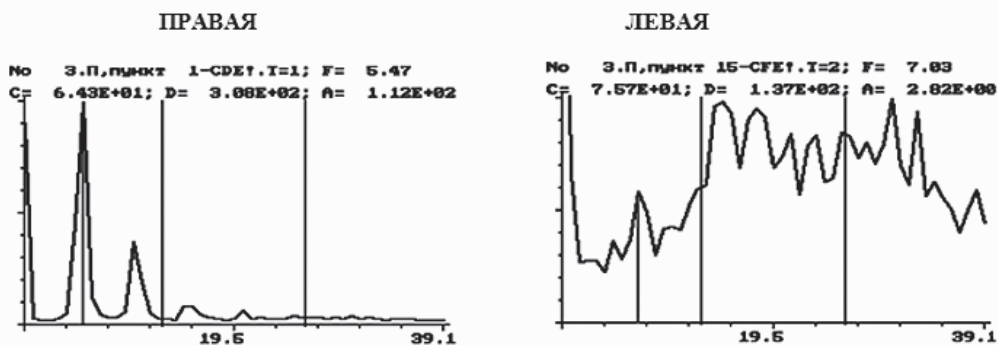


Рис. 4. Промежуточные спектры ОЭМГ мышц лучезапястного сустава правой (больной) и левой (клинически здоровой) стороны больной А

По оси ординат отложены значения частот (F), а по оси абсцисс мощности (A^2) частот спектра. Для каждого спектра выведены: N – номер больного; пункт записи; исследуемая мышца (CDE, CFE – мышцы лучезапястного сустава, соответственно правой и левой стороны.); значение частоты выделенного пика (F); значение среднего напряжения (тонуса) мышцы (C); общая мощность спектра (D); значение амплитуды выделенного пика (A)

может значительно преобладать, на каком-то суставе те или иные симптомы могут отсутствовать. Система для каждой мышцы больного выдает 1 или 2 буквы из набора T, R, A в зависимости от выраженности того или другого симптома. Если один из симптомов имеет сильное преобладание, выдается одна буква, обозначающая этот симптом. Если у больного одинаково выражены два симптома, выдается набор из 2 букв. Как правило, в таком случае один из 2 симптомов имеет некоторое преобладание, тогда соответствующая ему буква ставится на 1-е место. Кроме этого, система дает информацию о начальных проявлениях тремора и ригидности. Система, используя частотные характеристики тремора, может выдать информацию о наличии этого симптома даже в тех случаях, когда амплитуда патологического тремора мала.

Диагностические маркеры, на основе которых система диагностирует основную симптоматику, приведены в таблице. Корректность использованных для диагностики интервальных значений параметров была проверена специальными математическими моделями (Гусев, Хуторская, 2003).

База данных пациентов по запросу позволяет получить сведения о числе обследований конкретного пациента, сравнить изменения параметров в динамике развития заболевания или в процессе лечения больного. Для этого предусмотрен вывод параметров в графической форме.

Кроме болезни Паркинсона в ПКС на данном этапе включены эссенциальный тремор и спастическая кривошея. Для дифференциальной диагностики используются как вышеперечисленные маркеры, так и дополнительные (Khutorskaya, 2007). После обработки результатов электромиографического обследования больного система выдает не только симптом для каждой исследуемой мышцы, но и ставит предположительный диагноз, помогая врачу в принятии решения. На рис. 5



Рис. 5. Вид окна диагностики ПКС

представлено окно диагностики ПКС. В левой верхней части экрана приводится таблица обобщенных параметров для всех исследуемых мышц. В выпадающем меню справа от таблицы автоматически указывается диагноз, поставленный пациенту врачом при направлении на обследование, либо наиболее вероятный. Этот диагноз берется за основу и для него проводится проверка наличия симптомов для каждой исследуемой мышцы. Эти четыре симптома отражаются при загрузке окна диагностики в самой нижней строчке таблицы и на схематичном рисунке под ней. В текстовом окне справа от таблицы выводятся краткие сообщения, отражающие результаты дифференциальной диагностики.

ПКС предназначен для использования в неврологической клинике как система компьютерной диагностики ряда экстрапирамидных заболеваний, помогающая врачу поставить наиболее точный диагноз для своевременного и эффективного оказания медицинской помощи пациенту. Система производит диагностику для каждой исследуемой мышцы. Таким образом, диагноз устанавливается отдельно для каждого сустава, мышцы которого исследуются. Это дает преимущество над общей диагностикой врачей. Также она позволяет выделить те симптомы, которые находятся на ранней стадии проявления и еще не выявляются клиническими методами. ПКС позволяет просматривать динамику изменения состояния пациента как в численных характеристиках, так и в графической интерпретации. Система позволяет оценить эффективность различных форм лечения больных. В экспериментальных целях можно отслеживать влияние того или иного препарата на различные формы болезни Паркинсона. Также с ее помощью можно точнее подобрать курс лечения для конкретного пациента. Помимо всех диагностических функций в систему включена база данных обследуемых больных. На данном этапе приборно-компьютерный комплекс используется только для трех экстрапирамидных заболеваний: болезнь Паркинсона, эссенциальный тремор и цервикальная дистония (спастическая кривошея). Полученные для этих заболеваний диагностические маркеры были получены в результате длительных экспериментальных исследований и

накопления большого количества клинических исследований. Однако возможности системы могут быть расширены за счет включения диагностических маркеров, полученных для других экстрапирамидных заболеваний.

Литература

- Андреева Е.А., Хуторская О.Е.* Спектральный метод анализа электромиографической активности мышц. М.: Наука, 1987. 192 с.
- Богданов Р.Р., Турбина Л.Г., Хуторская О.Е.* Применение методики компьютерной СЭМГ для диагностики и контроля эффективности лечения начальных проявлений болезни Паркинсона // Альманах клинической медицины. Тематический выпуск: Современные технологии диагностики и лечения в неврологии. Ред. В.И. Шумский. М.: МОНИКИ, 2005. Т. VIII. Ч. 3. С. 124-129.
- Гусев Л. А., Хуторская О.Е.* Об одной оценке эффективности машины диагностики двигательных нарушений // А и Т. 2003. № 12. С. 112-121.
- Иванова-Смоленская И.А., Андреева Е.А., Смирнова С.Н., Хуторская О.Е., Кандель Э.И.* Спектральный электромиографический анализ эссенциального тремора // Журнал неврол. и псих. им. С.С. Корсакова. М.: Медицина, 1986. Т. 1. XXXVI. Вып. 7. С. 975-980.
- Левин О.С., Хуторская О.Е., Амосова Н.А., Смоленцева И.Г., Шток В.Н.* Клинико-электромиографический анализ особенностей паркинсонического синдрома при мультисистемной атрофии и болезни Паркинсона // Журнал неврол. и псих. им. С.С. Корсакова. 2003. № 11. С. 4-10.
- Левин О.С., Хуторская О.Е., Македонский П.В., Кондаков В.В.* Сравнительный клинико-электромиографический анализ дрожательного гиперкинеза у больных идиопатической цервикальной дистонией и эссенциальным тремором // Неврологический журнал. 2006. № 3. С. 20-25.
- Хуторская О.Е.* Индивидуальный подбор фармакотерапии при паркинсонизме с помощью компьютерной диагностики // Журнал неврол. и псих. им. С.С. Корсакова. 1998. № 12. С. 5-28.
- Хуторская О.Е.* Автоматизированная система ранней и дифференциальной диагностики клинических форм болезни Паркинсона // Проблемы управления. 2007. №1. С. 58-64.
- Шток В.Н., Федорова Н.В.* Лечение паркинсонизма. М., 1997. 194 с.
- Andreeva Ye.A., Khutorskaya O.Ye.* Application EMGs spectral analysis method for the objective diagnosis of different clinical forms of parkinson's disease // Electromyography and Clinical Neurophysiology. 1996. Vol. 36. № 3. P. 187-192.
- Khutorskaya O.Ye.* The automated system for early and differential diagnostics of the clinical forms of Parkinson's Disease // XVII WFN World Congress on Parkinson's Disease and Related Disorders, 9-13 December, 2007. Book of Abstracts. 2007.
- Khutorskaya O.Ye., Fjodorova N.V.* Application of the method of spectral-statistical analysis EMG for evaluating the influence of medication on the treatment of parkinson's disease // J. Electromyography and Clinical Neurophysiology. 1996. Vol. 36. № 5. P. 265-271.

Оценка периферических проявлений болезни Паркинсона – новый подход к созданию доклинической диагностики

Р.Р. Нигматуллина, З.А. Залялова, В.С. Кудрин, Т.С. Пронина, С.Г. Георгиева, Н.Е. Воробьева, Н.В. Сошникова, А.Н. Краснов, О.И. Кузьмина, М.В. Угрюмов

Содержание

1. Введение
2. Сердечно-сосудистые нарушения при БП
 - 2.1. Визуализация *in vivo* симпатической иннервации сердца
 - 2.2. Иммуногистохимические исследования
 - 2.3. Норадренергическая денервация сердца как доклинический маркер БП
3. Катехоламины и серотонин в плазме крови у пациентов при БП
4. Аминокислоты в плазме крови при БП
5. Пролактин и кортизол в плазме крови при БП
6. Молекулярные маркеры в клетках крови при БП
7. Заключение

1. Введение

Известно, что основным звеном патогенеза болезни Паркинсона (БП) является прогрессирующая дегенерация дофаминергических нейронов нигростриатной системы, что приводит к нарушению двигательной функции. В течение многих лет (20–30 лет) это заболевание развивается без проявления моторных симптомов на так называемой доклинической стадии, причем первые симптомы появляются у больных только после необратимой деградации большей части нигростриатной ДА-ергической системы, что и объясняет крайне низкую эффективность существующей терапии.

Лишь относительно недавно стало понятно, что БП – полигенное и системное заболевание. Это означает, что патологический процесс помимо нигростриатной ДА-ергической системы захватывает и ряд других отделов мозга, а также перифе-

Сокращения: ^{11}C -MНED – ^{11}C -meta-hydroxyephedrine; $^{123/125}\text{I}$ -MIBG – $^{123/125}\text{I}$ -Meta-iodobenzyl-guanidine; ^{18}F -FDA – ^{18}F -fluorodopamine; $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -FBPBAТ – $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -4-fluorobenzyl-4-(2-mercapto-2-methyl-4-azapentyl)-4-(2-mercapto-2-methylpropylamino)-piperidine; DRD₃ – дофаминовые рецепторы третьего типа; R-R – длительность R-R интервалов электрокардиограммы; А – адреналин; АКТГ – адренкортикотропный гормон; АТФ – аденозин-три-фосфорная кислота; БП – болезнь Паркинсона; VMAT₂ – везикулярный переносчик моноаминов; ДА – дофамин; ДАД – диастолическое артериальное давление; ДβГ – дофамин-бета-гидроксилаза; ДОФА – 3,4- диоксифенилаланин; ДДК – дофа-декарбоксилаза; ДОФУК – 3,4-диоксифенилуксусная кислота; КОМТ – катехол-о-метилтрансфераза; МНА – 3-О-метилнорадреналин; МОК – минутный объем крови; НА – норадреналин; НАТ – мембранный переносчик НА; ОГ – ортостатическая гипотензия; ПАД – пульсовое артериальное давление; ПРЛ – пролактин; ПЭТ – позитронно-эмиссионная томография; САД – систолическое артериальное давление; УОК – ударный объем крови; ЧСС – частота сердечных сокращений.

рическую нервную систему, что проявляется в нарушении немоторных функций и появлении у больных соответствующей немоторной симптоматики. Примерами могут служить нарушение обоняния и сна как проявление «немоторной» патологии мозга и нарушение перистальтики кишечника как проявление «немоторной» патологии внутренних органов. Есть достаточно оснований считать, что при БП некоторые отделы мозга и периферическая нервная система деградируют гораздо раньше, чем nigростриатная DA-ергическая система, что также рано приводит к нарушению немоторных функций мозга и внутренних органов и проявляется в изменении состава плазмы крови и ликвора (Mollenhauer, Zhang, 2012; Mahlkecht, Poewe, 2013; Parnetti et al., 2013; Sharma et al., 2013; Waragai et al., 2013; Goldstein, 2014; Katzenschlager, 2014).

Исходя из вышеизложенного, одной из важнейших задач современной неврологии, и данного комплексного исследования в частности, является анализ периферических проявлений БП с целью создания доклинической диагностики – задолго до нарушения моторной функции. При этом предполагается, что хотя бы часть признаков БП, выявленных на ранней клинической стадии, также характерна и для доклинической стадии, что может быть проверено с помощью позитронно-эмиссионной томографии. Эти исследования проводятся на больных сразу же после появления у них моторной симптоматики и до начала специфического лечения. В данном мультидисциплинарном исследовании, осуществленном коллективом сотрудников Институтов РАН (Институт биологии гена, Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова), РАМН (Институт фармакологии им. В.В. Закусова) и МЗ РФ (Казанский государственный медицинский университет), а также Республиканского Центра экстрапирамидной патологии и ботулинотерапии в Казани в рамках программы Президиума РАН «Фундаментальные науки – медицине», определяли содержание моноаминов и гормонов в крови, экспрессию генов в лимфоцитах у больных на ранней клинической стадии БП вскоре после появления моторных симптомов, но до начала специфического лечения.

2. Сердечно-сосудистые нарушения при БП

Существует по крайней мере три патофизиологических механизма сердечно-сосудистых вегетативных нарушений, встречающихся при БП. Первый – это гибель аксонов норадренергических нейронов, иннервирующих сердце, которая может начинаться до проявления двигательных расстройств у пациентов (Jain, Goldstein, 2012). Второй – экстракардиальная норадренергическая денервация, т.е. гибель тел норадренергических нейронов в паравертебральных ганглиях. По неизвестным причинам потеря экстракардиальной норадренергической иннервации при БП менее выражена, чем потеря аксонов. Третий механизм – недостаточная активность артериальных барорефлексов. При БП наблюдается значительное снижение не только симпатической, но и парасимпатической регуляции артериального барорефлекса, что приводит к возникновению ортостатической гипотензии (Vuob et al., 2010). О наличии нарушений парасимпатической регуляции сердца можно

судить по результатам пробы Вальсальвы и изменению variability сердечного ритма. Проба Вальсальвы включает анализ реакции артериального давления и частоты сердечных сокращений после форсированного выдыхания при закрытом носе и рте, при этом степень уменьшения времени между ударами сердца является мерой усиления парасимпатического влияния. Эти три механизма вместе приводят к снижению артериального давления крови при изменении положения тела (ортостатическая гипотензия), и наоборот, ортостатическая гипотензия является одним из ключевых признаков нарушения вегетативной регуляции сердечно-сосудистой системы при БП (Goldstein, 2014).

У пациентов при БП выраженность норадренергической денервации сердца может быть различна и не всегда проявляется функционально (Haensch et al., 2009). Это отчасти можно объяснить низкой чувствительностью методов оценки симпатической денервации. У пациентов с БП и денервацией сердца наблюдаются ортостатическая гипотензия, пониженная работоспособность, аритмия, одышка во время физической нагрузки, увеличение интервала PQ, уменьшение variability сердечного ритма и снижение концентрации норадреналина в плазме (Goldstein et al., 2000; Takatsu et al., 2000; Goldstein, 2003; Amino et al., 2005; Orimo et al., 2005a; Post et al., 2008). Нарушение вегетативной регуляции сердца может быть результатом не только снижения иннервации сердца, но также и снижения концентрации циркулирующих катехоламинов.

Ортостатическая гипотензия проявляется как падение систолического и диастолического давления крови более чем на 20 и 10 мм рт. ст. соответственно после 3–5 минут изменения положения тела из горизонтального в вертикальное (Schatz, 1996; Goldstein et al., 2003a). Распространенность ортостатической гипотензии у пациентов с БП значительно варьирует и составляет по данным различных авторов от 30% до 58% (Goldstein et al., 2003b; Allcock et al., 2004; Goldstein et al., 2006a; Velseboer et al., 2011). У 38,5% пациентов ортостатическая гипотензия протекает без симптомов (Senard et al., 1997). Практически у всех пациентов с БП и с ортостатической гипотензией наблюдается в разной степени выраженное снижение норадренергической иннервации сердца, среди оставшихся пациентов с БП, но без ортостатической гипотензии в 50% случаев также выявляется денервация сердца (Goldstein et al., 2007a). Предполагается, что симптомы денервации сердца, такие как ортостатическая неустойчивость, проявляются у пациентов после превышения определенного порога денервации сердца, который, однако, количественно не определен (Goldstein et al., 2007a). Распространенность и тяжесть ортостатической гипотензии увеличиваются у пациентов с БП, принимающих противопаркинсонические препараты, например леводопу (Luther, 2012).

Как правило, исследователи описывают нарушения вегетативной регуляции сердца у пациентов при БП только по частоте сердечных сокращений и величине артериального давления. Вместе с тем, основная функция сердца – насосная, показателями которой являются ударный и минутный объем крови, частота сердечных сокращений, причем эта функция также регулируется вегетативной нервной системой.

Авторы статьи – Р.Р. Нигматуллина и О.И. Кузьмина на кафедре нормальной физиологии Казанского государственного медицинского университета провели ис-

следование насосной функции сердца и реакции ее показателей на ортостатическую пробу у нелеченых пациентов с дрожательной и ригидной формой БП, которые находились на ранней клинической стадии (1–1,5 стадии по (Hoehn, Yahr, 1967)). Отбор пациентов и испытуемых группы контроля для исследования был произведен в Республиканском Центре экстрапирамидной патологии и ботулинотерапии под руководством З.А. Заляловой. Критерии включения испытуемых в группу контроля: относительно здоровые пациенты; отсутствие клинических признаков экстрапирамидных заболеваний; отсутствие неврологического дефицита и/или острого нарушения мозгового кровообращения за последние два года; отсутствие клинически значимых эндокринных заболеваний; отсутствие психиатрических, неврологических или поведенческих расстройств; отсутствие болезни Альцгеймера или других состояний, включающих значимые когнитивные нарушения или деменцию; отсутствие клинически значимых аномальных лабораторных данных, например аспартат аминотрансфераза или аланин аминотрансфераза, превышающие больше чем в три раза верхнюю границу нормы при скрининге; отсутствие текущего доказательства клинически значимого гематологического, аутоиммунного, сердечно-сосудистого, почечного или желудочно-кишечного расстройства; отсутствие любого злокачественного заболевания или новообразования в анамнезе; не принимающие медикаменты, которые могут повлиять на моноаминовую трансмиссию: препараты леводопы, агонисты дофаминовых рецепторов, ингибиторы МАО-А и В, амантадин, антидепрессанты, нейролептики (классические и атипичные), препараты с нейролептическими свойствами (метоклопрамид, домперидон, циннаризин и др.), симпатолитики (резерпин), агонисты и антагонисты серотонина, агонисты и антагонисты аденозиновых рецепторов, пиридоксин и др. Критерии включения пациентов в исследование: возможный или вероятный диагноз идиопатической БП в соответствии с Критериями Банка Мозга Общества Болезни Паркинсона Великобритании (UKPDS); 1–2 стадии БП по (Hoehn, Yahr, 1967); пациенты не должны получать в настоящее время или в прошлом специфической противопаркинсонической терапии; пациент должен понять природу исследования и дать письменное информированное согласие до начала проведения любых исследовательских мероприятий; клинически здоровые пациенты.

Классификация прогрессирования БП по стадиям (с 1 по 5) была предложена в 1967 г. (Hoehn, Yahr, 1967). Впоследствии шкалу модифицировали, дополнив ее стадиями 0, 1,5 и 2,5 (Goetz et al., 2004). Согласно данной классификации, на стадии 0 нет признаков заболевания, на стадии 1 симптомы проявляются на одной из конечностей, на стадии 1,5 симптоматика проявляется на одной из конечностей и туловище. При дальнейшем прогрессировании заболевания на стадии 2 наступают двусторонние проявления нарушения моторики без постуральной неустойчивости, а на стадии 2,5 присоединяется постуральная неустойчивость. На стадии 3 наблюдаются двусторонние проявления болезни, постуральная неустойчивость, однако больной все еще способен к самообслуживанию. Существенно снижается качество жизни у пациентов на 4 стадии. При этом наблюдаются обездвиженность, потребность в посторонней помощи, больной не способен ходить и/или стоять без поддержки. На 5 стадии наступает тяжелая инвалидизация, когда больной прикован к постели.

Различают несколько клинических форм заболевания – ригидную, дрожатель-но-ригидную и дрожательную (Гусев и др., 2000). Ригидная форма характеризуется повышением тонуса мышц, прогрессирующим замедлением активных движений вплоть до обездвиженности. Появляются мышечные контрактуры и становится характерной «поза манекена» («поза просителя»). Для дрожательной формы характерно наличие постоянного или почти постоянного тремора конечностей, языка, головы, нижней челюсти. Тонус мышц при этом нормальный или несколько повышен при сохранении темпа произвольных движений. Дрожательно-ригидная форма характеризуется тремором конечностей, преимущественно их дистальных отделов, к которому присоединяется скованность произвольных движений.

Нами при обследовании нелеченых пациентов на ранней клинической стадии БП (1–1,5) по (Hoehn, Yahr, 1967) впервые выявлено, что при дрожательной форме ударный и минутный объемы крови снижены относительно показателей группы контроля, в то время как при ригидной форме минутный объем крови и частота сердечных сокращений увеличены (табл. 1).

Действительно, в литературе мы не нашли указаний на то, что имеются какие-либо различия в показателях насосной функции сердца при ригидной или дрожательной форме БП. Следует отметить, что показатели частоты сердцебиения и минутный объем крови у пациентов с дрожательной формой БП выше, чем у пациентов с ригидной формой. Согласно полученным нами результатам, показатели систолического, диастолического и пульсового артериального давления крови у пациентов на ранней клинической стадии не отличаются от величин у испытуемых группы контроля (см. табл. 1). О наличии денервации сердца при БП можно судить по результатам выполнения ортостатической пробы. Результаты проведенных нами исследований и сведения из литературных источников об изменении абсолютных показателей насосной функции сердца при выполнении ортостатической пробы нелечеными и лечеными пациентами с БП представлены в табл. 2. Следует отметить, что у пациентов с БП как с наличием, так и при отсутствии ортостатической гипотензии, снижен по сравнению с контролем захват радиолиганда ^{123}I -MIBG, который отражает активность мембранного переносчика норадреналина и при позитронно-эмиссионной томографии используется для визуализации симпатической иннервации сердца (Ока et al., 2007). Эти данные свидетельствуют о снижении норадренергической иннервации сердца при БП (см. табл. 2).

Таблица 1

Изменение показателей насосной функции сердца у пациентов на ранней клинической стадии БП с дрожательной и ригидной формами по сравнению с контролем

Показатели	Дрожательная форма БП	Ригидная форма БП
Частота сердечных сокращений	→	↑
Ударный объем крови	↓	→
Минутный объем крови	↓	↑
Систолическое артериальное давление крови	→	→
Диастолическое артериальное давление крови	→	→
Пульсовое артериальное давление крови	→	→

Насосная функция сердца нелеченых и леченых пациентов с БП при ортопробе

Автор	Пациенты	Положение тела	САД, мм рт. ст БП/конт- роль	ДАД, мм рт. ст БП/конт- роль	ПАД, мм рт. ст БП/конт- роль	ЧСС, уд/мин БП/контроль	R-R, С БП/контроль	УОК, мл БП/конт- роль	МОК, л БП/конт- роль	¹²³ I-MIBG БП/конт- роль
Bohndel et al., 2004	БП нелеченые I стадия Х&Я	лежа	129/128	64/63	63/65	72/66				
		стоя	138/141*	80/74*	60*/65	82*/76*				
Нигматуллина и др., 2014	БП I ст. Х&Я дрожательная	лежа	137/129	84/78	54/51	71/67		35/47	2,6/3,2	
		стоя	145/134	93/88	52/45	82*/79*		40/36*	3,3*/2,7*	
		лежа	130/129	81/78	49/51	75/67		46/47	3,4/3,2	
Senard, et al., 1995	БП I ст. Х&Я ригидная	стоя	131/134	88/88	42/45	79*/79*		50/36*	4,2*/2,7*	
		лежа	126	69		81				
		стоя	139*	80*		92*				
Oka et al., 2007	БП - ОГ леченые	лежа	125/125	70/75			0,88/0,83			1,78/2,55#
		стоя	121/129	71/82#			0,83/0,73#			
		лежа	137/125	73/75			0,89/0,83			
	БП + ОГ леченые	стоя	110/129#	62/82#			0,89/0,73#			

* – статистически значимые различия лежа-стоя (p<0,05); # – статистически значимые различия с контролем (p<0,05).

САД – систолическое артериальное давление крови, ДАД – диастолическое артериальное давление крови, ПАД – пульсовое артериальное давление крови, ЧСС – частота сердечных сокращений, УОК – ударный объем крови, МОК – минутный объем крови, ОГ – ортостатическая гипотензия, I ст. Х&Я – первая стадия по Хен-Яру, R-R – длительность интервалов электрокардиограммы

Реакция показателей насосной функции сердца пациентов с БП при ортопробе

Автор	Пациенты	САД, мм рт. ст	ДАД, мм рт. ст	ПАД, мм рт. ст	ЧСС, уд/мин	R-R, с	УОК, мл	МОК, л
Bouhaddi et al., 2004	БП 1 ст. Х&Я нелеченные	↑ 7%	↑ 25%	↓ 5%*	↑ 14%*			
	Контроль	↑10%*	↑ 18%*	0%	↑ 15%*			
Нигматуллина и др., в печати	БП 1 ст. Х&Я дрожат	↑ 6%	↑ 11%	↓ 4%	↑ 16%*		↑ 14%	↑ 27%*
	БП 1 ст. Х&Я ригидная	0%	↑ 9%	↓ 14%	↑ 5%*		↑ 9%	↑ 24%*
	контроль	↑ 4%	↑ 13%	↓ 12%	↑ 18%*		↓ 23%*	↓ 16%*
Senard et al., 1995	БП нелеченные	↑ 10%*	↑ 3%*		↑ 14%*			
Oka et al., 2007	БП - ОГ леченные	↓ 3%	0%			↓ 6%		
	БП + ОГ леченные	↓ 20%*	↓ 15%*			0%		
	Контроль	↑ 3%	↑ 9%*			↓ 12%*		

При выполнении ортостатической пробы у нелеченых пациентов с БП систолическое артериальное давление крови увеличивается на 10% (Senard et al., 1995) (табл. 3), а у леченых пациентов с БП наблюдается обратный процесс – уменьшение этого показателя до 20% (Oka et al., 2007) (см. табл. 3). Следовательно, подтверждается, что при лечении антипаркинсоническими препаратами у пациентов развивается ортостатическая гипотензия. У испытуемых группы контроля при ортопробе САД увеличивается до 10% (Bouhaddi et al., 2004) (см. табл. 3). ДАД при ортостатической пробе у нелеченых пациентов с БП увеличиваются от 3% до 25%, а у леченых с ортостатической гипотензией снижается на 15% (см. табл. 3). Одновременно у испытуемых группы контроля происходит увеличение ДАД от 9% до 18%. Увеличение ЧСС при ортостатической пробе у пациентов с БП менее выражено по сравнению с контролем (см. табл. 2, 3), что свидетельствует об уменьшении симпатических влияний.

Нами установлено, что реакции ударного и минутного объемов крови на ортостатическую пробу у пациентов с БП диаметрально противоположны изменениям в контроле (см. табл. 2, 3). У пациентов с дрожательной формой БП УОК и МОК увеличиваются соответственно на 14% и 27%, причем эти показатели выше, чем у пациентов с ригидной формой БП. В группе контроля при ортопробе УОК

и МОК снизились соответственно на 23% и 16%. Нами выявлено, что у 35–40% пациентов на ранней клинической стадии БП при выполнении ортостатической пробы происходит снижение систолического артериального давления крови, т.е. наблюдается ортостатическая гипотензия. При БП, по сравнению с контрольной группой, симпатические сердечно-сосудистые реакции затруднены в связи со снижением ударного объема. Выявленные изменения свидетельствуют о нарушении в работе сердечно-сосудистой системы и ее норадренергической регуляции (которая в норме активируется при ортостатической пробе) у пациентов на первой стадии БП. Выявленные изменения в сердечно-сосудистой системе коррелируют с формой заболевания.

Недостаточность артериальных барорефлексов при БП с ортостатической гипотензией обусловлена как вагусными, так и симпатическими механизмами регуляции сердечного выброса. Например, в течение ортостаза прирост норадреналина в плазме (мера прироста симпатического влияния) становится не очень выраженным. Эти аномалии присутствуют независимо от лечения леводопой (Goldstein et al., 2005).

У пациентов с БП наблюдается нарушение регуляции электрической активности сердца, что ставит их перед угрозой развития сердечных аритмий. Удлинение скорректированного по частоте сердечных сокращений интервала QT (QT_c), соответствующего деполяризации и реполяризации желудочков, коррелирует со смертностью от сердечно-сосудистых заболеваний и наблюдается у пациентов с БП (Oka et al., 1997; Deguchi et al., 2002). Выявлена взаимосвязь QT_c со стадиями по Хен и Яр и длительностью заболевания (Deguchi et al., 2002).

Нарушение электрической активности сердца может привести к изменениям в ритмичности сердечной деятельности, которая регулируется как симпатическими, так и парасимпатическими механизмами. Этот баланс может быть выявлен анализом вариабельности сердечного ритма, которая при БП снижена и продолжает снижаться по мере прогрессирования заболевания, что еще раз подтверждает вовлечение периферической симпатической системы в БП (Bordet et al., 1996; Mastrocola et al., 1999; Naaraniemi et al., 2001; Devos et al., 2003). Важно отметить, что уменьшение вариабельности сердечного ритма может иметь опасные для жизни последствия (Kleiger et al., 1987; Bigger et al., 1992).

2.1. Визуализация *in vivo* симпатической иннервации сердца

Во многих исследованиях с помощью позитронно-эмиссионной томографии получены данные о том, что при БП норадренергическая иннервация миокарда снижается. На рис. 1 представлены клеточные мишени радиолигандов, которые применяются для визуализации симпатической иннервации сердца.

По данным ПЭТ, от 50% до 100% пациентов с БП и ортостатической гипотензией имеют заметное снижение симпатической норадренергической иннервации миокарда левого желудочка (Li et al., 2002; Goldstein, Orimo, 2009). Эти результаты согласуются с данными, полученными на патологоанатомическом материале с по-

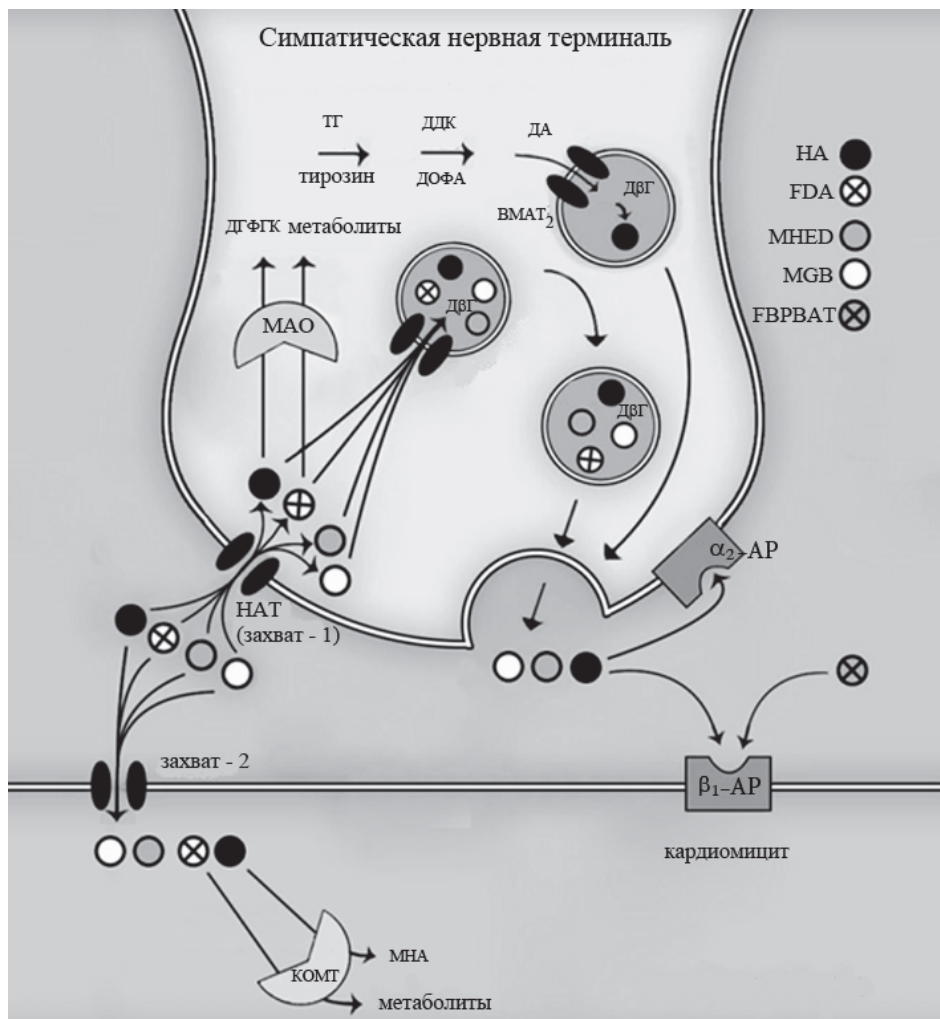


Рис. 1. Клеточные мишени радиолигандов для визуализации симпатической иннервации сердца (Joers, Emborg, 2014)

Норадреналин (НА) образуется из дофамина (ДА) при участии фермента дофамин-β-гидроксилаза (ДВГ) в везикулах катехоламинергических нейронов. Затем НА секретируется в синаптическую щель и может быть перенесен обратно в нервное окончание мембранным переносчиком НА (НАТ) или связаться с α₂- или β₁-адренорецепторами (АР), может быть перенесен в кардиомиоцит или диффундировать в кровь. Подобно обратному захвату НА, радиолиганды ^{123/125}I-MIBG, ¹⁸F-FDA и ¹¹C-MNED могут быть перенесены в симпатическое нервное окончание НАТ (захват-1). Затем в симпатической нервной терминали моноаминоксидаза (МАО) может гидролизовать НА и ¹⁸F-FDA соответственно до 3,4-дигидроксифенил-2-гликолевой кислоты (ДГФГК)/метаболитов или ^{123/125}I-MIBG и MNED упаковываются в синаптические везикулы везикулярным переносчиком моноаминов (ВМАТ₂). После активации нейрона НА и радиолиганды, которые не подверглись воздействию ДВГ (такие как ¹⁸F-FDA), высвобождаются по механизму экзоцитоза в синаптическую щель. С другой стороны, радиолиганды ^{123/125}I-MIBG, ¹⁸F-FDA и ¹¹C-MNED могут быть по механизму захват-2 перенесены в не-нервные клетки, например в кардиомиоциты. В этих клетках НА и ¹⁸F-FDA могут быть гидролизованы ферментом катехол-о-метилтрансфераза (КОМТ). ^{99m}Tc-FВРВАТ связывается с β₁-адренорецепторами и активирует постсинаптические кардиомиоциты ДДК-дофа-декарбоксилаза. МНА – 3-О-метилнорадреналин

мощью иммуноцитохимического окрашивания тирозингидроксилазы, нейрофиламентов и белка S-100 в ткани эпикарда (Orimo et al., 2002; Amino et al., 2005; Orimo et al., 2005b).

Чувствительность радиолиганда $^{123/125}\text{I-MIBG}$, который отражает активность мембранного переносчика норадреналина, для обнаружения БП составляет 89% и специфичность для дифференцировки БП от множественной системной атрофии достигает 77% (Treglia et al., 2012). Тем не менее, взаимосвязь между поглощением сердцем $^{123}\text{I-MIBG}$, стадией и продолжительностью БП не ясна (Taki et al., 2000). Вместе с тем, показано, что у 55% испытуемых уже на ранней стадии БП показатели захвата $^{123}\text{I-MIBG}$ низкие (Orimo et al., 1999; Takatsu et al., 2000), что свидетельствует о снижении норадренергической иннервации сердца.

Поглощение радиолиганда $^{18}\text{F-FDA}$ снижено у пациентов с БП по сравнению с контролем (Goldstein et al., 1997, 2000b, 2007a,b; Li et al., 2002; Tiple, Goldstein, 2005), что свидетельствует о снижении синтеза НА. Локальная денервация выявлена в свободной стенке и верхушке левого желудочка по сравнению с межжелудочковой перегородкой (Tiple, Goldstein, 2005). Прогрессирующее снижение поглощения сердцем $^{18}\text{F-FDA}$ было показано у пациента с БП без признаков дисавтономии в течение 1–4 лет, причем оно наблюдалось на доклинической стадии заболевания. Общее снижение иннервации составило в среднем 23%, в то время как региональный анализ показал максимальное снижение на 31% в свободной стенке левого желудочка и 16% в межжелудочковой перегородке (Li et al., 2002). Эти данные позволяют предположить, что симпатическая денервация сердца может происходить без клинически выраженных симптомов. В этой связи изменения в захвате сердцем $^{18}\text{F-FDA}$, вероятно, предшествуют проявлению моторной дисфункции, связанной с гибелью дофаминергических нейронов в черной субстанции. Снижение захвата $^{18}\text{F-FDA}$, непереносимость физической нагрузки и ортостатическая неустойчивость были выявлены за 4 года до появления моторных симптомов БП (Goldstein et al., 2007a). У пациента с генетической мутацией LRRK2 T2356I (Goldstein et al., 2007b) и 2 пациентов с трипликацией гена α -синуклеина (Singleton et al., 2004) практически отсутствует поглощение $^{18}\text{F-FDA}$ сердцем, что свидетельствует о наличии тяжелой десимпатизации сердца.

2.2. Иммуногистохимические исследования

Иммуноцитохимические патологоанатомические данные хорошо согласуются и дополняют данные, полученные при ПЭТ. Иммунореактивность к тирозингидроксилазе коррелирует со стадией по (Hoehn, Yahr, 1967) (-0,61) и длительностью заболевания (-0,63). Иммуногистохимия на α -синуклеин выявила его наличие при БП в эпикарде и не выявила его в сердце контрольных испытуемых. Плотность нервных волокон с α -синуклеином коррелирует со стадией Хен-Яра (0,44) и длительностью заболевания (0,42). Следовательно, симпатическая денервация сердца и α -синуклеинопатия присутствуют на досимптомной стадии БП, причем оба показателя усиливаются по мере увеличения продолжительности заболевания и его

тяжести (Fujishiro et al., 2008). Наибольшая плотность тирозингидроксилаза-иммунореактивных нервных волокон выявлена в передней свободной стенке левого желудочка человека (Kawano et al., 2003). В посмертных исследованиях уменьшение количества тирозингидроксилаза-иммунореактивного вещества выявлено в нервных волокнах эпикарда пациентов с БП, у которых при жизни был снижен захват ^{123}I -MIBG при сравнении с испытуемыми группы контроля (Orimo et al., 2001; Mitsui et al., 2006). Когда у здоровых людей с наличием телец Леви иммуногистохимически выявляется симпатическая денервация сердца, это рассматривается как доклиническая стадия БП (Orimo et al., 2007b).

Тельца Леви с дистрофичными нейритами, содержащими α -синуклеин, были выявлены в симпатических нервах сердечного сплетения в постганглионарных нейронах у подверженных болезни людей (Orimo et al., 2008), свидетельствуя, что α -синуклеинопатия может также являться немоторным клиническим проявлением заболевания. Симпатическая денервация и α -синуклеинопатия выявлены в посмертных образцах сердец от пациентов с увеличенной копийностью гена α -синуклеина (Singleton et al., 2004; Orimo et al., 2008). При всех α -синуклеинопатиях (идиопатическая БП, множественная системная атрофия, деменция с тельцами Леви и полная потеря автономной регуляции) часто наблюдается автономная дисфункция, что свидетельствует о корреляции между накоплением α -синуклеина и десимпатизацией (Poewe, 2008).

Альфа-синуклеинопатия приводит к деградации симпатической нервной системы, десимпатизации внутренних органов и нарушению их функций (Wakabayashi, Takahashi, 1996; Bloch et al., 2006; Fumimura et al., 2007). Выявлено накопление α -синуклеина в нервных волокнах эпикарда по мере прогрессирования заболевания (Fujishiro et al., 2008). С помощью двойного иммуноцитохимического мечения показана колокализация тирозингидроксилазы и α -синуклеина в нейронах. При БП наблюдается множество α -синуклеин-иммунореактивных нейритов и в различной мере сниженная иммунореактивность тирозингидроксилазных нервных волокон. Это означает, что α -синуклеин накапливается в нервных волокнах со сниженной иммунореактивностью к тирозингидроксилазе. У пациентов с БП и ортостатической гипотензией выявлено значительное уменьшение тирозингидроксилазы в эпикарде (Fujishiro et al., 2008). Ранние клинические стадии БП характеризуются снижением плотности тирозингидроксилаза-иммунопозитивных нервных волокон в эпикарде (Orimo et al., 2007a). Симпатическая денервация сердца предшествует накоплению α -синуклеина. У пациентов с БП и ортостатической гипотензией иммунореактивность к тирозингидроксилазе в эпикарде более выражена по сравнению с пациентами без ортостатической гипотензии. Этот результат находится в соответствии с визуализационными методами исследования сердца (Courbon et al., 2003).

2.3. Норадренергическая денервация сердца как доклинический маркер БП

У пациентов с БП денервация наблюдается в области верхушки сердца или

нижнебоковой стенки левого желудочка, в то время как иннервация межжелудочковой перегородки остается без изменений. В ПЭТ-исследовании с радиолигандом ^{18}F -FDA показано, что в течение нескольких лет потеря симпатических нервов прогрессирует, при этом денервируются все более обширные участки миокарда (Li et al., 2002). Хотя денервация сердца может предшествовать моторным расстройствам при БП, она может проявиться и на более поздних стадиях БП. В литературе описан случай, когда нейровизуализация выявила симпатическую денервацию сердца за четыре года до появления моторных расстройств (Goldstein et al., 2007a). В другом исследовании также сначала выявлена денервация сердца у пациента с ортостатической гипотензией, и лишь впоследствии у него развился паркинсонизм (Goldstein, 2006a). Более детальная хронология развития БП приведена в работе (Goldstein et al., 2012), авторы которой за два года до небольшого снижения включения ^{18}F -FDA в путамен и возникновения зрительных галлюцинаций выявили ортостатическую гипотензию и норадренергическую денервацию сердца. В течение четырех лет у исследуемого больного уменьшилось включение ^{18}F -FDA в путамен и появились признаки деменции, но все еще не было нарушений моторики. Эти случаи доказывают, что норадренергическая денервация сердца возникает за несколько лет до появления нарушений моторики и появления признаков ДА-ергической денервации стриатума. Есть и противоположные наблюдения, когда при БП у пациентов сохраняется нормальная симпатическая иннервация сердца в течение приблизительно десяти лет, после того как с помощью ПЭТ была зарегистрирована ДА-ергическая денервация стриатума. Очаговая десимпатизация левого желудочка, выявленная по снижению включения ^{18}F -FDA, впервые была отмечена через 8 лет, а через два года наступила общая десимпатизация (Goldstein et al., 2011).

3. Катехоламины и серотонин в плазме крови у пациентов при БП

Учитывая обширную деградацию серотонинергической и катехоламинергической систем мозга, нарушение гематоэнцефалического барьера и деградацию симпатической нервной системы, логично ожидать количественных изменений в содержании классических нейротрансмиттеров – катехоламинов, серотонина и их метаболитов в периферической крови. Этому вопросу посвящено исследование, проведенное в Институте фармакологии им. В.В. Закусова под руководством заведующего лабораторией нейрорхимической фармакологии В.С. Кудрина и на кафедре нормальной физиологии Казанского государственного медицинского университета Р.Р. Нигматуллиной. Действительно, снижение концентрации норадреналина в плазме в состоянии покоя выявлено как у нелеченых пациентов с БП, имеющих ортостатическую гипотензию (Goldstein et al., 2003b), так и у леченых пациентов с БП и ортостатической гипотензией (Oka et al., 2007) по сравнению с контролем (табл. 4). Тем не менее, другие авторы не показали существенной разницы в концентрациях норадреналина в покое при БП с ортостатической гипотензией или даже выявили увеличение у пациентов с БП без ортостатической гипотензии при сравне-

Катехоламины, их предшественники и метаболиты в плазме крови при БП

Автор	Пациенты	НА	А	ДА	ДОФА
Bouhaddi et al., 2004	БП нелеченые 1 ст. X&Я	→	→	→	
Goldstein et al., 2003a	БП + ОГ нелеченые	↓			
	БП - ОГ нелеченые	↓			
Belikova et al., 2013	БП нелеченые	→	↓	↓	↓
Oka et al., 2007	БП - ОГ леченые	→			
	БП + ОГ леченые	↓			

НА – норадреналин, А – адреналин, ДА – дофамин, ДОФА – 3,4 диоксифенилаланин, ОГ – ортостатическая гипотензия

нии с такими же по возрасту испытуемыми в группе контроля (Ahlskog et al., 1996; Bouhaddi et al., 2004). В нашем исследовании показано, что концентрация НА в крови снижается при БП, причем в гораздо большей степени у больных с ригидной формой, чем у больных с дрожательной формой (Nigmatullina et al., 2013) (табл. 5).

Концентрация в плазме крови адреналина, имеющего надпочечниковую природу, снижена у нелеченых пациентов с БП (Belikova et al., 2013) (см. табл. 4). До сих пор не исследовали концентрации моноаминов в крови у пациентов с БП в зависимости от формы заболевания. Нами выявлено снижение концентрации адреналина у пациентов с ригидной формой БП (см. табл. 5). Нормальный уровень адреналина и его метаболита метанефрина выявлены в покое у пациентов с БП и ортостатической гипотензией и низким уровнем норадреналина (Senard et al., 1990). При ортостатической пробе уровень норадреналина в плазме увеличился более чем на 60% у 11 из 18 пациентов с БП без ортостатической гипотензии по сравнению со 100% в контрольной группе, в то время как пациенты с БП и ортостатической гипотензией не имеют схожих изменений (Goldstein et al., 2002).

Концентрация дофамина в плазме крови не отличается существенно у нелеченых пациентов с БП от испытуемых группы контроля, в которую входили люди, сопоставимые по возрасту, полу, без неврологической патологии (Bouhaddi et al., 2004). Однако в другом исследовании показано статистически значимое снижение концентрации дофамина у нелеченых пациентов с БП (Belikova et al., 2013). В нашем исследовании выявлено существенное снижение концентрации дофамина только у пациентов с ригидной формой БП (см. табл. 5). Вместе с тем, концентрация L-ДОФА – предшественника синтеза дофамина, существенно снижена как при дрожательной, так и при ригидной форме БП (см. табл. 5).

Изменение концентрации катехоламинов и серотонина, их предшественников и метаболитов в плазме крови у пациентов с дрожательной и ригидной формой БП (по сравнению с контролем)

Показатель	Дрожательная форма БП	Ригидная форма БП
норадреналин	↓	↓
адреналин	→	↓
дофамин	→	↓
3,4- диоксифенилаланин	↓	↓
3,4 – диоксифенилуксусная кислота	→	↓
серотонин	↓	↓
5-гидроксииндолуксусная кислота	↓	→
гомованилиновая кислота	→	→
5-ГИУК/ГВК	→	↑

Концентрация в плазме ДОФУК, продукта деградации дофамина, значимо снижена у пациентов с ригидной формой БП (табл. 5). Соотношение ДОФУК/ДА, определяющее скорость утилизации нейротрансмиттера в плазме крови и в тканях выше у больных с дрожательной формой и ниже у больных с ригидной формой БП. Полученные данные свидетельствуют о том, что изменения концентрации L-ДОФА, НА, ДОФУК и ДА происходят уже на ранней клинической стадии БП и зависят от формы заболевания – дрожательная или ригидная. Эти данные позволяют в перспективе проверить с помощью ПЭТ, характерны ли указанные изменения концентрации катехоламинов и метаболитов в плазме не только для ранней клинической стадии, но и для доклинической стадии БП.

Согласно результатам Д. Гольдштейна с соавторами (Goldstein et al., 2003b), у пациентов с БП самая большая потеря норадренергической иннервации происходит в сердце, а не в организме в целом. Объясняя возможную причину кардиоселективности норадренергической денервации при БП эти авторы пишут о том, что миокард содержит высокую концентрацию норадреналина. В сердце относительно плотная симпатическая иннервация; здесь образуется больше дигидроксиминдальной кислоты, продукта окисления норадреналина, чем в других органах, что указывает на высокую скорость образования. Помимо изменения уровня катехоламинов в плазме у больных при дрожательной и ригидной форме БП происходит снижение концентрации серотонина и его метаболитов в плазме крови (см. табл. 5).

4. Аминокислоты в плазме крови при БП

Так как болезнь Паркинсона является системным заболеванием, помимо гибели центральных и периферических катехоламинергических нейронов происходят нарушения и в других нейротрансмиттерных системах. Биохимическими маркерами нейродегенеративного процесса, определяемыми в крови, могут быть помимо катехоламинов и серотонина физиологически активные аминокислоты, такие как

ГАМК, глицин, таурин, глутамат и аспаргат. В литературе отсутствует однозначный ответ о том, как изменяется концентрация этих аминокислот в крови пациентов на ранней клинической стадии БП, особенно в зависимости от формы заболевания. Тем не менее, в нашем исследовании выявлено, что на ранней клинической стадии БП происходит увеличение концентрации возбуждающей аминокислоты аспартата в крови, что выражено в большей степени у больных с дрожательной, чем с ригидной формой БП (табл. 6).

Таблица 6

Изменение концентрации аминокислот в плазме крови пациентов с дрожательной и ригидной формой БП (по сравнению с контролем)

Аминокислоты	Дрожательная форма БП	Ригидная форма БП
аспаргат	↑ 32%*	↑ 12%
глутамат	↓ 50%*	↓ 27%
глицин	↑ 38%*	↑ 16%
таурин	↑ 4%*	↑ 29%*
ГАМК	↑ 96%*	↑ 31%

* – статистически значимые различия по сравнению с контролем, $P < 0,05$.

Вместе с тем, концентрация другой возбуждающей аминокислоты – глутамата, существенно снижается, причем также при дрожательной форме в большей степени, чем при ригидной форме заболевания. Следовательно, концентрация основных тормозных аминокислот ГАМК, глицина и таурина увеличивается в крови пациентов на ранней клинической стадии БП и изменения более выражены при дрожательной форме заболевания (см. табл. 6).

Полученные результаты свидетельствуют о том, что в крови у пациентов на ранней клинической стадии БП концентрации аминокислот аспартата, ГАМК, глицина и таурина увеличиваются, а глутамата – уменьшаются, изменения более выражены при дрожательной, чем при ригидной форме заболевания. Определение концентрации этих аминокислот может быть рекомендовано в качестве биомаркера при БП, особенно для дифференциальной диагностики дрожательной и ригидной форм.

5. Пролактин и кортизол в крови при БП

Пролактин. Сравнительное исследование ДА-ергических систем мозга при БП показало, что при этом заболевании дегенерируют не только ДА-ергические нейроны nigrostriatной системы, обеспечивающие регуляцию моторного поведения,

но и ДА-ергические нейроны тубероинфундибулярной (гипоталамической) системы, обеспечивающие ингибиторный контроль секреции пролактин (ПРЛ) (Sandyk et al., 1987). У больных при БП как *in vivo* с помощью позитронно-эмиссионной томографии (Moore et al., 2008), так и на аутопсийном материале в гипоталамусе обнаружено уменьшение содержания ДА, НА и серотонина (Shannak et al., 1994). Более того, при изучении аутопсийного материала отмечено образование телец Леви – маркеров нейродегенеративного процесса (Langston, Forno, 1978). Хотя логично предположить, что при этом должен увеличиться уровень ПРЛ в крови, литературные данные по этому поводу весьма противоречивы. В одних исследованиях было показано повышение концентрации ПРЛ в крови в обычных условиях у больных БП (Otake et al., 1994), в других работах не было обнаружено изменений уровня ПРЛ при БП (Bell et al., 1978; Eisler et al., 1981; Agnoli et al., 1981; Vogel, Ketsche, 1986; Aziz et al., 2011), и даже снижение уровня ПРЛ в крови (Murri et al., 1980) (табл. 7).

Суточный ритм секреции ПРЛ не отличался у пациентов с БП и контрольных испытуемых (Aziz et al., 2011). Отсутствие повышения уровня ПРЛ при БП, отмеченное в ряде работ, связано, вероятно, с включением адаптивных механизмов, направленных на компенсацию функциональной недостаточности тубероинфундибулярной ДА-ергической системы, что было показано на экспериментальных моделях (Kostic et al., 1993; Дильмухаметова и др., 2009; Зиязетдинова и др., 2008). Одним из таких механизмов может быть кооперативный синтез ДА, неДА-ергическими нейронами тубероинфундибулярной системы, экспрессирующими по одному из ферментов синтеза ДА – тирозингидроксилазу или декарбоксилазу ароматических L-аминокислот (Ugrumov et al., 2004, 2014). Тем не менее, было выявлено повышение уровня ПРЛ в крови в ночные и утренние часы у больных с БП при сохранении нормальной концентрации ПРЛ в дневные и вечерние часы (Bellomo et al., 1991; Aziz et al., 2011) (см. табл. 7).

С 2007 года в Лаборатории нервных и нейроэндокринных регуляций Института биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН проводится определение ПРЛ в крови у

Таблица 7

Изменение уровня пролактина в крови у пациентов при БП по сравнению с контрольной группой пациентов без неврологической патологии

Статья	время суток	4	8	12
	форма БП			
Bellomo et al., 1991.		↑	↗	→
Eisler et al., 1981.			↘	
Laihinen, Rinne, 1986.	дрожательная		→	
	ригидная		↑	
Murri et al., 1980.			↓	

Стрелка вверх – повышенный уровень гормона, стрелка вниз – пониженный уровень гормона, стрелка вправо – уровень гормона не отличается от уровня в контрольной группе, наклонная стрелка – тенденция к изменению уровня без достоверных различий.

пациентов, у которых только что проявились первые моторные симптомы, но которых еще не начали лечить. В контроле использованы испытуемые того же возраста и пола, что и больные, но не страдающие нейроэндокринной и неврологической патологией.

В исследовании приняли участие 28 контрольных испытуемых, из них 8 мужчин и 20 женщин в период постменопаузы, а также 46 пациентов с БП (стадии 1–2 по шкале Хен-Яра) – 7 мужчин и 23 женщины с дрожательной формой БП, а также 10 мужчин и 6 женщин с ригидной формой БП. Кровь брали у пациентов из вены в 4 часа утра, 8 часов утра и в 12 часов дня. Концентрацию ПРЛ в сыворотке крови определяли конкурентным методом иммуноферментного анализа.

По стандартам ВОЗ нормальный диапазон концентрации ПРЛ в крови, взятой с 8 до 11 часов, считается: для женщин 2,59–23,68 нг/мл (70–640 мМЕ/л сыворотки), для мужчин – 2,11–17,39 нг/мл (57–470 мМЕ/л сыворотки). По данным литературы, уровень ПРЛ постепенно снижается с 4 часов утра до 12 часов дня (Bellomo et al., 1991). По данным Г. Белломо (Bellomo et al., 1991), уровень ПРЛ у больных с БП в 4 часа утра и 12 часов дня не выходил за пределы нормы, установленной в интервале от 8 до 11 часов утра.

В наших исследованиях в 4 часа утра концентрация ПРЛ в крови в контрольной группе мужчин и женщин превысила норму, будучи соответственно $31,1 \pm 7,9$ нг/мл и $42,3 \pm 6,9$ нг/мл. В 8 утра концентрация ПРЛ в крови в контрольной группе мужчин была в пределах нормы и составляла $14,7 \pm 1,7$ нг/мл, а у женщин недостоверно превышала эту норму ($23,9 \pm 8,6$ нг/мл). В 12 часов дня концентрация ПРЛ в крови у мужчин и женщин в контрольной группе была в пределах нормы и составляла соответственно $19,7 \pm 8,9$ нг/мл и $10,7 \pm 1,1$ нг/мл.

У пациентов с БП наблюдались изменения концентраций ПРЛ, которые варьировали у мужчин и женщин и в зависимости от формы и стадии заболевания (табл. 8).

Наиболее удобным периодом для обследования пациентов является 8 часов утра. В это время у мужчин с дрожательной формой БП концентрация ПРЛ на

Таблица 8

Изменение уровня пролактина в крови у пациентов с БП дрожательной и ригидной формой в разных стадиях по шкале Хен-Яра по сравнению с контрольной группой в различное время суток (4 часа, 8 часов и 12 часов)

Пол	стадия БП		1 стадия			1,5 стадия			2 стадия		
	время суток форма БП		4	8	12	4	8	12	4	8	12
мужчины	дрожательная		↓	↓	↓	↓	↑	↓	↓	→	↓
	ригидная		↓	→	↓	↓	→	↓	↓	↓	↓
женщины	дрожательная		→	↓	→	↓	↓	→	↓	↓	↓
	ригидная		↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	→	→

Стрелка вверх – повышенный уровень гормона, стрелка вниз – пониженный уровень гормона, стрелка вправо – уровень гормона не отличается от уровня в контрольной группе.

1 стадии заболевания была понижена, на 1,5 стадии – повышена, а на 2 стадии – не отличалась от контроля. У мужчин с ригидной формой БП в 8 часов утра концентрация ПРЛ на 1 и 1,5 стадиях по шкале Хен-Яра не отличалась от контрольного уровня, а на 2 стадии была понижена. У женщин с дрожательной формой БП в 8 часов утра концентрация ПРЛ на 1, 1,5 и 2 стадиях заболевания была понижена. У женщин с ригидной формой БП в 8 часов утра концентрация ПРЛ на 1 и 1,5 стадиях заболевания была понижена, а на 2 стадии – не отличалась от контрольного уровня.

Следует отметить, что в течение суток показатели изменяются, поэтому при наличии отклонений в концентрации гормонов у больных в 8 часов утра следует проводить более детальную оценку по этому показателю путем суточного мониторинга изменения концентрации ПРЛ и кортизола, в нашей работе – в 4 часа утра, 8 часов утра и в 12 часов. При этом различия в течении суток в секреции ПРЛ связаны с различиями в циркадных ритмах функционирования ДА-ергических нейронов тубероинфундибулярной системы, а не с дефицитом ДА (Freeman et al., 2000). Увеличение ПРЛ в утренние часы может быть связано либо со снижением ингибиторного влияния ДА, либо с тем, что в это время суток компенсаторные механизмы менее эффективны.

Кортизол и АКТГ. Помимо дегенерации ДА-ергических нейронов в нигростриатной и тубероинфундибулярной системах, при БП отмечают дегенерацию и норадренергической системы мозга – нейронов голубого пятна (Fornai et al., 2007; Gesi et al., 2000). Норадренергические нейроны голубого пятна формируют дорзальный тракт и иннервируют кортекс, моторную и премоторную зоны, обонятельные луковицы, септум, стриатум, гиппокамп и амигдалу (Maeda, Shimizu, 1972). Существуют единичные работы, в которых отмечали изменения функционального состояния норадренергической системы при БП, поскольку основной интерес у исследователей вызвала дегенерация ДА-ергической нигростриатной системы (Gesi et al., 2000). При этом было показано, что у больных при БП в голубом пятне дегенерировало на 70% нейронов больше, чем в контрольной группе (Bertrand et al., 1997). В других работах отмечалась неравномерная потеря нейронов голубого пятна при БП, что позволило авторам высказать предположение об избирательности дегенерации нейронов в разных областях голубого пятна при разных формах БП (Paulus, Jellinger, 1991). Кроме того, в случаях, когда БП была без деменций, наблюдалась дегенерация нейронов каудальной и роstralной части голубого пятна, а при БП с деменциями наблюдалась потеря нейронов в роstralной части голубого пятна (German et al., 1992). Проекция нейронов голубого пятна совместно с проекциями нейронов групп А1 и А2 формируют вентральный норадренергический тракт (Maeda, Shimizu, 1972) и иннервируют гипоталамус, стимулируя секрецию кортикотропин-релизинг-гормона, который стимулирует секрецию АКТГ, и далее усиливая секрецию кортизола (Pasak et al., 1995).

Исследования циркадных изменений в секреции АКТГ и кортизола у больных с БП показали пониженный уровень АКТГ и кортизола у больных по сравнению с соответствующей контрольной группой (Bellomo et al., 1991). По данным международных исследований, уровень кортизола изменяется в течение суток, возрастая в период между 4 часами утра и 8 часами утра, а затем немного снижаясь к 12 часам

дня (Bellomo et al., 1991), однако диапазоны «нормальных клинических показателей» в клинической практике по стандартам ВОЗ для 4 часов утра и 12 часов дня не определены. По данным (Bellomo et al., 1991), уровень кортизола у больных с БП в 4 часа утра и 12 часов дня не выходил за пределы «нормальных клинических показателей», которые определены для периода между 8 часами утра и 11 часами утра.

Согласно проведенным нами исследованиям, наиболее удобным периодом для амбулаторного обследования пациентов является 8 часов утра (табл. 9).

У мужчин с дрожательной формой БП в 8 часов утра концентрация кортизола на 1 стадии заболевания не отличалась от контрольного уровня, на 1,5 стадии – повышена, а на 2 стадии – понижена. У мужчин с ригидной формой БП в 8 часов утра концентрация кортизола на 1 и 1,5 стадиях по шкале Хен-Яра была повышена, а на 2 стадии не отличалась от контрольного уровня. У женщин с дрожательной формой БП в 8 часов утра концентрация кортизола на 1 и 1,5 стадиях заболевания не отличалась от контрольного уровня, а на 2 стадии заболевания была повышена. У женщин с ригидной формой БП в 8 часов утра концентрация кортизола на 1 стадии заболевания была повышена, а на 1,5 и 2 стадиях заболевания была понижена (см. табл. 9). При этом, следует отметить, что в течение суток показатели уровня кортизола изменяются.

Проводя анализ изменений уровня ПРЛ и кортизола в 8 часов утра и детально определяя изменения уровня этих гормонов в течение суток (4 часа, 8 часов и 12 часов), можно выделить группу риска по возможному развитию БП, с учетом формы этого заболевания – дрожательной или ригидной.

Таким образом, к периферическим маркерам БП можно отнести тропный гормон гипофиза – ПРЛ, и гормон надпочечников – кортизол, концентрация которых изменяется в крови, причем по-разному в зависимости от формы БП, стадии заболевания и пола пациента.

Таблица 9

Изменение уровня кортизола крови у пациентов с БП дрожательной и ригидной формой на разных стадиях по шкале Хен-Яра в различное время суток (4 часа, 8 часов и 12 часов)

Пол	стадия БП		1 стадия			1,5 стадия			2 стадия		
	форма БП	время суток	4	8	12	4	8	12	4	8	12
мужчины	дрожательная		↑	→	↑	↓	↑	→	↓	↓	→
	ригидная		→	↑	→	↑	↑	→	↑	→	↓
женщины	дрожательная		↑	→	→	→	→	→	→	↑	→
	ригидная		↑	↑	↑	→	↓	→	→	↓	↑

Стрелка вверх – повышенный уровень гормона, стрелка вниз – пониженный уровень гормона, стрелка вправо – уровень гормона не отличается от уровня в контрольной группе.

6. Молекулярные маркеры в клетках крови при БП

Эта работа выполнена в Институте биологии гена РАН Н.Е. Воробьевой, Н.В. Сошниковой, А.Н. Красновым под руководством С.Г. Георгиевой. Молекулярные процессы, протекающие в пораженных участках головного мозга при патогенезе БП, хорошо известны. Они включают в себя как изменение количества ферментов биосинтеза дофамина, так и рецепторов к дофамину. Причиной данных нарушений зачастую является изменение уровня экспрессии генов, кодирующих данные белки. Измерение уровня транскрипции данных генов могло бы являться надежным маркером раннего патогенеза. Однако материалом для подобных измерений должны являться соответствующие участки головного мозга, извлечение которых не представляется возможным. Поэтому поиск молекулярных маркеров БП должен проводиться на материале периферических тканей (таких как кровь).

Первоначально были сделаны попытки использовать в качестве таких периферических маркеров гены, кодирующие рецепторы к дофамину. Было продемонстрировано достоверное снижение уровня транскрипции данных генов в лимфоцитах больных БП (Nagai et al., 1996). Нами было показано снижение уровня транскрипции генов рецептора *DRD3* к дофамину в крови пациентов на ранних клинических стадиях болезни Паркинсона (табл. 10). Несмотря на относительный успех первичных исследований, использование данного маркера для широкомасштабной диагностики пациентов не представляется возможным. Экспрессия генов, кодирующих рецепторы к дофамину, в периферических тканях происходит на чрезвычайно низком уровне, который ограничивается несколькими копиями кодирующих РНК на клетку. Измерения таких незначительных молекулярных изменений характеризуются высокой технической сложностью. Такие измерения могут быть с высокой достоверностью произведены в лабораторных условиях высококвалифицированным персоналом с использованием приборов для амплификации ДНК в реальном времени. Использование подобной методики измерения в клинической практике не представляется оправданным из-за технической сложности, определяющей практическую невозможность валидации метода.

Таблица 10

Измерение уровня транскрипции рецептора DRD3 в лимфоцитах пациентов с болезнью Паркинсона

Показатель	Пациенты с БП
уровень транскрипции рецептора DRD3	↓

Обнаруженные проблемы с детекцией транскрипции нейрональных генов в клетках крови привели к изменению стратегии поиска ранних маркеров БП. Было решено использовать подходы массового скрининга изменений уровня транскрипции генов, экспрессирующихся в клетках крови, для выявления непрямых, но легко детектируемых маркеров, коррелирующих с данным заболеванием. Измерение уровня экспрессии проводилось по технологии микрочипов на достаточно больших выборках доноров (Scherzer et al., 2007).

Подобные широкомасштабные эксперименты привели к созданию достаточно надежного набора молекулярных маркеров, позволяющих диагностировать у пациента болезнь Паркинсона на ранней клинической стадии. Данный набор включал в себя анализ уровня транскрипции восьми генов. Каждый из этих генов сам по себе, однако, не представлял значимой ценности в качестве маркера, так как изменения уровня их транскрипции были незначительными (не более чем в 2 раза) и не позволяющими проанализировать их достоверно. Более серьезных успехов добилась другая группа исследователей, проводившая подобный массовый скрининг транскрипции генов, которая включила в исследование также измерения уровня различных сплайс-вариантов транскриптов генов (Potashkin et al., 2012). Нарушение сплайсинга транскриптов нейрональных генов у пациентов с болезнью Паркинсона было обнаружено различными группами исследователей. Для нейронального гена ATR13A2 было продемонстрировано нарушение включения 13-го экзона в состав его транскрипта. Причем aberrантная форма транскрипта детектировалась в клетках периферической крови (Ramirez et al., 2006). Нарушение альтернативного сплайсинга при болезни Паркинсона было также показано для фактора synophilin-1, являющегося важным участником патогенеза нейродегенеративных заболеваний (Beyer et al., 2008). Кроме изменения соотношения альтернативных транскриптов нейрональных генов были также обнаружены факты нарушения функционирования самого аппарата сплайсинга у пациентов с болезнью Паркинсона. Было показано, что белок DJ-1, играющий важную роль в развитии редких генетических форм болезни Паркинсона, способен ингибировать сумоилирование фактора сплайсинга РТВ, влияя тем самым на его функциональную активность (Zhong et al., 2006). Патогенез болезни Паркинсона включает в себя значительное повреждение мембран митохондрий нейронов, которое также приводит к нарушению механизмов сплайсинга (Maracchioni et al., 2007). Таким образом, нарушение функционирования аппарата сплайсинга можно считать частью патогенеза болезни Паркинсона. Этот факт может быть использован при поиске маркеров данного заболевания. Измерение изменения соотношения альтернативных транскриптов генов в периферических тканях может стать удобной методикой диагностики заболевания. Для создания подобной методики может быть использована следующая стратегия. Изменение соотношения альтернативных транскриптов генов-маркеров болезни Паркинсона в клетках крови должно быть подтверждено на достоверной выборке пациентов. Далее наличие таких же изменений должно быть подтверждено на лабораторной модели БП (например, мышах, с введением МРТР). После этого данные маркеры могут быть протестированы на лабораторной модели ранних, доклинических стадий данного заболевания. Этот подход даст возможность отобрать из предполагаемых маркеров те, которые будут иметь теоретически большую прогностическую ценность для диагностики заболевания на доклинических стадиях.

Для первичного анализа генов, обладающих альтернативным сплайсингом транскриптов, нами были отобраны несколько генов из скринингов, проведенных ранее (Potashkin et al., 2012), а также ген PNF10, участвующий в пролиферации нервных стволовых клеток (Lessard et al., 2007). Нейродегенеративные изменения мозга часто бывают связаны с нарушением экспрессии генов, играющих важную

роль в процессе дифференцировки нервных клеток из предшественников. Специализированные нейроны и глиальные клетки дифференцируются из мультипотентных клеток-предшественников нейронального эпителия. Решение о том, уйдет ли клетка в дифференцировку или будет оставаться потентной, регулируется внутренними и внешними механизмами – сигналами окружающей среды, взаимодействиями с соседними клетками или транскрипционными процессами, опосредованными bHLH, STAT/Smad белками и ядерными рецепторами (Gotz, Huttner, 2005). Быстрая реорганизация ядра и глобальные изменения в экспрессии генов в только что образовавшемся нейроне свидетельствуют о происходящей в нем реструктуризации хроматина и значительных изменениях на эпигенетическом уровне (Hsieh, Gage, 2005).

Реструктуризация хроматина – это совокупность процессов, включающих смещение нуклеосомы вдоль ДНК, перенос нуклеосомы на другую нить ДНК, замена гистонов в составе нуклеосомы на их варианты и прочие процессы. В ядре эти процессы осуществляются с помощью больших белковых комплексов за счет энергии гидролиза АТФ. В составе каждого комплекса есть соответствующий фермент – АТФаза. Огромное количество исследований в настоящее время сосредоточено на изучении ремоделирующих комплексов семейства hSWI/SNF, коровой АТФазой которого могут быть два высокогомологичных между собой фермента – Brm и Brg1. Brg1 является ключевой субъединицей на разных стадиях развития нервной системы. Мышиные эмбрионы, полностью лишённые Brg1, погибают еще на стадии до имплантации. А гетерозиготные мутанты погибают на стадии имплантации, имея дефекты нервной трубки (Gebuhr et al., 2000). Мутации в другой коровой субъединице BAF155 также приводят к нарушениям в нервной трубке и являются летальными. Субъединицы хроматин-ремоделирующих комплексов играют очень важную роль при формировании синапсов в процессе развития и во взрослом состоянии (Kim et al., 2001; Sohn et al., 2007). Генетические исследования больных шизофренией и людей с синдромом Дауна выявили SNP (single-nucleotide polymorphism) в кодирующих участках генов субъединиц ремоделирующих комплексов – SMARCA2, BRM (Sengupta et al., 2006; Koga et al., 2009). Изменения в экспрессии гена киназы DYRK1A приводят к нарушению правильной работы NRSF/REST-SWI/SNF комплекса и дефициту в дендритогенезе и синаптогенезе у взрослых (Lepagnol-Bestel et al., 2009).

Среди SWI/SNF комплексов, ремоделирующих хроматин, можно выделить два подсемейства – BAF и PBAF. Комплексы имеют общую коровую часть, включающую АТФазу, и отличаются специфическими субъединицами, отвечающими за привлечение ремоделирующего комплекса на хроматин. Комплексы семейства SWI/SNF очень гетерогенны по своему составу. Хорошо описаны четыре возможных варианта субъединицы BAF45 – A, B, C, D. Только одна из этих четырех субъединиц способна находиться в составе ремоделирующего комплекса. Каждая из субъединиц экспрессируется в определенных типах нервных клеток на определенных стадиях развития нервной системы (Lessard et al., 2007). Варианты имеют также и другие субъединицы – BAF155 и BAF170 – обе являются коровыми, выполняющими структурную функцию. Подобный комбинаторный принцип сборки хроматин-ремоделирующих комплексов позволяет реализовать большое количество их функциональ-

ных вариантов, каждый из которых обладает своей специфичностью. Разнообразие субъединиц комплекса позволяет создавать уникальное белковое окружение партнеров, транскрипционных кофакторов и различных активаторов, необходимых для аттенюирования работы ремоделирующего комплекса (Maze et al., 2013).

При нарушениях в экспрессии какого-либо гена может меняться субъединичный состав комплекса и как следствие – меняться круг его партнеров, приводя к нарушениям транскрипционных программ, необходимых для поддержания базальных и активируемых нейрональных функций (Yoo, Crabtree, 2009).

Недавно нами были обнаружены новые кодирующие транскрипционные варианты и как следствие – новые изоформы белка VAF45a/PHF10. Описанная ранее изоформа PHF10-P имеет в своем составе консервативный SAY домен и два PHD домена (Vorobyeva et al., 2009). Новый, описанный нами альтернативный транскрипт PHF10 обладает другой экзон-интронной структурой на 3'-конце. Охарактеризованная нами форма белка PHF10-S не содержит PHD домены на С-конце, но несет в себе зависимый от фосфорилирования сайт конъюгации с посттрансляционной модификацией SUMO-1. Существование подобной формы позволяет предположить, что ее включение в PBAF комплекс может приводить к существенному изменению его функций и механизма действия. Мы подтвердили это предположение — действительно, PBAF комплекс, имеющий в своем составе PHF10-P, характерен для пролиферирующих клеток и необходим для поддержания их пролиферативного статуса. А форма PHF10-S контролирует гены апоптоза и не оказывает влияние на пролиферацию.

Если экспрессия транскрипционных сплайс-вариантов и белковых изоформ PHF10 будет связана с нарушением функционирования нервных клеток и нейродегенеративными заболеваниями, то данный ген можно будет использовать в качестве маркера для диагностики подобных заболеваний.

Для проверки возможности использования гена *PHF10*, а также гена *pkm2* (Potashkin et al., 2012) в качестве прогностических маркеров развития БП было решено вначале подтвердить наличие изменений в экспрессии данных генов на поздней, клинической стадии заболевания. Анализ экспрессии данных генов проводился на материале периферической ткани (крови) пациентов, а также здоровых людей. В процессе исследования из форменных элементов крови была выделена РНК при помощи TRI реагента (Molecular Research Center, Inc.). На полученном материале была проведена реакция обратной транскрипции реактивами Maxima RT (Thermo Scientific). Синтезированная оцДНК была использована для дальнейшего анализа при помощи амплификации в реальном времени. В качестве референса для каждого образца был проанализирован уровень экспрессии контрольного гена *eny2*. Количество транскриптов экспериментальных генов (*PHF10* и *pkm2*) было оценено относительно количества транскриптов контрольной РНК. Для амплификации специфического сплайс-варианта гена *pkm2*, ассоциированного с БП, были использованы праймеры, указанные в первоначальном скрининге (Potashkin et al., 2012). Для амплификации PHF10-P и PHF10-S сплайс-вариантов гена *PHF10*, были созданы новые уникальные праймеры. Оказалось, что уровень сплайс-варианта гена *pkm2* действительно изменяется у пациентов с БП в соответствии с ожидаемым

Изменение уровня экспрессии генов *pkm2* и *PHF10* (PHF10-P и PHF10-S сплайс-вариантов) в крови пациентов с болезнью Паркинсона и в контрольной группе здоровых людей

Показатель	Пациенты с БП
<i>pkm2</i>	↓
PHF10-P	↓
PHF10-S	→

(табл. 11). Уровень транскрипта данного гена значительно снизился в выборке больных по сравнению с выборкой здоровых людей. Однако амплитуда наблюдаемых нами изменений была несколько ниже той, которую обнаружили исследователи в первоначальном скрининге. Мы предполагаем, что наблюдаемая нами разница может быть связана с размером используемой нами выборки и планируем продолжить данный анализ и повысить достоверность полученного результата. Кроме гена *pkm2* нами была также проанализирована экспрессия специфических сплайс-вариантов гена *PHF10*. Оказалось, что уровень транскрипта PHF10-P снижается более чем в 2 раза у пациентов с БП по сравнению с контрольной выборкой. При этом уровень транскрипта PHF10-S изменяется не значимо. Данный результат согласуется с ожиданиями, так как именно PHF10-P-форма белка, кодируемая транскриптом PHF10-P, необходима для поддержания пролиферирующего статуса клеток, в отличие от PHF10-S-формы.

Снижение уровня экспрессии генов, характерных для пролиферирующих клеток, согласуется с данными о значительном нарушении пролиферации клеток, ассоциированном с нейродегенеративными заболеваниями, такими как БП.

В результате проделанной работы мы подтвердили возможность использования сплайс-варианта гена *pkm2*, а также сплайс-вариантов PHF10-P и PHF10-S гена *PHF10* для диагностики БП на клинических стадиях. Далее мы планируем провести анализ данных маркеров на лабораторной модели данного заболевания. Если исследуемые маркеры продемонстрируют значимые изменения на лабораторной модели, то мы планируем провести их измерение на ранних, доклинических стадиях. Данный подход позволит нам проверить возможность использования специфических сплайс-вариантов генов *pkm2* и *PHF10* в качестве прогностических маркеров развития БП на ранних, доклинических стадиях.

7. Заключение

Болезнь Паркинсона – это системное неизлечимое нейродегенеративное заболевание, при котором нейродегенерации подвержена не только nigrostriatная до-

фаминергическая система, но и ряд других отделов мозга, а также периферическая нервная система. Это приводит к появлению «немоторных» симптомов задолго до нарушения моторики, т.е. на доклинической стадии. Осуществляемый нами и другими исследователями поиск периферических биомаркеров доклинической стадии БП позволит в недалеком будущем создать комплексную доклиническую диагностику БП и начать превентивное нейропротекторное лечение, которое предотвратит надолго или даже на всю оставшуюся жизнь нарушение двигательной функции. Согласно результатам, полученным авторами статьи при обследовании более чем 200 нелеченых пациентов на ранней клинической стадии БП, и опираясь на литературные данные, к периферическим биомаркерам можно отнести нарушение норадренергической регуляции и функционирования сердечно-сосудистой системы, изменение концентрации катехоламинов, серотонина, аминокислот и гормонов – пролактина и кортизола, в крови, а также экспрессию специфических генов на лимфоцитах. Следует отметить, что в нашей работе впервые показано наличие количественных различий по изучаемым биомаркерам между дрожательной и ригидной формами БП, что имеет большое значение и для дифференциальной диагностики уже на доклинической стадии заболевания. Важно отметить, что каждый биомаркер относительно специфичен по отношению к заболеванию, а поэтому необходим комплексный подход с применением максимально возможного набора биомаркеров. Следует отметить, что перспективным является подход, ориентированный на использование в качестве биомаркеров тех показателей, которые можно быстро и относительно недорого определить на имеющемся в современных диагностических лабораториях оборудовании. На основе обнаружения ряда биомаркеров при диспансеризации здорового населения будет создаваться группа риска, в которой окончательный диагноз можно будет поставить с помощью позитронно-эмиссионной томографии.

Литература

- Гусев Е.И., Коновалов А.Н., Бурд Г.С. Болезнь Паркинсона // Неврология и нейрохирургия. М.: Медицина, 2000. С. 586-591.
- Дильмухаметова Л.К., Пронина Т.С., Зиязетдинова Г.З. и др. Роль норадреналина в развитии дофамин-зависимой гиперпролактинемии // Нейрохимия. 2009. Vol. 26. № 4. P. 318-327.
- Зиязетдинова Г.З., Сапронова А.Я., Киясова В.А. и др. Компенсаторная реакция при дегенерации дофаминергических нейронов аркуатного ядра // Журнал эволюционной биохимии и физиологии. 2008. Vol. 44. P. 72-77.
- Agnoli A., Baldassarre M., Ruggieri S. et al. Prolactin response as an index of dopaminergic receptor function in Parkinson's disease. Correlation with clinical findings and therapeutic response // J. Neural. Transm. 1981. Vol. 1-2. P. 123-134.
- Ahlskog J.E., Uitti R.J., Tyce G.M. et al. Plasma catechols and monoamine oxidase metabolites in untreated Parkinson's and Alzheimer's disease // J. Neurol. Sci. 1996. Vol. 136. P. 162-168.
- Allcock L.M., Ulyart K., Kenny R.A. et al. Frequency of orthostatic hypotension in a community based cohort of patients with Parkinson's disease // J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry. 2004. Vol. 75. P. 1470-1471.
- Amino T., Orimo S., Itoh Y. et al. Profound cardiac sympathetic denervation occurs in Parkinson disease // Brain Pathol. 2005. Vol. 15. P. 29-34.
- Aziz N.A., Pijl H., Frölich M. et al. Diurnal secretion profiles of growth hormone, thyrotrophin and prolactin in Parkinson's disease // J. Neuroendocrinol. 2011. Vol. 23. № 6. P. 519-524.

- Belikova M.V., Lukyantseva G.V., Pastukhova V.A.* Change in plasma catecholamine levels in people in aging and Parkinson's disease // Український медичний альманах. 2013. Vol. 16. № 2. P. 108-110.
- Bell R.D., Carruth A., Rosenberg R.N. et al.* Effect of dopamine agonist (Lergotril mesylate) therapy on twenty-four hour secretion of prolactin in threated Parkinson's disease // J. Clin. Endocrinol. Metab. 1978. Vol. 4. P. 807-811.
- Bellomo G., Santambrogio L., Fiacconi M. et al.* Plasma profiles of adrenocorticotrophic hormone, cortisol, growth hormone and prolactin in patients with untreated Parkinson's disease // J. Neurol. 1991. Vol. 238. P. 19-22.
- Bertrand E., Lechowicz W., Szpak G.M. et al.* Qualitative and quantitative analysis of locus coeruleus neurons in Parkinson's disease // Folia Neuropathol. 1997. Vol. 35. P. 80-86.
- Beyer K., Domingo-Sabat M., Humbert J. et al.* Differential expression of alpha-synuclein, parkin, and synphilin-1 isoforms in Lewy body disease // Neurogenetics. 2008. Vol. 9. P. 163-172.
- Bigger J.T., Fleiss J.L., Steinman R.C. et al.* Frequency domain measures of heart period variability and mortality after myocardial infarction // Circulation. 1992. Vol. 85. P. 164-171.
- Bloch A., Probst A., Bissig H. et al.* a-Synuclein pathology of the spinal and peripheral autonomic nervous system in neurologically unimpaired elderly subjects // Neuropathol. Appl. Neurobiol. 2006. Vol. 32. P. 284-295.
- Bordet R., Broly F., Destee A. et al.* Debrisoquine hydroxylation genotype in familial forms of idiopathic Parkinson's disease // Adv. Neurol. 1996. Vol. 69. P. 97-100.
- Bouhaddi M., Vuillier F., Fortrat J.O. et al.* Impaired cardiovascular autonomic control in newly and long-term-treated patients with Parkinson's disease: involvement of L-dopa therapy // Autonomic. Neuroscience: Basic and Clinical. 2004. Vol. 116. P. 30-38.
- Buob A., Winter H., Kindermann M. et al.* Parasympathetic but not sympathetic cardiac dysfunction at early stages of Parkinson's disease // Clin. Res. Cardiol. 2010. Vol. 11. P. 701-706.
- Courbon F., Brefel-Courbon C., Thalamos C. et al.* Cardiac MIBG scintigraphy is a sensitive tool for detecting cardiac sympathetic denervation in Parkinson's disease // Mov. Disord. 2003. Vol. 18. P. 890-897.
- Deguchi K., Sasaki I., Tsukaguchi M. et al.* Abnormalities of rate-corrected QT intervals in Parkinson's disease-a comparison with multiple system atrophy and progressive supranuclear palsy // J. Neurol. Sci. 2002. Vol. 199. P. 31-37.
- Devos D., Kroumova M., Bordet R. et al.* Heart rate variability and Parkinson's disease severity // J. Neural. Transm. 2003. Vol. 110. P. 997-1011.
- Eisler T., Thorner M.O., MacLeod R.M. et al.* Prolactin secretion in Parkinson disease // Neurology. 1981. Vol. 10. P. 1356-1359.
- Fornai F., di Poggio A.B., Pellegrini A. et al.* Noradrenaline in Parkinson's disease: from disease progression to current therapeutics // Curr. Med. Chem. 2007. Vol. 14. P. 2330-2334.
- Freeman M.E., Kanyicska B., Lerant A. et al.* Prolactin: structure, function, and regulation of secretion // Physiol. Rev. 2000. Vol. 80. P. 1523-1631.
- Fujishiro H., Frigerio R., Burnett M. et al.* Cardiac sympathetic denervation correlates with clinical and pathologic stages of Parkinson's disease // Mov. Disord. 2008. Vol. 23. P. 1085-1092.
- Fumimura Y., Ikemura M., Saito Y. et al.* Analysis of the adrenal gland is useful for evaluating pathology of the peripheral autonomic nervous system in lewy body disease // J. Neuropathol. Exp. Neurol. 2007. Vol. 66. P. 354-362.
- Gebuhr T.C., Bultman S.J., Magnuson T.* Pc-G/trx-G and the SWI/SNF connection: developmental gene regulation through chromatin remodeling // Genesis. 2000. Vol. 26. P. 189-197.
- German D.C., Manaye K.F., White C.L., et al.* Disease-specific patterns of locus coeruleus cell loss // Ann. Neurol. 1992. Vol. 32. P. 667-676.
- Gesi M., Soldani P., Giorgi F.S. et al.* The role of the locus coeruleus in the development of Parkinson's disease // Neurosci. Biobehav. Rev. 2000. Vol. 24. P. 655-668.
- Goetz C.G., Poewe W., Rascol O. et al.* Movement Disorder Society Task Force report on the Hoehn and Yahr staging scale: status and recommendations // Mov. Disord. 2004. Vol. 19. P. 1020-1028.
- Goldstein D.S.* Dysautonomia in Parkinson's disease: neurocardiological abnormalities // Lancet. Neurol. 2003. Vol. 2. P. 669-676.
- Goldstein D.S.* Cardiovascular aspects of Parkinson disease // J. Neural. Transmission. 2006a. Vol. 70. P. 339-342.

- Goldstein D.S. Orthostatic hypotension as an early finding in Parkinson's disease // *Clin. Auton. Res.* 2006b. Vol. 16. P. 46-54.
- Goldstein D.S. Cardiac denervation in patients with Parkinson disease // *Cleveland Clinic. J. Medicine.* 2007. Vol. 74. Supplement 1. P. S91-S94.
- Goldstein D.S. Dysautonomia in Parkinson disease // *Compr. Physiol.* 2014. Vol. 2. P. 805-826.
- Goldstein D.S., Orimo S. Cardiac sympathetic neuroimaging: summary of the First International Symposium // *Clin. Auton. Res.* 2009. Vol. 19. P. 133-136.
- Goldstein D.S., Holmes C., Cannon R.O. et al. Sympathetic cardioneuropathy in dysautonomias // *N. Engl. J. Med.* 1997. Vol. 336. P. 696-702.
- Goldstein D.S., Holmes C., Li S.T. et al. Cardiac sympathetic denervation in Parkinson disease // *Ann. Intern. Med.* 2000a. Vol. 133. P. 338-347.
- Goldstein D.S., Tack C. Non-invasive detection of sympathetic neurocirculatory failure // *Clin. Auton. Res.* 2000b. Vol. 10. P. 285-291.
- Goldstein D.S., Holmes C., Dendi R., Bruce S., Li S-T. Orthostatic hypotension from sympathetic denervation in Parkinson's disease // *Neurology.* 2002. Vol. 58. P. 1247-1255.
- Goldstein D.S., Pechnik S., Holmes C. et al. Association between supine hypertension and orthostatic hypotension in autonomic failure // *Hypertension.* 2003a. Vol. 42. P. 136-142.
- Goldstein D.S., Holmes C., Sharabi Y. et al. Plasma levels of catechols and metanephrines in neurogenic orthostatic hypotension // *Neurology.* 2003b. Vol. 60. P. 1327-1332.
- Goldstein D.S., Eldadah B.A., Holmes C. et al. Neurocirculatory abnormalities in Parkinson disease with orthostatic hypotension: independence from levodopa treatment // *Hypertension.* 2005. Vol. 6. P. 1333-1339.
- Goldstein D.S., Sharabi Y., Karp B.I. et al. Cardiac sympathetic denervation preceding motor signs in Parkinson disease // *Clin. Auton. Res.* 2007a. Vol. 17. P. 118-121.
- Goldstein D.S., Imrich R., Peckham E. et al. Neurocirculatory and nigrostriatal abnormalities in Parkinson disease from LRRK2 mutation // *Neurology.* 2007b. Vol. 69. P. 1580-1584.
- Goldstein D.S., Sewell L., Sharabi Y. Autonomic dysfunction in PD: a window to early detection? // *J. Neurol. Sci.* 2011. Vol. 310. P. 118-122.
- Goldstein D.S., Holmes C., Sewell L. Sympathetic noradrenergic before striatal dopaminergic denervation: relevance to Braak staging of synucleinopathy // *Clin. Auton. Res. Clin. Auton. Res.* 2012. Vol. 22. P. 57-61.
- Gotz M., Huttner W.B. The cell biology of neurogenesis // *Nature Reviews. Molecular. Cell. biology.* 2005. Vol. 6. P. 777-788.
- Haapaniemi T.H., Pursiainen V., Korpelainen J.T. et al. Ambulatory ECG and analysis of heart rate variability in Parkinson's disease // *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry.* 2001. Vol. 70. P. 305-310.
- Haensch C.A., Lerch H., Jorg J. et al. Cardiac denervation occurs independent of orthostatic hypotension and impaired heart rate variability in Parkinson's disease // *Parkinsonism Relat. Disord.* 2009. Vol. 15. P. 134-137.
- Hoehn M.M., Yahr M.D. Parkinsonism: onset, progression and mortality // *Neurology.* 1967. Vol. 5. P. 427-442.
- Hsieh J., Gage F.H. Chromatin remodeling in neural development and plasticity // *Current Opinion in Cell. Biology.* 2005. Vol. 17. P. 664-671.
- Jain S., Goldstein D.S. Cardiovascular dysautonomia in Parkinson disease: from pathophysiology to pathogenesis // *Neurobiol. Dis.* 2012. Vol. 46. P. 572-580.
- Joers V., Emborg M. Modeling and imaging cardiac sympathetic neurodegeneration in Parkinson's disease // *Am. J. Nucl. Med. Mol. Imaging.* 2014. Vol. 2. P. 1215-159.
- Katzenschlager R. Parkinson's disease: recent advances // *J. Neurol.* 2014. Vol. 5. P. 1031-1036.
- Kawano H., Okada R., Yano K. Histological study on the distribution of autonomic nerves in the human heart // *Heart Vessels.* 2003. Vol. 18. P. 32-39.
- Kim J.K., Huh S.O., Choi H. et al. *Srg3*, a mouse homolog of yeast SWI3, is essential for early embryogenesis and involved in brain development // *Molec. Cell. Biol.* 2001. Vol. 21. P. 7787-7795.
- Kleiger R.E., Miller J.P., Bigger J.T. et al. Decreased heart rate variability and its association with increased mortality after acute myocardial infarction // *Am. J. Cardiol.* 1987. Vol. 59. P. 265-262.

- Koga M., Ishiguro H., Yazaki S. *et al.* Involvement of SMARCA2/BRM in the SWI/SNF chromatin-remodeling complex in schizophrenia // *Human Molecular Genetics*. 2009. Vol. 18. P. 2483-2494.
- Kostic V.S., Marinkovic Z., Filipovic S. *et al.* Function of dopamine receptors in young onset Parkinson's disease: prolactin response // *Mov. Disord.* 1993. Vol. 2. P. 227-229.
- Laihinen A., Rinne U.K. Function of dopamine receptors in Parkinson's disease: prolactin responses // *Neurology*. 1986. Vol. 36. № 3. P. 393-395.
- Langston J.W., Forno L.S. The hypothalamus in Parkinson disease // *Ann. Neurol.* 1978. Vol. 3. P. 129-133.
- Lepagnol-Bestel A.M., Zvara A., Maussion G., *et al.* DYRK1A interacts with the REST/NRSF-SWI/SNF chromatin remodelling complex to deregulate gene clusters involved in the neuronal phenotypic traits of Down syndrome // *Human Molecular Genetics*. 2009. Vol. 18. P. 1405-1414.
- Lessard J., Wu J.I., Ranish J.A., *et al.* An essential switch in subunit composition of a chromatin remodeling complex during neural development // *Neuron*. 2007. Vol. 55. P. 201-215.
- Li S.T., Dendi R., Holmes C. *et al.* Progressive loss of cardiac sympathetic innervation in Parkinson's disease // *Ann. Neurol.* 2002. Vol. 52. P. 220-223.
- Luther J.M. Drug-induced autonomic dysfunction. Eds. D. Robertson, I. Biaggioni, G. Burnstock, P.A. Low, J.F.R. Paton. San Diego: Elsevier, 2012. P. 511-514.
- Mahlknecht P., Poewe W. Is there a need to redefine Parkinson's disease? // *J. Neural. Transm.* 2013. Vol. 120. Suppl. 1. P. S9-S17.
- Maeda T., Shimizu N. Ascending projections from the locus coeruleus and other aminergic pontine neurons at the level of the rat prosencephalon // *Brain Res.* 1972. Vol. 36. P. 19-35.
- Maracchioni A., Totaro A., Angelini D.F., *et al.* Mitochondrial damage modulates alternative splicing in neuronal cells: implications for neurodegeneration // *J. Neurochem.* 2007. Vol. 100. P. 142-153.
- Mastrocola C., Vanacore N., Giovani A. *et al.* Twenty-four-hour heart rate variability to assess autonomic function in Parkinson's disease // *Acta. Neurol. Scand.* 1999. Vol. 99. P. 245-247.
- Maze J., Noh K.M., Allis C.D. Histone regulation in the CNG: basic principles of epigenetic plasticity // *Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology*. 2013. Vol. 38. P. 3-22.
- Mitsui J., Saito Y., Momose T. *et al.* Pathology of the sympathetic nervous system corresponding to the decreased cardiac uptake in 123I-metaiodobenzylguanidine (MIBG) scintigraphy in a patient with Parkinson disease // *J. Neurol. Sci.* 2006. Vol. 243. P. 101-104.
- Mollenhauer B., Zhang J. Biochemical premotor biomarkers for Parkinson's disease // *Mov. Disord.* 2012. Vol. 27. № 5. P. 644-650.
- Moore R.Y., Whone A.L., Brooks D.J. Extrastriatal monoamine neuron function in Parkinson's disease: an 18F-dopa PET study // *Brain Res.* 2008. Vol. 29. № 3. P. 381-390.
- Murri L., Iudice A., Muratorio A. *et al.* Spontaneous nocturnal plasma prolactin and growth hormone secretion in patients with Parkinson's disease and Huntington's chorea // *Eur. Neurol.* 1980. Vol. 19. № 3. P. 198-206.
- Nagai Y., Ueno S., Saeki Y. *et al.* Decrease of the D3 dopamine receptor mRNA expression in lymphocytes from patients with Parkinson's disease // *Neurology*. 1996. Vol. 46. P. 791-795.
- Nigmatullina R.R., Ugrumov M.V., Abzalov N.I. *et al.* The response of the pumping function of the heart to the orthostatic test and monoamines plasma level may serve as markers of early-stage Parkinson's disease // *J. Electrocardiology*. 2013. Vol. 43. P.e5-e6.
- Oka H., Mochio S., Sato H. *et al.* Prolongation of QTc interval in patients with Parkinson's disease // *Eur. Neurol.* 1997. Vol. 37. № 3. P. 186-189.
- Oka H., Yoshioka M., Onouchi K. *et al.* Characteristics of orthostatic hypotension in Parkinson's disease // *Brain*. 2007. Vol. 9. P. 2425-2432.
- Orimo S., Ozawa E., Nakade S. *et al.* (123)I-metaiodobenzylguanidine myocardial scintigraphy in Parkinson's disease // *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*. 1999. Vol. 67. P. 189-194.
- Orimo S., Ozawa E., Oka T. *et al.* Different histopathology accounting for a decrease in myocardial MIBG uptake in PD and MSA // *Neurology*. 2001. Vol. 57. P. 1140-1141.
- Orimo S., Oka T., Miura H. *et al.* Sympathetic cardiac denervation in Parkinson's disease and pure autonomic failure but not in multiple system atrophy // *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*. 2002. Vol. 73. P. 776-777.
- Orimo S., Amino T., Itoh Y. *et al.* Cardiac sympathetic denervation precedes neuronal loss in the sympathetic ganglia in Lewy body disease // *Acta. Neuropathol.* 2005a. Vol. 109. P. 583-588.

- Orimo S., Amino T., Yokochi M. et al. Preserved cardiac sympathetic nerve accounts for normal cardiac uptake of MIBG in PARK2 // *Mov. Disord.* 2005b. Vol. 20. P. 1350-135.
- Orimo S., Kanazawa T., Nakamura A. et al. Degeneration of cardiac sympathetic nerve can occur in multiple system atrophy // *Acta Neuropathol. (Berl.)*. 2007a. Vol. 113. P. 81-86.
- Orimo S., Takahashi A., Uchiyama T. et al. Degeneration of cardiac sympathetic nerve begins in the early disease process of Parkinson's disease // *Brain. Pathol.* 2007b. Vol. 17. P. 24-30.
- Orimo S., Uchiyama T., Nakamura A. et al. Axonal alpha-synuclein aggregates herald centripetal degeneration of cardiac sympathetic nerve in Parkinson's disease // *Brain*. 2008. Vol. 131. P. 642-650.
- Otake K., Oiso Y., Mitsuuma T. et al. Hypothalamic dysfunction in Parkinson's disease patients // *Acta. Med. Hung.* 1994. Vol. 50. P. 3-13.
- Pacak K., Palkovits M., Kopin I.J. et al. Stress-induced norepinephrine release in the hypothalamic paraventricular nucleus and pituitary-adrenocortical and sympathoadrenal activity: in vivo microdialysis studies // *Front. Neuroendocrinol.* 1995. Vol. 16. P. 89-150.
- Parnetti L., Castrioto A., Chiasserini D. et al. Cerebrospinal fluid biomarkers in Parkinson disease // *Nat. Rev. Neurol.* 2013. Vol. 9. № 3. P. 131-140.
- Paulus W., Jellinger K. The neuropathologic basis of different clinical subgroups of Parkinson's disease // *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 1991. Vol. 50. P. 743-755.
- Poewe W. Non-motor symptoms in Parkinson's disease // *Eur. J. Neurol.* 2008. Vol. 5. P. 14-20.
- Post K.K., Singer C., Papapetropoulos S. Cardiac denervation and dysautonomia in Parkinson's disease: a review of screening techniques // *Parkinsonism Relat. Disord.* 2008. Vol. 14. P. 524-531.
- Potashkin J.A., Santiago J.A., Ravina B.M. et al. Biosignatures for Parkinson's disease and atypical parkinsonian disorders patients // *PLoS one* 7. 2012. P. e43595.
- Ramirez A., Heimbach A., Grundemann J. et al. Hereditary parkinsonism with dementia is caused by mutations in ATP13A2, encoding a lysosomal type 5 P-type ATPase // *Nature. Genetics.* 2006. Vol. 38. P. 1184-1191.
- Sandyk R., Iacono R.P., Bamford C.R. The hypothalamus in Parkinson disease // *Ital J Neurol Sci.* 1987. Vol. 8. P. 227-234.
- Schatz I.J. Farewell to the «Shy-Drager syndrome» // *Ann. Intern. Med.* 1996. Vol. 125. P. 74-75.
- Scherzer C.R., Eklund A.C., Morse L.J. et al. Molecular markers of early Parkinson's disease based on gene expression in blood // *Proceedings National. Acad. Sci. USA.* 2007. Vol. 104. P. 955-960.
- Senard J.M., Valet P., Durrieu G. et al. Adrenergic supersensitivity in parkinsonians with orthostatic hypotension // *Eur. J. Clin. Invest.* 1990. Vol. 20. P. 613-619.
- Sénard J.M., Verwaerde P., Rascol O. et al. Effects of acute levodopa administration on blood pressure and heart variability in never treated parkinsonians // *Hypertens. Res.* 1995. Vol. 18. Suppl 1. P. S175-177.
- Senard J.M., Rai S., Lapeyre-Mestre M. et al. Prevalence of orthostatic hypotension in Parkinson's disease // *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry.* 1997. Vol. 63. P. 584-589.
- Sengupta S., Xiong L., Fathalli F. et al. Association study of the trinucleotide repeat polymorphism within SMARCA2 and schizophrenia // *BMC Genetics.* 2006. Vol. 7. P. 34.
- Shannak K., Rajput A., Rozdilsky B. et al. Noradrenaline, dopamine and serotonin levels and metabolism in the human hypothalamus: observations in Parkinson's disease and normal subjects // *Brain. Res.* 1994. V. 639. № 1. P. 331-341.
- Sharma S., Moon C.S., Khogali A. et al. Biomarkers in Parkinson's disease (recent update) // *Neurochem. Int.* 2013. Vol. 63. № 3. P. 201-229.
- Singleton A., Gwinn-Hardy K., Sharabi Y. et al. Association between cardiac denervation and parkinsonism caused by alpha-synuclein gene triplication // *Brain.* 2004. Vol. 127. P. 768-772.
- Sohn D.H., Lee K.Y., Lee C. et al. SRG3 interacts directly with the major components of the SWI/SNF chromatin remodeling complex and protects them from proteasomal degradation // *J. Biol. Chem.* 2007. Vol. 282. P. 10614-10624.
- Takatsu H., Nishida H., Matsuo H. et al. Cardiac sympathetic denervation from the early stage of Parkinson's disease: clinical and experimental studies with radiolabeled MIBG // *J. Nucl. Med.* 2000. Vol. 41. P. 71-77.
- Taki J., Nakajima K., Hwang E.H. et al. Peripheral sympathetic dysfunction in patients with Parkinson's disease without autonomic failure is heart selective and disease specific // *Eur. J. Nucl. Med.* 2000. Vol. 27. P. 566-573.

- Tipre D.N., Goldstein D.S.* Cardiac and extracardiac sympathetic denervation in Parkinson's disease with orthostatic hypotension and in pure autonomic failure // *J. Nucl. Med.* 2005. Vol. 46. P. 1775-1781.
- Treglia G., Cason E., Stefanelli A. et al.* MIBG scintigraphy in differential diagnosis of Parkinsonism: a meta-analysis // *Clin. Auton. Res.* 2012. Vol. 22. P. 43-55.
- Ugrumov M.V., Melnikova V.I., Lavrentyeva A.V. et al.* Dopamine synthesis by non-dopaminergic neurons expressing individual complementary enzymes of the dopamine synthetic pathway in the arcuate nucleus of fetal rats // *Neuroscience.* 2004. Vol. 124. P. 629-635.
- Ugrumov M., Taxi J., Pronina T. et al.* Neurons expressing individual enzymes of dopamine synthesis in the mediobasal hypothalamus of adult rats: Functional significance and topographic interrelations // *Neuroscience.* 2014. Vol. 277. P.45-54.
- Velseboer D.C., de Haan R.J., Wieling W. et al.* Prevalence of orthostatic hypotension in Parkinson's disease: a systematic review and meta-analysis // *Parkinsonism Relat. Disord.* 2011. Vol. 10. P. 724-729.
- Vogel H.P., Ketsche R.* Effect of hypoglycaemia, TRH and levodopa on plasma growth hormone, prolactin, thyrotropin and cortisol in Parkinson's disease before and during therapy // *J. Neurol.* 1986. Vol. 233. P. 149-152.
- Vorobyeva N.E., Soshnikova N.V., Kuzmina J.L. et al.* The novel regulator of metazoan development SAYP organizes a nuclear coactivator supercomplex // *Cell. Cycle.* 2009. Vol. 8. P. 2152-2156.
- Wakabayashi K., Takahashi H.* Gallyas-positive, tau-negative glial inclusions in Parkinson's disease mid-brain // *Neurosci. Lett.* 1996. Vol. 2-3. P. 133-136.
- Waragai M., Sekiyama K., Fujita M. et al.* Biomarkers for the diagnosis and management of Parkinson's disease // *Expert Opin. Med. Diagn.* 2013. Vol. 7. № 1. P. 71-83.
- Yoo A.S., Crabtree G.R.* ATP-dependent chromatin remodeling in neural development // *Current Opinion in Neurobiology.* 2009. Vol. 19. P. 120-126.
- Zhong N., Kim C.Y., Rizzu P. et al.* DJ-1 transcriptionally up-regulates the human tyrosine hydroxylase by inhibiting the sumoylation of pyrimidine tract-binding protein-associated splicing factor // *J. Biol. Chemistry.* 2006. Vol. 281. P. 20940-20948.

Альфа-синуклеин как биомаркер болезни Паркинсона

С.Н. Пчелина, А.К. Емельянов

Содержание

1. Введение
2. Структура и свойства альфа-синуклеина
3. Функции альфа-синуклеина
4. Химические модификации альфа-синуклеина
5. Агрегация альфа-синуклеина и нейродегенерация
6. Альфа-синуклеин крови и СМЖ при болезни Паркинсона
7. Альфа-синуклеин и другие заболевания человека
8. Заключение

1. Введение

Болезнь Паркинсона (БП) – распространенное прогрессирующее нейродегенеративное заболевание. Сегодня не существует лекарственных средств, способных предотвратить или замедлить процесс нейродегенерации. Подбор нейропротекторной терапии осложняется тем, что клиническая симптоматика заболевания проявляется при гибели 80% нейронов черной субстанции, а также отсутствием лабораторных методов диагностики заболевания на доклинической стадии и мониторинга ответа на применяемую лекарственную терапию. Методы нейровизуализации, в частности метод позитронэмиссионной томографии (ПЭТ) не получил широкого распространения в клинической практике в силу высокой себестоимости исследования и отсутствия корреляции с тяжестью течения заболевания (Vernon, 2010). В разное время в качестве биохимических маркеров БП рассматривались такие параметры, как уровень гомоцистеина плазмы крови, количество дофамина в лимфоцитах периферической крови, уровень дофаминового транспортера на мембране лимфоцитов и др. (Литвиненко, 2008; Caronti, 1999; Pellicano, 2007). Однако, ни один из предлагаемых подходов не нашел применения в клинической практике.

Независимо от этиологии, симптомы БП коррелируют с гибелью дофаминергических нейронов черной субстанции мозга. В качестве основного звена патогенеза БП рассматривается формирование нейротоксических агрегатов небольшого пресинаптического белка альфа-синуклеина (Иллариошкин, 2003; Coockson, Van der Brug, 2008). Механизмы нейродегенерации остаются неизвестными, однако пристальное внимание уделяется как исследованию факторов, влияющих на формирование агрегатов альфа-синуклеина, так и изучению роли посттрансляционной модификации этого белка в регуляции его функций и метаболизма. В настоящей главе рассматриваются свойства и структура альфа-синуклеина, его возможные

Сокращения: БП – Болезнь Паркинсона; БГ – болезнь Гоше; ДЛБ – деменция с тельцами Леви; ЛБН – лизосомные болезни накопления; МСА – множественная системная атрофия; ПЭТ – позитронэмиссионная томография.

физиологические функции, роль олигомерных форм этого белка в процессах нейродегенерации. Обсуждаются различные подходы к разработке прогностических тестов БП с использованием оценки уровня альфа-синуклеина и/или его агрегатов в мозгу, крови и СМЖ. Приведены собственные приоритетные данные о распределении общего и олигомерного альфа-синуклеина в различных фракциях крови (плазма, CD45+ клетки) у пациентов с БП и в контроле.

2. Структура и свойства альфа-синуклеина

Альфа-синуклеин – небольшой нейрональный белок, обнаруживаемый, в основном, в пресинаптических терминалях. Выявляется в различных отделах головного мозга, преимущественно в неокортексе, гиппокампусе и черной субстанции (Coockson, 2008). Присутствует также и в других клетках головного мозга, таких, как астроциты и олигодендроглии. Количество альфа-синуклеина составляет около 1% от общего растворимого белка мозга. Альфа-синуклеин обнаруживается и в других типах клеток, как, например, клетках крови.

Ген, кодирующий белок альфа-синуклеин, – *SNCA* расположен на четвертой хромосоме (4q21) и состоит из шести экзонов, из которых транскрибируются пять. В результате альтернативного сплайсинга образуются три изоформы белка (140 а.к., 126 а.к. и 112 а.к.), из которых изоформа размером 140 а.к. является основной (Beyer, 2006).

Первоначально белок под названием альфа-синуклеин был выявлен в электрическом органе ската при скринировании синаптических белков (Maroteaux et al., 1988). Альфа-синуклеин человека впервые был выделен из амилоидных скоплений фронтальной зоны коры людей с типичными клиническими и нейропатологическими проявлениями болезни Альцгеймера (Ueda et al., 1993). Позднее было обнаружено, что альфа-синуклеин является основным компонентом телец Леви при БП (Spillantini et al., 1997).

Основная изоформа альфа-синуклеина (140 а.к., 19 кДа) состоит из аминоконцевой области, содержащей несколько повторяющихся последовательностей аминокислот (КТКЕГV), гидрофобной центральной области, известной как неамилоидный компонент (non-amyloid component, NAC), и отрицательно заряженной кислой С-концевой области (Beyer, 2006, Greggio, 2011) (рис. 1). В С-концевой области располагаются несколько сайтов фосфорилирования (Tyr-125, -133, -136 и Ser-129), а также домен, отвечающий за шаперонную активность альфа-синуклеина (основания 125–140). N-концевая область имеет большое сходство с липид-связывающим доменом аполипопротеинов, свидетельствуя о том, что альфа-синуклеин может взаимодействовать с липидным слоем мембран. Показано его взаимодействие с мембраной везикул, содержащей фосфолипиды (Davidson et al., 1998). Считается, что небольшая центральная часть (NAC) (а.к. 71-82) ответственна за его фибриллизацию, в то время как С-концевой участок (основания 96–140) обладает ингибирующим влиянием на образование фибрилл (Giasson et al., 2001).

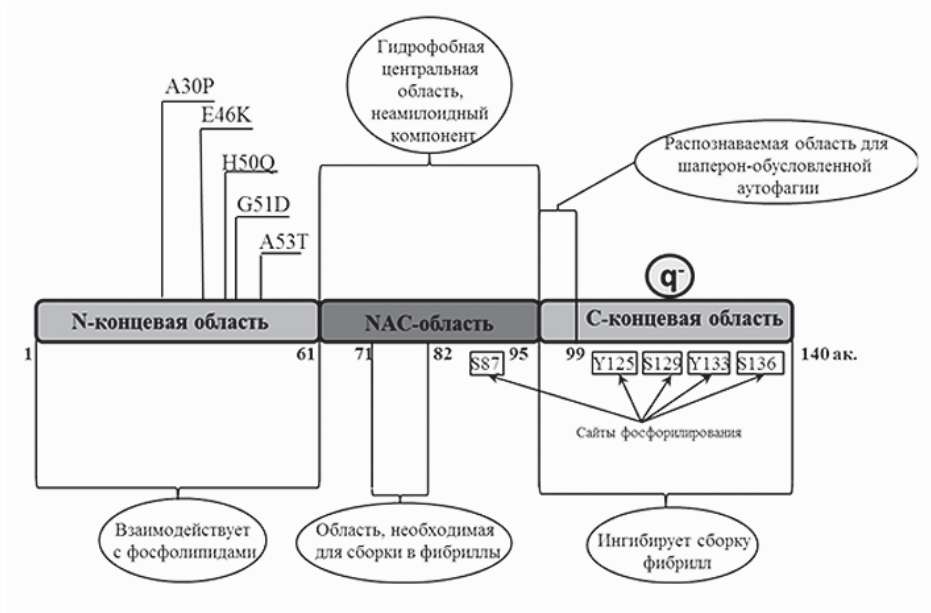


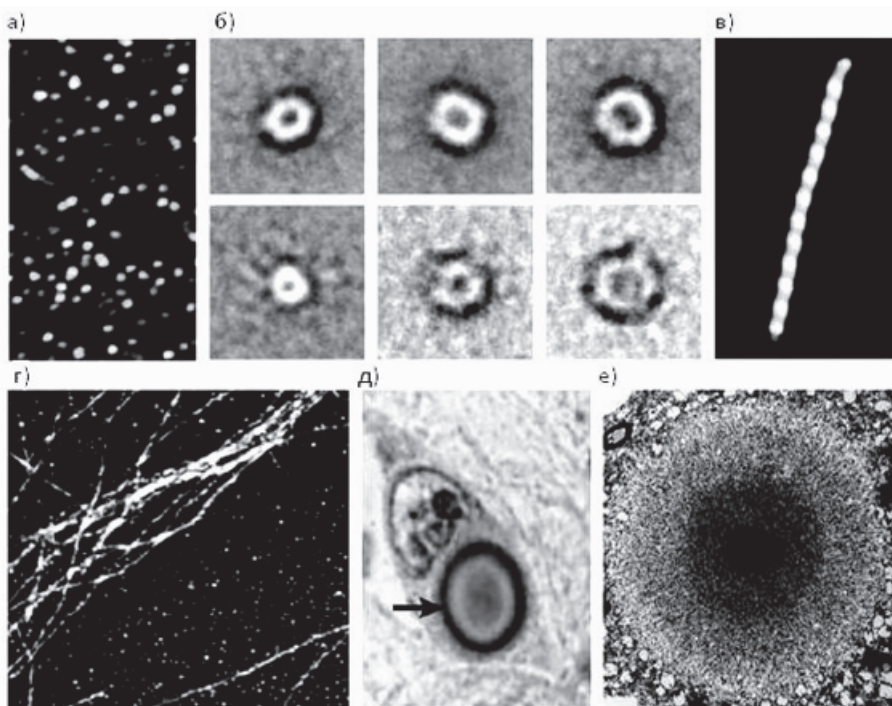
Рис. 1. Структура альфа-синуклеина

Указаны точечные мутации, приводящие к наследственным формам БП. Обозначены функциональные домены белка и сайты фосфорилирования

Предполагается, что в клетке альфа-синуклеин существует в двух равновесных состояниях в нативной и мембран-связанной. В нативной форме он представляет собой растворимый несвернутый белок, который обладает слабо упорядоченной или совсем неупорядоченной структурой с отсутствием определенной пространственной структуры. Связывание альфа-синуклеина с мембранами сопровождается конформационным переходом в альфа-спираль (Bisaglia et al., 2009). Альфа-синуклеин относится к белкам, способным к агрегации. При повышенной концентрации альфа-синуклеина в растворе образуются фибриллы и дискретные сферические структуры, подобные тем, которые присутствуют в тельцах Леви (Conway, 1998) (рис. 2). В настоящее время предполагается, что физиологически активная форма альфа-синуклеина может существовать в виде тетрамера (Bartel et al., 2011).

3. Функции альфа-синуклеина

В настоящее время описан ряд гипотетических функций альфа-синуклеина, однако точные физиологические функции этого белка остаются неизвестными. Локализация белка в пресинаптических терминалях и его способность взаимодействовать с мембранами предполагает его участие в регуляции везикулярного нейронального транспорта. Выявленное у нокаутных по гену *SNCA* мышей истощение везикулярного пула в гиппокампальных синапсах, позволило предположить



Nature Reviews | Neuroscience
2003

Рис. 2. Агрегаты α -синуклеина

а – олигомерные структуры (протофибриллы); б – пороподобные структуры протофибрилл; в, г – фибриллы β -складчатой структуры; д, е – тельца Леви (стрелкой показана область, содержащая α -синуклеин) (Maries et al., 2003)

вовлеченность альфа-синуклеина в поддержание резерва пресинаптического везикулярного пула (Cabin et al., 2002). Показано также, что альфа-синуклеин способен влиять на внутриклеточное содержание дофамина путем прямого взаимодействия с белками, регулирующими его синтез и обратный захват. Регулируя количество дофаминового транспортера в плазматической мембране, альфа-синуклеин может выступать в роли регулятора дофаминовой токсичности путем контроля входящего и выходящего в клетку дофамина (Lee et al., 2001). Показано, также, что альфа-синуклеин может влиять на синтез дофамина, являясь ингибитором скорости лимитирующего фермента синтеза дофамина – тирозингидроксилазы (Perez, 2002).

Интересно, что мыши с нокаутом гена *SNCA* не имеют выраженной дисфункции ЦНС и не показывают возрастной нейродегенерации (Cabin et al., 2002). Только тройной нокаут генов α -, β - и γ -синуклеина сопровождается изменением в структуре синапсов, нарушением нейротрансмиссии и возрастной нейродегенерацией (Greten-Harrison, 2010). Это наблюдение свидетельствует о том, что механизм нейродегенерации при БП связан, скорее всего, не с потерей функциональной активности α -синуклеина. Гиперэкспрессия α -синуклеина у трансгенных мышей

приводит к снижению выброса дофамина и развитию синаптической дисфункции (Nemani, 2010).

4. Химические модификации альфа-синуклеина

Известно, что белок альфа-синуклеин может подвергаться посттрансляционным модификациям включая окисление, азотирование или фосфорилирование. Предполагается, что химические модификации альфа-синуклеина, могут усиливать его нейротоксичность. Окисление альфа-синуклеина рассматривается как один из возможных механизмов формирования его цитотоксических форм. Ключевыми в процессе окисления альфа-синуклеина являются тирозиновые остатки в положениях 39, 125, 133 и 136 (Olteanu et al., 2004). Считается, что окисление α -синуклеина приводит к олигомеризации белка, благодаря образованию о,о'-дитирозиновых олигомеров. В настоящее время предполагается возможная промежуточная роль окисленного альфа-синуклеина в процессе его олигомеризации и последующем образовании фибрилл.

Другой возможный механизм усиления нейротоксичности белка – его нитрозилирование. При наличии активных форм кислорода оксид азота формирует пероксинитрит, обеспечивающий превращение остатков тирозина в тех же положениях, что и при окислении, в 3-нитротирозин (Ischiropoulos et al., 2003), что способствует стабилизации олигомеров альфа-синуклеина (Norris et al., 2003).

Фосфорилирование – наиболее общий механизм для регуляции активности и функции белков. Ранее была показана связь фосфорилирования цитоскелетного белка тау и болезни Альцгеймера. У пациентов с БП, а также с деменцией с тельцами Леви в тельцах Леви альфа-синуклеин обнаруживается в основном в фосфорилированной в положении S129 форме (Fujiwara et al., 2002; Anderson et al., 2006). В составе телец Леви обнаруживаются также фосфорилированные по Ser87 формы белка (Paleologou et al., 2010). *In vitro* установлено, что С-концевая часть альфа-синуклеина содержит несколько сайтов фосфорилирования (S87, Tyr125, Tyr133, Tyr 136) (Ellis et al., 2001). Несмотря на обилие информации о фосфорилированных формах альфа-синуклеина, вопрос о нейротоксичности фосфорилированных форм альфа-синуклеина остается открытым.

5. Агрегация альфа-синуклеина и нейродегенерация

Исследование роли альфа-синуклеина в патогенезе БП началось с открытия в 1997 году мутаций в гене *SNCA*, приводящих к развитию аутосомно-доминантных форм заболевания. Первая мутация альфа-синуклеина (A53T) была открыта в одной итальяно-американской семье (Polymeropoulos et al., 1997). Позднее данная мутация была описана еще в нескольких итальянских и греческих семьях с аутосомно-доминантной формой БП. Сегодня описаны еще четыре точковые мутации: A30P – в немецкой семье (Krugel et al., 1998), E46K – в семье баско-испанского

происхождения. (Zarranz et al., 2004), H50Q – у пациента из Великобритании с отсутствием заболевания среди родственников (Proukakis et al., 2013) и G51D – впри семейной форме паркинсонизма с развитием пирамидальной симптоматики у пациента из Франции (Lesage et al., 2013). Все мутации приводят к аминокислотным заменам в функционально значимом районе белка, ответственным за связь альфа-синуклеина с липидным слоем мембран (см. рис. 1). Точковые мутации гена *SNCA* являются крайне редкими. В настоящее время описано не более 15 семей с БП, ассоциированной с точечными мутациями гена *SNCA*. Более распространенными среди пациентов с наследственной формой БП оказались мультипликации гена *SNCA*, приводящих к развитию аутосомно-доминантной формы заболевания (Singleton et al., 2003). Интересно отметить различие в клинической картине заболевания пациентов с дупликацией и трипликацией гена *SNCA*. Тяжесть заболевания коррелирует с числом копий гена: у пациентов с дупликацией гена *SNCA* начало заболевания приходилось на возраст старше 40 лет и не отличалось от идиопатической БП (Ibáñez, 2009). При наличии трипликации гена *SNCA* наблюдается ранее начало БП (до 40 лет). Мультипликации гена *SNCA* обнаруживаются у 1,5% пациентов с семейной формой БП (Nishioka et al., 2006; Ibáñez et al., 2009). У пациентов с БП, обусловленной мультипликацией гена *SNCA* в нейронах черной субстанции наблюдалось повышение уровня мРНК гена *SNCA* и увеличение количества растворимого альфа-синуклеина, а также образование агрегатов этого белка (Miller et al., 2004). Интересно отметить, что у пациентов с мультипликацией гена *SNCA* в клетках крови также наблюдается увеличение количества мономерного альфа-синуклеина, но не его агрегированных форм (Miller et al., 2004). Как в промоторной так и в 3' нетранслируемой области гена в ряде исследований, в том числе отечественных авторов описан ряд полиморфных вариантов гена *SNCA*, ассоциированных с риском развития БП с высокой степенью достоверности (Elbaz et al., 2011; Lill et al., 2012; Emelyanov et al., 2013). Риск развития заболевания у носителей определенных аллелей повышается однако незначительно, в 1,5 раза.

Как отмечалось выше, мультипликации нормальной последовательности гена *SNCA*, приводящей к увеличению внутриклеточного уровня альфа-синуклеина, достаточно для развития БП. Возраст начала и тяжесть заболевания коррелируют с количеством копий гена (Singleton, 2003). Убедительным доказательством нейротоксичности альфа-синуклеина стало создание трансгенных животных (дрозофила, мышь) на основе гиперэкспрессии гена *SNCA* человека, демонстрирующих нейрональные альфа-синуклеин-положительные включения и возрастную нейродегенерацию дофаминергических нейронов мозга (Feaneay, Bender 2000; Masliah et al., 2000). Нейротоксичность агрегатов α -синуклеина была также многократно продемонстрирована *in vitro* (Bisaglia, 2010; Waxman, Giasson, 2010).

Способность α -синуклеина к формированию фибрилл *in vitro*, напоминающих фибриллы, наблюдаемые в тельцах Леви, а также тот факт, что мутация A53T ускоряет образование фибрилл, свидетельствует о том, что полимеризация α -синуклеина может быть непосредственно связана с патогенезом БП. Несмотря на множество данных, указывающих на патогенную роль фибриллярного α -синуклеина в клетке, механизмы токсичности фибрилл остаются неизвестными. В настоящее время до-

минирует гипотеза о том, что токсичны не сами фибриллы α -синуклеина, а некие интермедиаты, олигомерные формы белка, образующиеся в процессе их образования, называемые протофибриллами. Протофибриллы – маленькие олигомерные структуры, которые содержат β -складчатую структуру. Всего *in vitro* наблюдалось несколько видов протофибрилл: протофибриллы сферической, кольцеподобной структуры и трубочек (см. рис. 2) (Waxman, Giasson 2010). Интересно, что посттрансляционные модификации α -синуклеина (окисление, фосфорилирование, нитрозилирование) влияют на его способность к агрегации (Schmid et al., 2013). Показано, что большая часть α -синуклеина, входящего в состав телец Леви, фосфорилирована в положении Ser129 (Anderson et al., 2006).

Механизмы нейротоксичности протофибрилл α -синуклеина неясны. Имеется предположение, что протофибриллы могут формировать поры, способные к встраиванию в мембрану и изменяющие ее проницаемость и, как следствие, клеточный гомеостаз. Последние данные указывают на прионоподобные свойства α -синуклеина (Luk et al., 2009). Показана способность α -синуклеина и его агрегатов к секреции с последующим захватом соседними клетками. Предполагается, что экзогенный фибриллярный α -синуклеин может в дальнейшем служить центром агрегации растворимого мономерного белка (Waxman, Giasson, 2010). В сумме приведенные данные подтверждают гипотезу о нейротоксичности фибриллярных форм α -синуклеина и их роли в патогенезе БП, однако точный механизм нейродегенерации остается неизвестным.

6. Альфа-синуклеин крови и СМЖ при болезни Паркинсона

За последние восемь лет ряд исследователей высказали предположение, что уровень периферического альфа-синуклеина может служить маркером развития БП. В этой связи предпринимались попытки сопоставления уровня альфа-синуклеина клеток крови и физиологических жидкостей (СМЖ, плазма) в группах пациентов с БП и контроле. В периферических жидкостях и клетках крови человека выявлены как мономерные, олигомерные, а также модифицированные формы альфа-синуклеина. Более того, показано, что уровень всех вышеуказанных форм в плазме крови стабилен по крайней мере в течении 4 месяцев и имеет выраженные межличностные различия (Foulds et al., 2011). Тем не менее, результаты по сопоставлению уровня различных форм альфа-синуклеина плазмы, клеток крови и СМЖ до настоящего момента носят противоречивый характер. Результаты исследований суммированы в табл. 1.

Противоречивость первых данных объяснялись малочисленностью анализируемых выборок и разнообразием применяемых методов оценки уровня альфа-синуклеина. Результаты исследований последних лет показывают, что из всех клеток крови эритроциты являются основным источником альфа-синуклеина (> 98%) (Barbour, 2008; Shi et al., 2011). Полученные данные дают основание предполагать, что противоречивость данных об уровне альфа-синуклеина физиологических жидкостях может объясняться также фактором внутреннего и внешнего гемолиза. Было

Исследования по сопоставлению уровня альфа-синуклеина периферических тканей и жидкостей у пациентов с БП и в контроле

Объект исследования	Результат*	Ссылка
Альфа-синуклеин тромбоцитов и биоптатов кожи	Изменений нет	Michell et al., 2005
Альфа-синуклеин плазмы крови	Повышен	Lee et al., 2006; Duran et al., 2010
Альфа-синуклеин плазмы крови	Снижен	Li et al., 2007
Альфа-синуклеин плазмы крови при учете гемолиза	Изменений нет	Shi et al., 2011
Альфа-синуклеин лимфоцитов	Повышен	Kim et al., 2004
Альфа-синуклеин лимфоцитов периферической крови	Изменений нет	Fuchs et al., 2008
Альфа-синуклеин лимфоцитов периферической крови	Изменений нет	Brighina et al., 2010; Пчелина и др., 2010
Альфа-синуклеин СМЖ	Снижен	Westerlund et al., 2008
Альфа-синуклеин СМЖ	Изменений нет	Mollenhauer et al., 2008
Альфа-синуклеин СМЖ при учете гемолиза	Снижен	Hong et al., 2010
Альфа-синуклеин СМЖ при учете гемолиза	Изменений нет	Aerts et al., 2012
Олигомеры альфа-синуклеина в плазме крови	Изменений нет	Park et al., 2011; Gorostidi et al., 2012
Олигомеры альфа-синуклеина в плазме при учете гемолиза	Изменений нет	Andoskin et al., 2013
Олигомеры альфа-синуклеина в СМЖ	Повышены	Tokuda et al., 2010; Bruggink et al., 2011; Park et al., 2011; Parnetti et al., 2014
Нитрозилированный альфа-синуклеинлимфоцитов	Повышен	Prigione et al., 2010
Фосфориллированный альфа-синуклеин плазмы крови	Повышен	Foulds et al., 2011, 2013
Альфа-синуклеин CD45+ клеток крови	Повышен	Emelyanov et al., 2014

* уровень альфа-синуклеина/агрегатов альфа-синуклеина в группе пациентов с БП по сравнению с контролем. Цветом выделены строки с собственными данными авторов.

показано, что уровень гемоглобина в плазме крови выше 63 900 нг/мл существенно влияет на уровень общего альфа-синуклеина в плазме крови (Shi et al., 2011). Учет этого фактора (подсчет эритроцитов, нормировка на уровень гемоглобина), а также расширение анализируемой выборки пациентов (до 300) не позволил, однако, получить однозначный результат. Нами впервые показано, что в отличие от общего α -синуклеина уровень олигомерных форм белка плазмы крови не коррелирует с уровнем гемоглобина плазмы, отражающего степень контаминации плазмы эритроцитами (рис. 3). При этом различий в уровне как общего, так и олигомерного α -синуклеина плазмы крови между группами пациентов с БП и в контроле в наших исследованиях выявлено не было (рис. 4). Таким образом, уровень общего α -синуклеина плазмы зависит от степени гемолиза, в то время как уровень олиго-

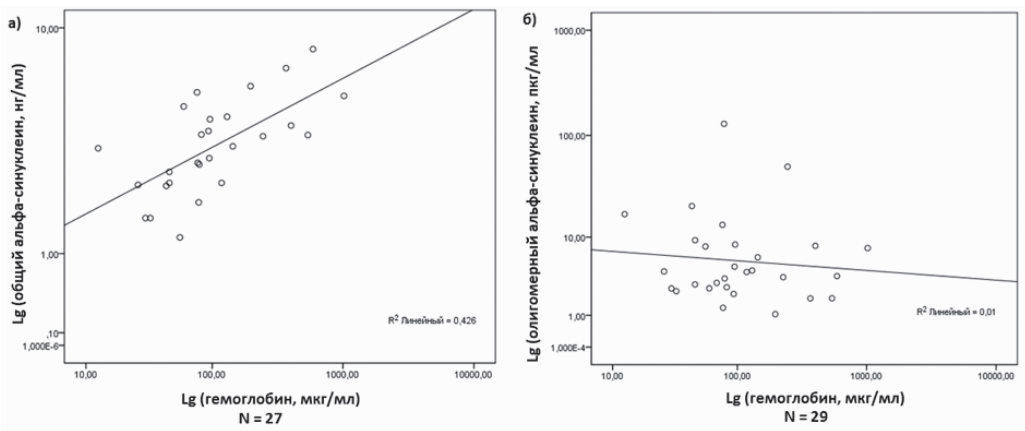


Рис. 3. Корреляция уровня гемоглобина и уровня общего (а) и олигомерного (б) α -синуклеина плазмы крови ($p = 0.0001$, и $p = 0.60$, соответственно)

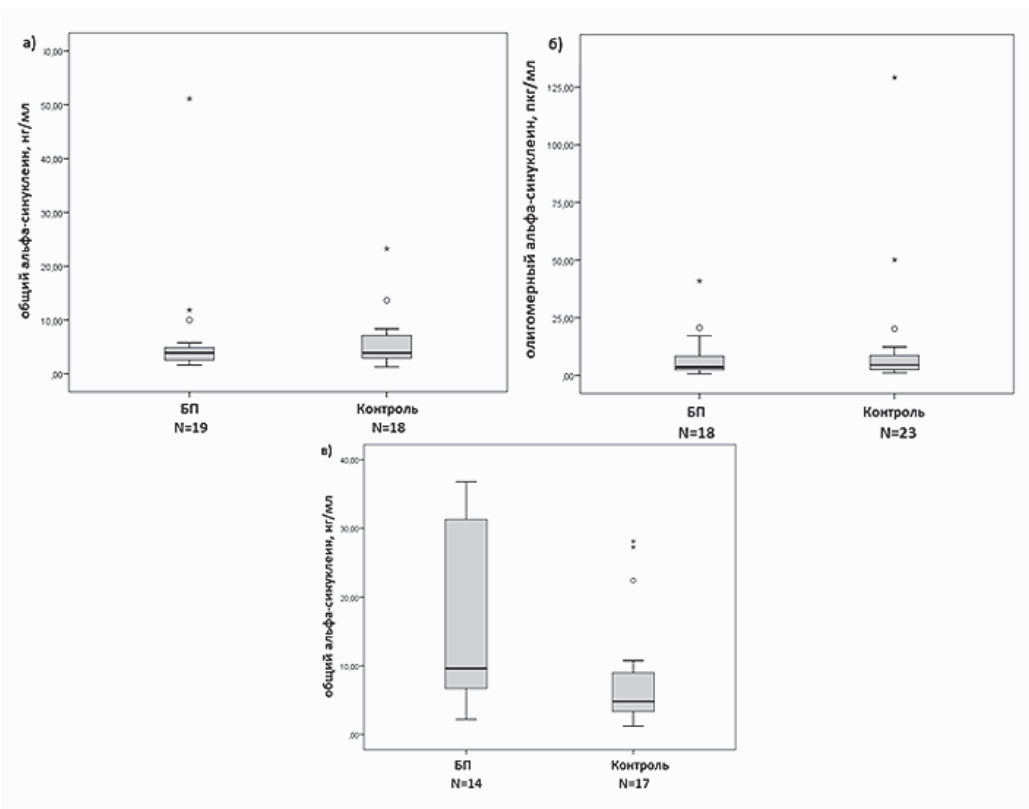


Рис. 4. Уровень α -синуклеина у пациентов с БП и в контроле
 а – общий α -синуклеин в плазме крови; б – олигомерный α -синуклеин в плазме крови; в – общий α -синуклеин в лизатах CD45+ клеток крови

меров, рассматривающихся в качестве нейротоксических формы белка, в плазме крови с уровнем гемоглобина плазмы не коррелирует. Логично предположить, что именно оценка этого показателя предположительно могла бы быть прогностически значима в качестве маркера БП. Принимая во внимание данные о том, что физиологически активная форма α -синуклеина в крови может являться тетрамером (Bartel et al., 2011), следует отметить, что антитела, используемые в нашем и зарубежных исследованиях (Kovacs et al., 2012), могут не дискриминировать такую форму белка и его нейротоксичные олигомерные формы.

Важно отметить, что во всех опубликованных исследованиях по оценке уровня α -синуклеина в лимфоцитах периферической крови фракцию лимфоцитов получали путем центрифугирования цельной крови в градиенте фикола. Применяемый метод не позволяет полностью исключить контаминацию получаемой фракции лимфоцитов эритроцитами. Оценка α -синуклеина лимфоцитов крови, полученных путем центрифугирования в градиенте фикола, также дает противоречивые результаты (Kim et al., 2004; Пчелина и др., 2010). Нами впервые выполнено исследование по измерению уровня общего α -синуклеина во фракции клеток крови, полученной путем клеточного сортирования. Показано статистически значимое увеличение уровня общего α -синуклеина в группе пациентов с БП по сравнению с группой контроля ($p=0,04$) (см. рис. 4). Данное исследование позволило исключить примесь клеток крови с высоким содержанием α -синуклеина и впервые провести оценку уровня α -синуклеина в однородной клеточной популяции. Полученные данные свидетельствуют в пользу гипотезы о том, что обменные процессы в лимфоцитах крови, где присутствуют все ферменты синтеза и деградации дофамина, могут отражать процессы, происходящие в дофаминергических нейронах мозга. При очевидной сложности исследования молекулярных механизмов нейродегенерации в клетках мозга человека лимфоциты крови могут служить объектом исследования при изучении патогенеза нейродегенеративных заболеваний, в частности БП (Pelliano et al., 2007). Полученные данные об ассоциации повышенного уровня α -синуклеина CD45+ клеток крови с развитием БП, дает основание рассматривать этот показатель в качестве маркера развития заболевания.

Предпринимались также попытки оценки уровня альфа-синуклеина клеток крови при БП известной этиологии с выявленным молекулярным дефектом (Пчелина, 2011). Нами выявлены пациенты с БП, обусловленной мутациями в гене обогащенной лейциновыми повторами киназы 2 (LRRK2-ассоциированная БП) (Pchelina et al., 2006, 2008; Пчелина, 2011) и впервые проведено исследование по измерению уровня альфа-синуклеина у этих пациентов (Пчелина и др., 2010). Показано снижение общего альфа-синуклеина как в плазме, так и в лимфоцитах периферической крови у пациентов с LRRK2-ассоциированной БП (в том числе и в группе носителей наиболее распространенной мутации G2019S) по сравнению с пациентами со спорадической БП и контролем. Уровень олигомерного альфа-синуклеина у пациентов с мутацией G2019S *LRRK2* был также снижен по сравнению с контролем, что не совпадает с данными Gorostidi с соавторами, которые не выявили различий уровня альфа-синуклеина плазмы у пациентов с моногенной формой БП, обусловленной мутацией G2019S *LRRK2* и в контроле (Gorostidi et al., 2012).

С одной стороны следует отметить малочисленность обследуемой нами группы с LRRK2-ассоциированной БП (N=7), с другой стороны нельзя исключать влияние мутации G2019S, ассоциированной с увеличением киназной активности LRRK2, на метаболизм α -синуклеина.

Противоречивость результатов по оценке мономерного немодифицированного альфа-синуклеина плазмы и клеток крови у пациентов с БП и в контроле не позволяет в настоящее время говорить об использовании оценки периферического α -синуклеина в качестве прогностического маркера БП (см. табл. 1). В качестве перспективных, следует, однако отметить попытки выявления модифицированных форм БП. Так, в исследовании Prigione с соавт. в лимфоцитах периферической крови пациентов БП выявлено повышение нитрозилированной формы α -синуклеина (Prigione et al., 2010), а в исследованиях группы авторов из Великобритании повышение уровня фосфорилированной формы α -синуклеина (Ser129) в плазме крови (Foulds et al., 2011; Foulds et al., 2013). С другой стороны, ряд авторов показали повышение олигомерных форм α -синуклеина в СМЖ пациентов с БП по сравнению с контролем (см. табл. 1), хотя чувствительность и специфичность методов остаются невысокими (Tokuda et al., 2010; Bruggink et al., 2011; Park et al., 2011, Parnetti et al., 2014), обследованные группы малочисленными и фактор гемолиза при заборе СМЖ неучтенным. Следует отметить перспективность усовершенствования современных методов нейровизуализации путем создания новых радиоактивно меченных лигандов, позволяющих селективно окрашивать агрегаты α -синуклеина (Kikuchi et al., 2010, Vernon et al., 2010). Использование подобных лигандов при проведении ПЭТ позволит проводить прижизненную диагностику синуклеопатий. Данное направление является новым. Необходимо ряд исследований для оценки чувствительности данного метода для диагностики БП, а также выявления корреляции тяжести заболевания с формированием α -синуклеин положительных включений в мозгу человека.

7. Альфа-синуклеин и другие заболевания человека

В настоящее время БП, как и ряд других нейродегенеративных заболеваний человека таких, как деменция с тельцами Леви (ДЛБ), множественная системная атрофия (МСА), нейродегенерация с накоплением железа в клетках мозга относят к классу болезней под названием синуклеопатии. Синуклеопатии характеризуются накоплением нерастворимых агрегированных форм α -синуклеина в виде включений в нейрональных и глиальных клетках мозга (Campbell, Chou, 2012). Филаменты α -синуклеина являются основным ультраструктурным компонентом не только телец Леви, выявляемых при БП, ассоциированной с мультипликацией гена SNCA, но также при спорадической БП и других синуклеопатиях. В частности, данные белковые агрегаты были выявлены в тельцах Леви, обнаруживаемых в нейронах пациентов с ДЛБ и в глиальных цитоплазматических включениях, которые формируются в олигодендроцитах у пациентов с МСА (Campbell, Chou, 2012). Также агрегированные формы α -синуклеина обнаруживаются в нейронах и в глиальных

клетках при некоторых моногенных заболеваниях человека, в частности они присутствуют в нейронах мозга при нейродегенерации с накоплением железа (Galvin et al., 2000).

Сегодня широкое распространение получает гипотеза о возможной агрегации α -синуклеина при ряде редких наследственных заболеваний человека, относящихся к классу лизосомных болезней накопления (ЛБН), характеризующихся генетически обусловленным нарушением синтеза одного или нескольких ферментов лизосом, приводящим к накоплению в них специфического субстрата этих ферментов и нарушению функции лизосом (Mazzulli et al., 2011). Так, агрегаты α -синуклеина выявлены в цитоплазме нейронов различных отделов мозга у пациентов с болезнью Гоше (БГ), болезнью Краббе и синдромом Санфилиппо, что позволяет отнести эти заболевания к группе синуклеопатий (Xu et al., 2011; Smith et al., 2014; Winder-Rhodes et al., 2012).

Накопление α -синуклеина и его агрегация при вышеуказанных ЛБН может происходить либо в результате дисфункции лизосом и нарушения процесса его деградации путем аутофагии, либо нарушения связывания α -синуклеина с клеточной мембраной вследствие изменения липидного состава, связанного с накоплением в цитоплазме клеток субстратов ключевых ферментов.

Исследования последних 10 лет указывают на взаимосвязь синуклеопатий и наиболее распространенной из ЛБН–БГ. БГ – аутосомно-рецессивное наследственное заболевание, обусловленное дефицитом фермента лизосом β -глюкоцереброзидазы (ген GBA), участвующего в расщеплении глюкоцереброзида, входящего в состав мембран клеточных элементов и, как следствие, его накоплением в клетках ретикулоэндотелиальной системы, что приводит к поражениям печени, селезенки, лимфатических узлов, почек, легких, мозга, костного мозга. Гомозиготное носительство мутаций в гене GBA кодирующем глюкоцереброзидазу приводит к развитию БГ, в то время как гетерозиготное носительство существенно (до 8 раз) повышает риск развития БП и ДЛБ (Campbell, Choy, 2012). Мутации в генах NPC1, NPC2, SMPD1 в гомозиготном и гетерозиготном компаундном состоянии приводят к развитию другого относящегося к классу ЛБН заболевания – Нимана-Пика (Tóth et al., 2012; Zech et al., 2013). Совсем недавно был обнаружен повышенный риск развития БП у носителей мутации гена SMPD1, ответственного за развитие заболевания Нимана-Пика (Gan-Or et al., 2013). Однако молекулярный механизм развития БП и ДЛБ у носителей мутаций в генах ЛБН остается неизвестным.

На сегодняшний день патоморфологические исследования мозга пациентов с ЛБН выполнены на единичных пациентах вследствие редкой встречаемости данных заболеваний. Можно предположить, что генетический дефект, приводящий к развитию этого класса наследственных заболеваний человека, будет способствовать повышению уровня α -синуклеина и его агрегации в периферических тканях. Так, в исследовании (Argyriou et al., 2012) было отмечено увеличение уровня димеров α -синуклеина белка в эритроцитах пациентов с БГ.

В нашем исследовании мы впервые оценили уровень олигомерных форм белка α -синуклеина плазме периферической крови пациентов с ЛБН (болезнь Гоше, болезнь Фабри, мукополисахаридоз 1 типа, болезнь Краббе, болезнь Нимана-Пи-

ка тип С и болезнь Вольмана) с целью обозначения α -синуклеина как возможного прогностического маркера поражения нервной системы при этих заболеваниях (Pchelina et al., 2014; Usenko et al., 2013). Нами впервые показано повышение уровня олигомерных форм α -синуклеина плазмы периферической крови при БГ и других ЛБН, а также у двух пациентов с БП носителей мутаций в генах *GBA* и *CLN3* (ген, мутации в котором приводят к развитию заболевания из класса ЛБН – нейролипофуциноза III типа) по сравнению с контрольной группой (рис. 5). Таким образом, анализ литературных данных и результаты собственных исследований указывают на то, что число заболеваний, при которых может наблюдаться повышение уровня α -синуклеина в периферических тканях и жидкостях, а также отложение его агрегированных форм в клетках мозга может быть шире, чем предполагалось несколько лет назад.

8. Заключение

В настоящее время участие α -синуклеина в патогенезе БП подтверждается в ряде исследований. Разработка диагностических тестов БП основанных на оценке

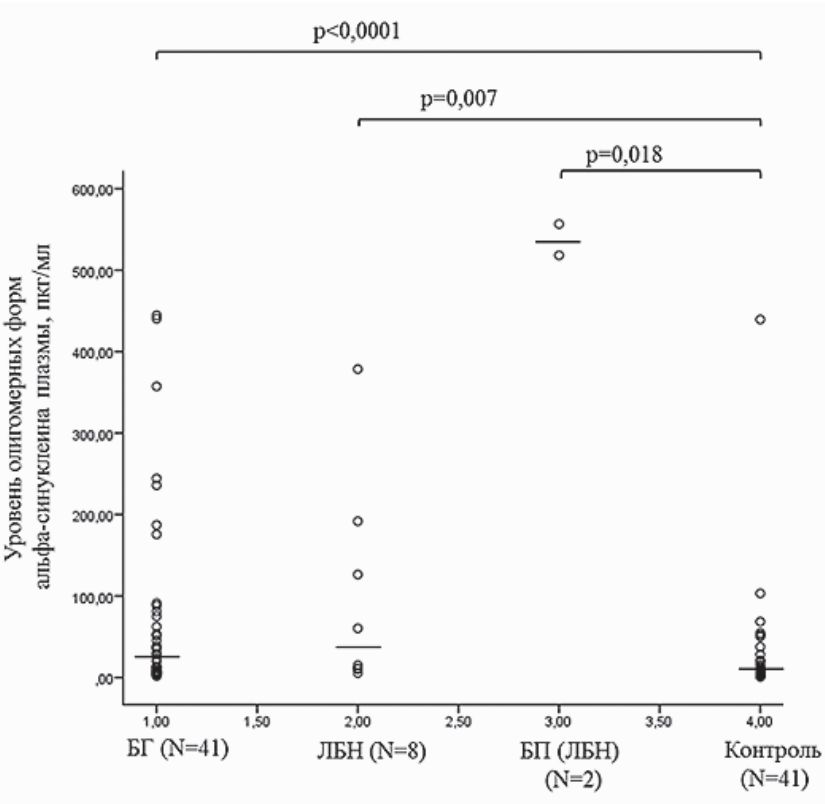


Рис. 5. Уровень олигомерных форм α -синуклеина в плазме крови в группе пациентов с БГ (БГ), другими ЛБН (ЛБН), пациентов с БП с мутациями в генах ЛБН (*GBA*, *CLN3*) (БП(ЛБН)) и контроле. Линиями указаны медианы в каждой исследуемой группе

уровня α -синуклеина в различных тканях человека остается, однако, задачей нерешенной. Отсутствие тахицестов обусловлено, в первую очередь, отсутствием ясного понимания того, какие агрегаты α -синуклеина обладают нейротоксичностью, а также сложностью разработки методов специфичного выявления олигомерных нейротоксичных форм α -синуклеина и их дифференцировки от физиологически активных тетрамеров белка. Анализ литературных данных, а также результаты собственных исследований предполагают, что оценка уровня немодифицированного как общего, так и олигомерного α -синуклеина крови сегодня не может быть использована в качестве прогностического маркера БП. Результаты остаются противоречивыми даже при учете фактора гемолиза и обследовании групп пациентов, не принимающих препараты Л-ДОФА. Альтернативно, перспективным представляется измерение модифицированных форм α -синуклеина в крови, а также оценка α -синуклеина в клеточных фракциях крови, полученных путем клеточного сортирования, в частности в CD45+ клеточных лизатах. Формирование агрегатов α -синуклеина при других заболеваниях человека указывает на необходимость адекватной оценки специфичности предлагаемых маркеров. Наиболее прогностически значимым может стать развитие методов нейровизуализации, способных выявлять накопление α -синуклеина в отделах мозга.

Литература

- Иллариошкин С.Н. Конформационные болезни мозга. М.: Янус-К, 2003.
- Литвиненко И.В., Одинак М.М., Сологуб О.С. и др. Гипергомоцистеинемия при болезни Паркинсона – новый вариант осложнений проводимой терапии или специфический биохимический маркер заболевания? *Анналы клинической и экспериментальной неврологии*/ 2008/ № 2. С. 13-17.
- Пчелина С.Н. Альфа-синуклеин как биомаркер болезни Паркинсона. *Анналы клинической и экспериментальной неврологии*. 2011. Т. 4. С. 46-51.
- Пчелина С.Н., Емельянов А.К., Якимовский А.Ф. и др. Сниженный уровень альфа-синуклеина в лейкоцитах периферической крови у пациентов с LRRK2-ассоциированной болезнью Паркинсона, *Бюлл. экпер. биол. и мед.* 2010. Т. 150. № 12. С. 619-621.
- Aerts M.B., Esselink R.A., Abdo W.F., Bloem B.R., Verbeek M.M. CSF α -synuclein does not differentiate between parkinsonian disorders. *Neurobiol Aging*. 2012. Vol. 33. № 2. P. 430.
- Anderson J., Walker D.E., Goldstein J.M. et al. Phosphorylation of Ser-129 is the dominant pathological modification of alpha-synuclein in familial and sporadic Lewy body disease // *J. Biol. Chem.* 2006. Vol. 281. С. 29739-29752.
- Andoskin P.A., Emelyanov A.K. Yakimovsky A.F. Timofeeva A.A., Pchelina S.N. Oligomeric alpha-synuclein levels in blood plasma in LRRK2 – linked Parkinson's disease // *European J. Human Genetics*. 2013. Vol. 21. Suppl. 2. P. 513.
- Argyriou A, Dermentzaki G, Papisilekas T et al. Increased dimerization of alpha-synuclein in erythrocytes in Gaucher disease and aging // *Neurosci. Lett.* 2012. Vol. 528. № 2. P. 205-209.
- Barbour R., Kling K., Anderson J.P. et al. Red blood cells are the major source of alpha-synuclein in blood. *Neurodegener Dis.* 2008. № 5. P. 55-59.
- Bartels T., Choi J.G., Selkoe D.J. α -Synuclein occurs physiologically as a helically folded tetramer that resists aggregation. *Nature*. 2011. Vol. 477. № 7362. P. 107-110.
- Beyer K. Alpha-synuclein structure, posttranslational modification and alternative splicing as aggregation enhancers // *Acta Neuropathol.* 2006. Vol. 112. № 3. P. 237-251.
- Bisaglia M., Mammi S., Bubacco L. Structural insights on physiological functions and pathological effects of alpha-synuclein // *FASEB J.* 2009. Vol. 23. P. 329-340.

- Bisaglia M., Greggio E., Dragan M., et al.* α -Synuclein overexpression increases dopamine toxicity in BE(2)-M17 // *Cells BMC Neurosci.* 2010. Vol. 11. P. 41.
- Brighina L., Prigione A., Begni B. et al.* Lymphomonocyte alpha-synuclein levels in aging and in Parkinson disease // *Neurobiol. Aging.* 2010. Vol. 31. P. 884-885.
- Bruggink K.A., Kuiperij H.B., Ekholm-Pettersson F., Verbeek M.M.* Detection of elevated levels of α -synuclein oligomers in CSF from patients with Parkinson disease // *Neurology.* 2011. T. 2. Vol. 77. № 5. P. 51.
- Cabin D.E., Shimazu K., Murphy D. et al.* Synaptic vesicle depletion correlates with attenuated synaptic responses to prolonged repetitive stimulation in mice lacking alpha-synuclein // *J. Neurosci.* 2002. Vol. 22. P. 8797-8807.
- Campbell T.N., Choy F.Y.* Gaucher disease and the synucleinopathies: redefining the relationship // *Orphanet. J. Rare Dis.* 2012. Vol. 7. P. 12.
- Carotini B., Tanda G., Colosimo C.* Reduced dopamine in peripheral blood lymphocytes in Parkinson's disease // *NeuroReport.* 1999. Vol. 10. P. 2907-2920.
- Conway K.A., Harper J.D., Lansbury P.T.* Accelerated in vitro fibril formation by a mutant alpha-synuclein linked to early-onset Parkinson disease // *Nat. Med.* 1998. Vol. 4. P. 1318-1320.
- Cookson M.R., van der Brug M.* Cell systems and the toxic mechanism(s) of alpha-synuclein // *Exp. Neurol.* 2008. Vol. 209. P. 5-11.
- Davidson W.S., Jonas A., Clayton D.F., George J.M.* Stabilization of alpha-synuclein secondary structure upon binding to synthetic membranes // *J. Biol. Chem.* 1998. Vol. 273. P. 9443-9449.
- Duran R., Barrero F.J., Morales B. et al.* Plasma alpha-synuclein in patients with Parkinson's disease with and without treatment // *Mov. Disord.* 2010. Vol. 25. P. 489-493.
- Elbaz A., Ross O.A., Ioannidis J.P., Soto-Ortolaza A.I., Moisan F., Aasly J. et al.* Independent and joint effects of the MAPT and SNCA genes in Parkinson disease // *Ann. Neurol.* 2011. Vol. 69. № 5. P. 778-792.
- Ellis C.E., Schwartzberg P.L., Grider T.L., Fink D.W., Nussbaum R.L.* Alpha-synuclein is phosphorylated by members of the Src family of protein-tyrosine kinases // *J. Biol. Chem.* 2001. Vol. 276. P. 3879-3884.
- Emelyanov A., Andoskin P., Yakimovskii A. et al.* SNCA, LRRK2, MAPT polymorphisms and Parkinson's disease in Russia // *Parkinsonism Relat Disord.* 2013. Vol. 19. № 11. P. 1064-1065.
- Emelyanov A. K., Andoskin P., Yakimovskii A. et al.* The CD45+ blood cells alpha-synuclein level in Parkinson's disease // *J. Human Genetics.* 2014. Vol. 22. № 1. P. 193.
- Feany M.B., Bender W.W.* A drosophila model of Parkinson's disease // *Nature.* 2000. Vol. 404. P. 394-398.
- Foulds P.G., Mitchell J.D., Parker A. et al.* Phosphorylated α -synuclein can be detected in blood plasma and is potentially a useful biomarker for Parkinson's disease // *FASEB J.* 2011. Vol. 25. № 12. P. 4127-4137.
- Foulds P.G., Diggle P., Mitchell D. et al.* A longitudinal study on alpha-synuclein in blood plasma as a biomarker for Parkinson's disease // *Scientific reports.* 2013. Vol. 3. P. 2540. DOI:10.1038.
- Fuchs J., Tichopad A., Golub Y. et al.* Genetic variability in the SNCA gene influences alpha-synuclein levels in the blood and brain // *FASEB J.* 2008. Vol. 22. P. 1327-1334.
- Fujiwara H., Hasegawa M., Dohmae N. et al.* Alpha-Synuclein is phosphorylated in synucleinopathy lesions // *Nat. Cell Biol.* 2002. Vol. 4. № 2. P. 160-164.
- Galvin J.E., Giasson B., Hurtig H.I., Lee V.M., Trojanowski J.Q.* Neurodegeneration with brain iron accumulation, type 1 is characterized by alpha-, beta-, and gamma-synuclein neuropathology // *Am. J. Pathol.* 2000. Vol. 157. № 2. P. 361-368.
- Gan-Or Z., Ozelius L.J., Bar-Shira A. et al.* The p.L302P mutation in the lysosomal enzyme gene SMPD1 is a risk factor for Parkinson's disease // *Neurology.* 2013. Vol. 80. № 17. P. 1606-1610.
- Giasson B.I., Murray I.V., Trojanowski J.Q., Lee V.M.* A hydrophobic stretch of 12 amino acid residues in the middle of alpha-synuclein is essential for filament assembly // *J. Biol. Chem.* 2001. Vol. 276. P. 2380-2386.
- Gorostidi A., Bergareche A., Ruiz-Martínez J. et al.* Alpha-synuclein levels in blood plasma from LRRK2 mutation carriers // *PLoS One.* 2012. Vol. 7. № 12. P. e52312.
- Greggio E., Bisaglia M., Civiero L., Bubacco L.* Leucine-rich repeat kinase 2 and alpha-synuclein: intersecting pathways in the pathogenesis of Parkinson's disease? // *Mol. Neurodegener.* 2011. Vol. 6. P. 6.
- Greten-Harrison B., Polydoro M., Morimoto-Tomita M. et al.* $\alpha\beta\gamma$ -Synuclein triple knockout mice reveal age-dependent neuronal dysfunction // *PNAS.* 2010. Vol. 107. P. 19573-19578.
- Hong Z., Shi M., Chung K.A. et al.* DJ-1 and alpha-synuclein in human cerebrospinal fluid as biomarkers of Parkinson's disease // *Brain.* 2010. Vol. 133. P. 713-726.

- Ibáñez P., Lesage S., Janin S. et al.* Alpha-synuclein gene rearrangements in dominantly inherited parkinsonism: frequency, phenotype, and mechanisms // *Arch. Neurol.* 2009. Vol. 66. P. 102-108.
- Ischiropoulos H.* Oxidative modifications of alpha-synuclein. Parkinson's disease: the life cycle of the dopamine // *Neuron.* 2003. Vol. 991. P. 93-100.
- Kikuchi A., Takeda A., Okamura N. et al.* In vivo visualization of alpha-synuclein deposition by carbon-11-labelled 2-[2-(2-dimethylaminothiazol-5-yl)ethenyl]-6-[2-(fluoro)ethoxy]benzoxazole positron emission tomography in multiple system atrophy // *Brain.* 2010. Vol. 133. Pt 6. P. 1772-1778.
- Kim S., Seo J.H., Suh Y.H.* Alpha-synuclein, Parkinson's disease, and Alzheimer's disease, parkinsonism // *Relat. Disord.* 2004. Vol. 10. P. S9-13.
- Kovacs G.G., Wagner U., Dumont B. et al.* An antibody with high reactivity for disease-associated α -synuclein reveals extensive brain pathology // *Acta. Neuropathol.* 2012. Vol. 124. № 1. P. 37-50.
- Kruger R., Kuhn W., Muller T. et al.* Ala30Pro mutation in the gene encoding alphasynuclein in Parkinson's disease. // *Nat. Genet.* 1998. Vol. 18. № 2. P. 106-108.
- Lee F.J.S., Liu F., Pristupa Z.B., Niznik H.B.* Direct binding and functional coupling of alpha-synuclein to the dopamine transporters accelerate dopamine-induced apoptosis. *Faseb J.* 2001; 15:916–926.
- Lee P.H., Lee G., Park H.J. et al.* The plasma alpha-synuclein levels in patients with Parkinson's disease and multiple system atrophy // *J. Neural. Transm.* 2006. Vol. 13. P. 1435-1439.
- Lesage S., Anheim M., Letournel F. et al.* The French Parkinson's Disease Genetics (PDG) Study Group. G51D α -synuclein mutation causes a novel parkinsonian-pyramidal syndrome // *Ann. Neurol.* 2013. doi: 10.1002/ana.23894. [Epub ahead of print].
- Li Q.X., Mok S.S., Laughton K.M. et al.* Plasma alpha-synuclein is decreased in subjects with Parkinson's disease // *Exp. Neurol.* 2007. Vol. 204. P. 583-588.
- Lill C.M., Roehr J.T., McQueen M.B. et al.* Comprehensive research synopsis and systematic meta-analyses in Parkinson's disease genetics: The PDGene database // *PLoS Genet.* 2012. Vol. 8. № 3. P. e1002548.
- Luk K.C., Song C., O'Brien P. et al.* Exogenous alpha-synuclein fibrils seed the formation of Lewy body-like intracellular inclusions in cultured cells // *PNAS.* 2009. Vol. 106. P. 20051-20056.
- Malek N., Swallow D., Grosset K.A. et al.* Grosset Alpha-synuclein in peripheral tissues and body fluids as a biomarker for Parkinson's disease – a systematic review // *Acta. Neurol. Scandinavica.* 2014. Vol. 130. № 2. P. 59-72.
- Maroteaux L., Campanelli J.T., Scheller R.H.* Synuclein – a neuron-specific protein localized to the nucleus and presynaptic nerve-terminal // *J. Neurosci.* 1988. Vol. 8. P. 2804-2815.
- Masliah E., Rockenstein E., Veinbergs I. et al.* Dopaminergic loss and inclusion body formation in alpha-synuclein mice: implications for neurodegenerative disorders // *Science.* 2000. Vol. 287. P. 1265-1269.
- Mazzulli J.R., Xu Y.H., Sun Y. et al.* Gaucher disease glucocerebrosidase and α -synuclein form a bidirectional pathogenic loop in synucleinopathies // *Cell.* 2011. Vol. 146. № 1. P. 37-52.
- Michell A.W., Luheshi L.M., Barker R.A.* Skin and platelet alpha-synuclein as peripheral biomarkers of Parkinson's disease // *Neurosci. Lett.* 2005. Vol. 381. P. 294-298.
- Miller D.W., Hague S.M., Clarimon J. et al.* Alpha-synuclein in blood and brain from familial Parkinson disease with SNCA locus triplication // *Neurology.* 2004. Vol. 62. P. 1835-1838.
- Mollenhauer B., Cullen V., Kahn I. et al.* Direct quantification of CSF alpha-synuclein by ELISA and first cross-sectional study in patients with neurodegeneration // *Exp. Neurol.* 2008. Vol. 213. P. 315-325.
- Nemani V.M., Lu W., Berge V. et al.* Increased expression of alpha-synuclein reduces neurotransmitter release by inhibiting synaptic vesicle re-clustering after endocytosis // *Neuron.* 2010. Vol. 65. P. 66-79.
- Nishioka K., Hayashi S., Farrer M.J. et al.* Clinical heterogeneity of alpha-synuclein gene duplication in Parkinson's disease // *Ann. Neurol.* 2006. Vol. 59. P. 298-309.
- Norris E.H., Giasson B.I., Ischiropoulos H., Lee V.M.Y.* Effects of oxidative and nitrative challenges on alpha-synuclein fibrillogenesis involve distinct mechanisms of protein modifications // *J. Biol. Chem.* 2003. Vol. 278. P. 27230-27240.
- Olteanu A., Pielak G.J.* Peroxidative aggregation of alpha-synuclein requires tyrosines // *Protein Science.* 2004. Vol. 13. P. 2852-2856.
- Paleologou K.E., Oueslati A., Shakked G. et al.* Phosphorylation at S87 is enhanced in synucleinopathies, inhibits alpha-synuclein oligomerization, and influences synuclein-membrane interactions // *J. Neurosci.* 2010. Vol. 30. P. 3184-3198.

- Park M.J., Cheon S.M., Bae H.R., Kim S.H., Kim J.W. Elevated levels of α -synuclein oligomer in the cerebrospinal fluid of drug-naïve patients with Parkinson's disease // *J. Clin. Neurol.* 2011. Vol. 7. № 4. P. 215-222.
- Parnetti L., Chiasserini D., Persichetti E. et al. Cerebrospinal fluid lysosomal enzymes and alpha-synuclein in Parkinson's disease // *Mov. Disord.* 2014. Vol. 29. № 8. P.1019-1027.
- Pchelina S.N., Yakimovskii A.F., Ivanova O.N. et al. G2019S LRRK2 mutation in familial and sporadic Parkinson's disease in Russia // *Mov. Disord.* 2006. Vol. 21. P. 2234-2236.
- Pchelina S.N., Yakimovskii A.F., Emelyanov A.K. et al. Screening for LRRK2 mutations in patients with Parkinson's disease in Russia: identification of a novel LRRK2 variant // *Eur. J. Neurol.* 2008. Vol. 15. P. 692-696.
- Pchelina S.N., Nuzhnyi E.P., Emelyanov A.K. et al. Increased plasma oligomeric alpha-synuclein in patients with lysosomal storage diseases // *Neurosci. Lett.* 2014. Vol. 583C. P. 188-193.
- Pellicano C., Buttarelli F.R., Circella A. et al. Dopamine transporter immunoreactivity in peripheral blood lymphocytes discriminates Parkinson's disease from essential tremor // *J. Neural. Transm.* 2007. Vol. 114. P. 935-938.
- Perez R., Waymire J.C., Lin E. et al. A role for alpha-synuclein in the regulation of dopamine biosynthesis // *J. Neurosci.* 2002. Vol. 22. P. 3090-3099.
- Polymeropoulos M.H., Lavedan C., Leroy E. et al. Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease // *Science.* 1997. Vol. 276. P. 2045-2047.
- Prigione A., Piazza F., Brighina L. et al. Alpha-synuclein nitration and autophagy response are induced in peripheral blood cells from patients with Parkinson disease // *Neurosci. Lett.* 2010. Vol. 477. P. 6-10.
- Proukakis C., Dudzik C.G., Brier T. et al. A novel α -synuclein missense mutation in Parkinson disease // *Neurology.* 2013. Vol. 80. № 11. P. 1062-1064.
- Schmid A.W., Fauvet B., Moniatte M., Lashuel H.A. Alpha-synuclein post-translational modifications as potential biomarkers for Parkinson disease and other synucleinopathies // *Mol. Cell Proteomics.* 2013. Vol. 12. № 12. P. 3543-3558.
- Shi M., Bradner J., Hancock A.M. et al. Cerebrospinal fluid biomarkers for Parkinson disease diagnosis and progression // *Ann. Neurol.* 2011. Vol. 69. P. 570-580.
- Singleton A.B., Farrer M., Johnson J. et al. Aalpha-Synuclein locus triplication causes Parkinson's disease // *Science.* 2003. Vol. 302. № 5646. P. 841.
- Smith B.R., Santos M.B., Marshall M.S. et al. Neuronal inclusions of α -synuclein contribute to the pathogenesis of Krabbe disease // *J. Pathol.* 2014. [Epub ahead of print].
- Spillantini M.G., Schmidt M.L., Lee V.M.Y. et al. Alpha-synuclein in Lewy bodies // *Nature.* 1997. Vol. 388. P. 839-840.
- Tokuda T., Qureshi M.M., Ardah M.T. et al. Detection of elevated levels of α -synuclein oligomers in CSF from patients with Parkinson disease // *Neurology.* 2010. Vol. 75. P. 1766-1772.
- Tóth B., Erdős M., Székely A., Ritli L., Bagossi P., Sümegi J., Maródi L. Molecular genetic characterization of novel sphingomyelin phosphodiesterase 1 mutations causing niemann-pick disease // *JIMD Rep.* 2012. Vol. 3. P. 125-129.
- Ueda K., Fukushima H., Masliah E. et al. Molecular cloning of cDNA encoding an unrecognized component of amyloid in Alzheimer disease // *PNAS.* 1993. Vol. 90. P. 11282-11286.
- Usenko T., Emelyanov A., Nuzhnyi E., Boukina T., Zakharova E., Pchelina S. Increased level of alpha-synuclein oligomers in blood plasma in Gaucher disease // *European J. Human Genetics.* 2013. Vol. 21. Suppl. 2. P. 250.
- Vernon A.C., Ballard C., Modo M. Neuroimaging for Lewy body disease: is the in vivo molecular imaging of α -synuclein neuropathology required and feasible? // *Brain. Res. Rev.* 2010. Vol. 65. P. 28-55.
- Waxman E.A., Giasson B.I. A novel, high-efficiency cellular model of fibrillar alpha-synuclein inclusions and the examination of mutations that inhibit amyloid formation // *J. Neurochem.* 2010. Vol. 113. P. 374-388.
- Westerlund M., Belin A.C., Anvret A. et al. Cerebellar alpha-synuclein levels are decreased in Parkinson's disease and do not correlate with SNCA polymorphisms associated with disease in a Swedish material // *FASEB J.* 2008. Vol. 22. P. 3509-3514.
- Winder-Rhodes S.E., Garcia-Reitböck P., Ban M., Evans J.R. et al. Genetic and pathological links between Parkinson's disease and the lysosomal disorder Sanfilippo syndrome // *Mov. Disord.* 2012. Vol. 27. № 2. P. 312-315.

- Xu Y.H., Sun Y., Ran H., Quinn B., Witte D., Grabowski G.A.* Accumulation and distribution of α -synuclein and ubiquitin in the CNS of Gaucher disease mouse models // *Mol. Genet. Metab.* 2011. Vol. 102. № 4. P. 436-447.
- Zarranz J.J., Alegre J., Gomez-Esteban J.C. et al.* The new mutation, E46K, of alpha- synuclein causes Parkinson and Lewy body dementia // *Ann. Neurol.* 2004. Vol. 55. P. 164-173.
- Zech M., Nübling G., Castrop F. et al.* Niemann-pick C disease gene mutations and age-related neurodegenerative disorders // *PLoS One.* 2013. Vol. 8. № 12. P. e82879.

Генетические факторы в патогенезе семейной и спорадической формы болезни Паркинсона

М.И. Шадрина, Е.В. Филатова, А.Х. Алиева,
С.А. Лимборская, П.А. Сломинский

Содержание

1. Семейная форма болезни Паркинсона
2. Основные моногенные варианты болезни Паркинсона
3. Генетические факторы в патогенезе спорадической болезни Паркинсона
4. Транскриптомные исследования при болезни Паркинсона
 - 4.1. Анализ экспрессии в тканях головного мозга
 - 4.2. Анализ изменения экспрессии генов в периферической крови
5. Роль микро-РНК в патогенезе болезни Паркинсона
 - 5.1. Роль белков биогенеза микро-РНК в болезни Паркинсона
 - 5.2. Роль микро-РНК в регуляции генов семейных форм болезни Паркинсона
 - 5.3. Микро-РНК и другие гены-кандидаты в патогенезе болезни Паркинсона
6. Генетический анализ болезни Паркинсона как ключ к этиопатогенезу заболевания

1. Семейная форма болезни Паркинсона

Болезнь Паркинсона (БП) (паркинсонизм, или дрожательный паралич) относится к числу наиболее распространенных и социально значимых заболеваний нервной системы человека. Впервые эту болезнь описал английский врач Джеймс Паркинсон в 1817 г. в своем «Эссе о дрожательном параличе», в котором обобщил результаты наблюдений за шестью пациентами. Семейная форма БП впервые была описана несколько позднее, в начале двадцатого века. В настоящее время считается, что семейная форма заболевания составляет, по разным данным, от 10 до 20% от всех случаев БП (Corpede, 2012; Sharma et al., 2012). Но у большинства больных развитие заболевания носит спорадический характер и определяется сложным взаимодействием между генетической конституцией организма и факторами внешней среды. При этом анализ семей с БП показал, что сочетание сходного генетического фона и образа жизни повышает риск развития заболевания у родственников больных идиопатическим (спорадическим) паркинсонизмом в 3–14 раз по сравнению с контролем (Pankratz, Foroud, 2004).

На данный момент в геноме человека выявлен целый ряд генов, так или иначе вовлеченных в патогенез БП. Для семи генов (*SNCA*, *PARK2*, *PINK1*, *PARK7*, *LRRK2*, *ATP13A2*, *VSP35*) точно определен характер наследования и выявлены мутации, приводящие к развитию моногенных форм БП. Для трех генов (*SNCA*, *PARK2* и *MAPT*) выявлены полиморфизмы, значительно повышающие риск развития спорадической формы заболевания во многих популяциях мира, и для одного гена – гена *GBA*, выявлены мутации с неполной пенетрантностью, приводящие к

Сокращения: БП – болезнь Паркинсона, НДЗ – нейродегенеративные заболевания.

Ключевые гены болезни Паркинсона

Локус	Ген/ Белок	Наследование	Возможная функция
PARK1/ PARK4	<i>SNCA</i> / α -синуклеин	АД	Пресинаптический белок, компонент телец Леви, играет важную роль в экзо- и эндоцитозе
PARK2	<i>PARK2</i> / Паркин	АР	Убиквитин-Е3-лигаза, играет важную роль в убиквитин-зависимом протеолизе и митофагии
PARK6	<i>PINK1</i> / Серин/треонин-протеин киназа PINK1	АР	Митохондриальная протеин-киназа, играет важную роль в митофагии
PARK7	<i>PARK7</i> / Белок DJ-1	АР	Шаперон, является сенсором оксидантного стресса и защищает клетки от токсических воздействий
PARK8	<i>LRRK2</i> / Киназа 2 с лейцин-богатыми повторами, дардарин	АД	Протеин-киназа, принимает участие в контроле над обменом синаптических везикул и динамикой цитоскелета, в функционировании митохондрий, лизосом и аппарата Гольджи
PARK9	<i>ATP13A2</i> / АТФаза 13A2	АР	Лизосомная АТФаза, играет важную роль в лизосомной аутофагии
–	<i>VSP35</i> /Вакулярный белок VSP35	АД	Обеспечивает обратный транспорт эндосом к комплексу Гольджи
–	<i>GBA</i> /бета- глюкоцереброзидаза	–	Принимает участие в лизосомной аутофагии
–	<i>MAPT</i> / белок тау	–	Играет важную роль в формировании и поддержании цитоскелета

АД – аутосомно-доминантное; АР – аутосомно-рецессивное.

развитию БП (табл. 1). В начале мы более подробно остановимся на шести генах, связанных с развитием семейных форм БП – таких как ген α -синуклеина (*SNCA*), ген паркина (*PARK2*), ген белка DJ-1 (*PARK7*), ген белка PINK1 (*PINK1*), ген дардарина (*LRRK2*) и ген лизосомной АТФазы 13A2 (*ATP13A2*). Это связано с тем, что данные гены являются наиболее изученными и для них наиболее полно определена роль в патогенезе БП.

2. Основные моногенные варианты болезни Паркинсона

Ген α -синуклеина, SNCA. Исторически первым идентифицированным геном, ассоциированным с семейной формой БП, был ген α -синуклеина (*SNCA*), картированный на хромосоме 4q21. Он был выявлен в семье итало-американского происхождения с аутосомно-доминантной формой БП (Polymeropoulos et al., 1996), в которой в гене *SNCA* была обнаружена обуславливающая развитие заболевания миссенс-мутация A53T. Эта же мутация была найдена в семье из Греции (Polymeropoulos et al., 1997). В дальнейшем в этом гене были обнаружены еще две мутации – A30P

в семье из Германии (Kruger et al., 1998) и E46K в испанской семье (Zarranz et al., 2004). Но в целом точковые мутации в гене *SNCA* являются крайне редкими, и анализ большого числа больных с семейной и спорадической формой БП указывает на то, что они не играют существенной роли в патогенезе БП (Farrer et al., 1998; Pastor et al., 2001). В российской популяции несмотря на интенсивные поиски также не было выявлено точковых мутаций в гене *SNCA* (Ilarioshkin et al., 2000).

Недавно появились данные о том, что важную роль в развитии БП могут играть мутации, связанные с изменением дозы гена *SNCA*. Выявлены дупликации и трипликации геномного региона, содержащего ген *SNCA*, в семьях с аутосомно-доминантной формой заболевания. Размер мультипликаций варьирует от 0,4 до 6,37 Мб, захватывая от 1 до 33 генов (Ibanez et al., 2009; Ross et al., 2008a,b). Предполагают, что причиной возникновения подобных мутаций является неравный кроссинговер по LINE-повторам, встречающимся на протяжении мультиплицируемой области. Частота больных с дупликациями и трипликациями гена *SNCA* в исследованных популяциях при семейной форме БП варьирует от полного отсутствия в популяциях из Германии, Португалии и США до 2,7% в Корее, и в среднем составляет ~1,4%. При спорадической форме БП частота больных с дупликациями и трипликациями гена *SNCA* варьирует также от полного их отсутствия в японской, португальской и американской популяциях и до 1% в Европе и Северной Африке, и в среднем составляет ~0,3% (Lesage, Brice, 2009). Недавний анализ американско-шведской семьи выявил больных как с дупликацией, так и с трипликацией гена *SNCA*. Причем дупликация была обнаружена в шведской ветви, а трипликация – в американской (Farrer et al., 2004). В российской популяции также был проведен анализ данного типа мутаций в гене *SNCA* у семейных больных БП с аутосомно-доминантной формой наследования. По всей видимости, мутации такого типа чрезвычайно редки в нашей популяции, и можно предположить, что дупликации и трипликации гена *SNCA* не вносят существенного вклада в патогенез аутосомно-доминантной формы БП у больных из России. В связи с этим дальнейший анализ мультипликаций гена *SNCA* при спорадической форме БП у больных из России не представляется целесообразным (Семенова и др., 2009).

Интересно отметить, что клиническая картина заболевания зависит не от протяженности мультиплицируемой области, а от количества копий гена *SNCA* (Ibanez et al., 2009; Ross et al., 2008a,b). Больные с дупликациями в гетерозиготном состоянии (в целом три копии гена *SNCA* на ядро) по клиническим проявлениям напоминают спорадических больных БП, т.е. заболевание начинается в позднем возрасте и медленно прогрессирует. С увеличением числа копий гена *SNCA* до четырех (при трипликациях в гетерозиготном состоянии и дупликациях в гомозиготном состоянии) заболевание принимает более тяжелую форму, а именно – болезнь начинается в более раннем возрасте, быстрее прогрессирует, обладает выраженной деменцией и часто сопровождается вегетативной дистонией (Ibanez et al., 2009; Ross et al., 2008a,b).

Ген *SNCA* кодирует белок α -синуклеин, который в нативном состоянии является нескладчатым белком, содержит 140 аминокислотных остатков и состоит из трех функциональных участков: N-концевого участка, содержащего амфипатический

α -спиральный домен, гидрофобной центральной области, содержащей домен с β -амилоидным компонентом (NAC-домен), и кислой C-концевой области.

Хорошо известно, что протофибриллы α -синуклеина являются основным компонентом телец Леви при БП. Это указывает на важную роль процессов агрегации α -синуклеина в патогенезе заболевания (Fortin et al., 2004). Такого рода накопление α -синуклеина может быть связано с изменением дозы гена α -синуклеина и повышением уровня его экспрессии (что происходит при дупликациях и трипликациях области гена *SNCA*) или с изменением процессов протеолитической деградации мутантных форм α -синуклеина.

В настоящее время считается, что α -синуклеин является молекулярным шапероном и регулирует белок-белковые и белок-липидные взаимодействия (Yavich et al., 2004), а также он является пресинаптическим белком и играет важную роль в синаптическом везикулярном транспорте (Sudhof, Rizo, 2011).

Ген паркина, PARK2. Ген *PARK2* был картирован в 1997 г. на хромосоме 6q25.2-q27 (Kitada et al., 1998). Он состоит из 12 экзонов и кодирует белок паркин, содержащий 465 аминокислотных остатков и обладающий убиквитин-лигазной активностью. Структурно-функциональный анализ гена *PARK2* и белка паркина показал, что этот белок является E3 убиквитин-лигазой и входит в RBR-семейство убиквитин-лигаз. Непосредственной функцией паркина является перенос убиквитина с убиквитин-конъюгирующих ферментов на специфичные субстраты, которыми являются α -синуклеин, синфилин-1, паркин, Sept5 (CDCrel-1), Sept4 (CDCrel-2), PAEL-R, циклин E, JTV1(p38), синаптотагмин XI, тубулин, p38 субъединица аминоацил-тРНК синтетазы и белки с полиглутаминовыми повторами (Shimura et al., 2000). Взаимодействие паркина с субстратами идет за счет RING-IBR-RING доменов белка, кодируемых экзонами 7–11 гена. N-концевая область паркина, кодируемая экзонами 1 и 2, содержит убиквитин-подобный домен (UBL), взаимодействующий с Rpt6 и Rpn10-субъединицами протеасом. C-концевой домен паркина, кодируемый экзоном 12, содержит мотив, взаимодействующий с PDZ-мотивом кальций/кальмодулин-зависимых протеин-киназ. Это взаимодействие обеспечивает синаптический транспорт паркина. Кроме того, в состав паркина входят богатый цистеином паркин-специфический домен UPD, кодируемый экзонами 4–6, а также чувствительный к каспазам 1 и 8 домен (он кодируется экзоном 3). Протеолитические продукты расщепления белка паркина каспазами найдены в дегенерирующих нервных клетках головного мозга БП (Kahns et al., 2003).

Как уже говорилось выше, паркин главным образом функционирует как E3 убиквитин-лигаза и катализирует убиквитинирование поврежденных белков, которые затем подвергаются протеасомной деградации. Следовательно, недостаточность паркина может приводить к нарушению процессов убиквитинирования и накоплению в клетке белков, являющихся субстратами паркина, а это в свою очередь может вести к смерти нейронов. Кроме того установлено, что паркин играет важную роль в процессах митофагии (Ding, Yin, 2012; Youle, Narendra, 2011).

Имеются также данные о том, что паркин может выступать в качестве комплексного нейропротекторного белка при целом ряде токсичных поражений, являющихся критическими для выживаемости дофаминергических нейронов (Cookson, 2005).

Впервые мутации в гене были описаны в семье из Японии (Kitada et al., 1998). Позднее мутации были обнаружены у представителей разных этнических групп. В настоящее время описано более 100 семей с аутосомно-рецессивным ювенильным паркинсонизмом, в которых причиной развития БП являются различные мутации в гене *PARK2*. Необходимо отметить, что данная форма БП отличается своеобразной нейропатологической картиной – у больных в большинстве случаев отсутствуют характерные для других форм заболевания тельца и нейриты Леви.

В гене *PARK2* в семьях с аутосомно-рецессивной ювенильной формой заболевания на данный момент выявлено более 120 различных мутаций. Среди них основную часть составляют миссенс-мутации (идентифицировано более 50 аминокислотных замен) и мутации с изменением копийности отдельных экзонов или групп экзонов (делеции, дупликации и трипликации) (Bertoli-Avella et al., 2005; Hedrich et al., 2002; Sharioshkin et al., 2003; Kann et al., 2002). Высокая частота мутаций с изменением копийности является характерной особенностью спектра мутаций при ювенильной форме БП – их частота составляет от 33 до 66% от всех мутаций в гене *PARK2* (Bertoli-Avella et al., 2005; Hedrich et al., 2002; Periquet et al., 2003). Анализ такого рода мутаций с изменением копийности экзонов требует использования специальных методов молекулярно-генетической диагностики. Нами разработан метод полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени в технологии TaqMan, позволяющий оценивать копийность экзонов гена паркина путем сравнения интенсивностей амплификационных сигналов от экзона этого гена и от гена-свидетеля (ген β -глобина) (Shadrina et al., 2007; Шадрина и др., 2006; Шадрина, Сломинский, 2006). С помощью разработанного метода проведена оценка делеционных и дупликационных мутаций по всем двенадцати экзонам гена *PARK2* у российских больных спорадической формой БП с ранним (до 45 лет) и поздним (более 45 лет) возрастом клинического дебюта заболевания. Было показано, что делеции и дупликации экзонов гена *PARK2* вносят существенный вклад в развитие спорадической формы БП в российской популяции. Обнаружено, что у людей, имеющих делеции и дупликации, риск развития заболевания повышен в 8,53 раза (95% ДИ=1,14–63,52; $p=0,0095$) Вероятность развития спорадической формы БП в раннем возрасте у людей, имеющих мутации с изменением копийности экзонов гена *PARK2*, повышена в 13,95 раза (95% ДИ=1,85–105,96; $p=0,0004$). Было также впервые установлено, что ген *PARK2* отвечает за часть фенотипической variability болезни Паркинсона в российской популяции. Показано, что наличие делеций и/или дупликаций экзонов в гене *PARK2* способствует существенному снижению возраста клинического дебюта болезни Паркинсона (на 9 лет), развитию дистонии и симметричному протеканию заболевания (Semenova et al., 2012).

В целом в настоящее время считается, что гомозиготность или компаундная гетерозиготность по мутациям в гене *PARK2* являются причиной развития заболевания у почти 50% больных с ювенильным аутосомно-рецессивным паркинсонизмом и 5–10% больных со спорадической формой БП с ранним (до 50 лет) началом развития заболевания. В некоторых семьях с мутациями в гене *PARK2* выявлен аутосомно-доминантный характер наследования заболевания (Oliveira et al., 2003).

Была высказана гипотеза о том, что даже в гетерозиготном состоянии мутация в гене *PARK2* может приводить к развитию болезни по механизму гаплонедостаточности, хотя не исключается также доминантно-негативный эффект, или токсическое изменение функции мутантного белка (West et al., 2002). Роль мутаций в гене паркина в развитии БП была косвенно подтверждена при позитронно-эмиссионной томографии (ПЭТ), когда было обнаружено пропорциональное снижение захвата флюороДОФА в подкорковых ганглиях в зависимости от увеличения числа мутантных аллелей гена паркина, а также выявлено отчетливое снижение этого параметра при бессимптомном носительстве единственной делеции в этом гене (Hilker et al., 2001).

Ген PINK1. Локус *PARK6* и ген, кодирующий *PINK1* (киназу 1, индуцируемую гомологами фосфатаз и тензином), был картирован в трех семьях с БП европейского происхождения в 2004 г. Ген *PINK1* локализован на хромосоме 1p35-р36 (Valente et al., 2001) и на данный момент в нем выявлено более 50 миссенс-замен, а также различные точковые мутации, приводящие к сдвигу рамки считывания и усеченным вариантам белка (Tan, Skipper, 2007). Установлено, что гомозиготность и компаундная гетерозиготность по этим мутациям приводят к развитию различных форм БП с широким фенотипическим спектром – от заболеваний с ранним началом развития и атипичным течением до БП с поздним началом развития с симптоматикой, характерной для спорадических случаев. Важно отметить, что паркинсонизм может развиваться и у гетерозигот по мутациям в гене *PINK1*. В этом случае наблюдается более позднее возникновение заболевания (Hatano et al., 2004). *PINK1* мутации относительно равномерно распределены по всему гену, и их частота варьирует от 1 до 9% в различных этнических популяциях (Tan, Skipper, 2007).

Белок *PINK1* состоит из 581 аминокислотного остатка, содержит N-концевой мотив связывания с митохондриями и высококонсервативный серин/треонин-киназный домен Ca^{2+} кальмодулинового типа. Белок широко распространен в различных типах тканей и клеток и детальный анализ его экспрессии позволяет предположить, что он локализован преимущественно в митохондриях. Одним из свойств *PINK1* является плохая растворимость и связанная с этим склонность к агрегации, которая, по-видимому, объясняет наличие этого белка в 10% теляц Леви при спорадической форме БП (Gandhi et al., 2006).

В настоящее время считается, что *PINK1* может функционировать как митохондриальная киназа и защищать нейроны от оксидантного стресса (Valente et al., 2004). Кроме того, установлено, что *PINK1* играет важную роль в процессах митофагии. При этом белок накапливается в поврежденных митохондриях. Накопление белка *PINK1* способствует перемещению паркина из цитоплазмы в поврежденную митохондрию. Паркин, будучи E3 убиквитин-лигазой, убиквитинирует митохондриальные белки, тем самым метя поврежденную митохондрию. Меченая митохондрия изолируется мембраной с образованием аутофагосомы, которая в дальнейшем сливается с лизосомой, где подвергается деградации (Youle, Narendra, 2011). Таким образом, можно предположить, что дефекты в генах *PINK* и *PARK2* могут привести к нарушению нормальных процессов митофагии.

Ген белка DJ-1. В 2001 г. при анализе семьи с аутосомно-рецессивной БП с ранним началом развития из Дании был идентифицирован седьмой локус БП *PARK7*,

картированный на хромосоме 1p36 (Van Duijn et al., 2001). Два годами позже в этой же семье и в семье из Италии были обнаружены протяженная делеция размером 14 т.п.н. и миссенс-замена L166P в расположенном в области локуса *PARK7* гене, кодирующем белок DJ-1. В гомозиготном состоянии они приводят к развитию медленно прогрессирующей ювенильной БП, которая сопровождается полным отсутствием синтеза белка DJ-1 в результате блокировки синтеза белка или его очень быстрой посттрансляционной деградацией. В настоящее время в гене *DJ-1* обнаружены как гомозиготные и гетерозиготные точковые мутации, так и экзонные делеции и трипликации. Все описанные мутации приводят к развитию редких форм аутосомно-рецессивной БП с ранним началом развития заболевания. В целом мутации в гене *DJ-1* встречаются не более чем у 1–2% больных с ранней формой БП (Bonifati et al., 2003).

DJ-1 – высококонсервативный белок, который состоит из 189 аминокислотных остатков и принадлежит DJ-1/Thi/PfpI белковому суперсемейству. Белок широко распространен в различных тканях млекопитающих, в том числе и в мозге. Установлено, что DJ-1 преимущественно локализован в цитоплазме, однако небольшие его количества связаны с митохондриями (Zhang et al., 2005).

Впервые ген *DJ-1* был описан еще до открытия его роли в развитии БП как протоонкоген, принимающий участие в процессах созревания спермы и оплодотворении. Позднее было показано, что он обладает антиоксидантными свойствами и способен защищать клетки от оксидантного стресса, удаляя перекисные соединения путем самоокисления. Кроме того, имеются данные о том, что DJ-1 может быть вовлечен в регуляцию процессов апоптоза, а также вести себя как окислительно-восстановительный шаперон, ингибирующий агрегацию α -синуклеина. Имеются сведения о том, что DJ-1 способен связываться с паркином во время оксидантного стресса, что предполагает у этих двух белков наличие общей роли в механизмах нейропротекции (Mandemakers et al., 2007).

Ген дардарина. Локус *PARK8* был картирован на хромосоме 12p11.2 в семье с аутосомно-доминантной БП из Японии в 2002 г. (Funayama et al., 2002). В 2004 г. двумя независимыми исследовательскими группами был идентифицирован ген *LRRK2* (киназы 2 с лейцин-богатыми повторами) или дардарина в семьях с аутосомно-доминантной БП с поздним началом развития (Paisan-Ruiz et al., 2004; Zimprich et al., 2004). В настоящее время в гене *LRRK2* выявлено большое число миссенс-мутаций и несколько точковых замен, приводящих к нарушению сплайсинга. Все мутации достаточно равномерно распределены по гену, и показано, что они могут вносить существенный вклад в этиологию как семейных, так и спорадических форм БП. В различных популяциях мира суммарная частота мутаций в гене *LRRK2* может составлять 1,7–13% при семейных и 0,4–2,7% при спорадических случаях БП (Berg et al., 2005).

Анализ частоты встречаемости различных мутаций в гене *LRRK2* показал, что самой часто встречающейся мутацией является мутация G2019S, которая локализуется на 41 экзоне гена *LRRK2*. Кроме того, установлено, что данная мутация является также самой частой из всех точковых мутаций, описанных при БП. Мутация G2019S найдена у больных из различных популяций, причем как с семейной, так

и со спорадической формами заболевания. Ее частота в популяциях европейского происхождения достигает 4,6% у больных спорадической формой БП и 11,5% у больных семейным паркинсонизмом, у евреев ашкеназов ее частота достигает 13,3% у спорадических больных и 29,7% у больных с семейной формой БП, а у арабов Северной Африки – 40,8% у спорадических больных, 37,0% у больных с семейной формой БП (Lesage et al., 2006; Ozelius et al., 2006). В то же время, эта мутация крайне редко встречается у монголоидов (Tan et al., 2005). В российской популяции эта мутация обнаружена как у больных из семей с аутосомно-доминантной формой БП (с частотой 13%), так и у больных спорадической формой БП (частота – 0,5%) (Иллариошкин et al., 2007). Анализ сцепленных с мутацией G2019S гаплотипов говорит о том, что, скорее всего, данная мутация возникла в эволюции человека более одного раза – так, у больных из России – носителей данной мутации, обнаружено два сцепленных с ней гаплотипа (Шадрина и др., 2007). Более детально спектр мутаций в гене *LRRK2* будет рассмотрен в следующем разделе.

Интересно также отметить, что одной из причин БП может быть сочетание мутаций в разных генах заболевания. Так, нами у одного из больных с мутацией G2019S выявлена также гетерозиготная делеция по одному из экзонов гена паркина. Такая двойная гетерозиготность может влиять как на вероятность развития заболевания, так и определять особенности его клинического течения (Багыева и др., 2007; Иллариошкин и др., 2007).

Спектр клинических проявлений данной мутации сильно варьирует и она не является полностью пенетрантной, о чем говорит ее обнаружение у человека в возрасте старше 80 лет без каких-либо признаков паркинсонизма (Kau et al., 2005).

Ген *LRRK2* состоит из 51 экзона и кодирует белок размером 275 кД, содержащий 2527 аминокислотных остатков. Он относится к подсемейству ROCO суперсемейства Ras ГТФаз и характеризуется наличием нескольких функциональных доменов: двух Roc доменов, COR домена, WD40 домена, области лейцин-богатых повторов, тирозин-киназного каталитического домена (Zimprich et al., 2004). Он активно экспрессируется в печени, легких, почках, сердце и различных отделах головного мозга, в том числе и в дофаминергических нейронах черной субстанции. Преимущественно дардадин локализуется в цитоплазме, главным образом в аппарате Гольджи, синаптических везикулах цитоплазматической мембраны и может быть связан с внешней митохондриальной мембраной (Biskup et al., 2006; Hatano et al., 2007). В настоящее время мало что известно об основных биологических характеристиках дардарина, хотя установлено, что белок обладает киназной активностью, которая была доказана в экспериментах на клеточных культурах (West et al., 2005). Кроме того, предполагается, что дардадин может проявлять и ГТФазную активность, которая характерна для белков семейства ROCO. Имеются также данные о том, что *LRRK2* может принимать участие в контроле за обменом синаптических везикул, росте и ветвлении аксонов и функционировании аппарата Гольджи, лизосом и митохондрий (MacLeod et al., 2006; Zhu et al., 2006).

Ген АТР13А2. Недавно было установлено, что помимо процесса убиквитин-зависимой протеасомной деградации белков важную роль в процессах утилизации белков, особенно с длинным периодом полураспада (более 10 часов), играют

процессы лизосомальной аутофагии (Pan et al., 2008). Функционирование лизосом осуществляется на разных уровнях, включая экспрессию генов, транспорт и функционирование лизосомальных белков (Schneider, Zhang, 2010). Нарушение этих процессов может привести к процессам нейродегенерации. В настоящее время установлено, что дефекты, по крайней мере в двух генах, кодирующих лизосомальные белки, связаны с развитием БП.

Одним из них является нейрональная лизосомальная мембранная АТФаза Р-типа, кодируемая геном *ATP13A2* (локус PARK9). Мутации в гене *ATP13A2* были обнаружены в двух независимых семьях с синдромом Kufor-Rakeb (Ramirez et al., 2006). Этот синдром является атипичной формой рецессивно наследуемого леводопачувствительного паркинсонизма с очень ранним началом развития (от 11 до 16 лет) заболевания.

У больных наблюдается быстрое прогрессирование заболевания, нарушение пирамидального тракта, деменция, а также атрофия бледного шара (*globus pallidus*) (Spatola, Wider, 2014). Совсем недавно были выявлены новые мутации в гене *ATP13A2* у больных с более типичным паркинсонизмом и ранним началом развития из Бразилии и Италии (Trinh, Farrer, 2013).

Ген *ATP13A2* состоит из 29 экзонов и кодирует лизосомальную АТФазу размером 1180 аминокислотных остатков и входящую в состав P_5 суперсемейства АТФаз. Точная физиологическая роль белка остается неизвестной. Однако известно, что другие белки этого суперсемейства являются транспортерами различных субстратов, и в первую очередь неорганических катионов. Ген *ATP13A2* преимущественно экспрессируется в тканях мозга, особенно в дофаминергических нейронах черной субстанции. На сегодняшний день накоплено много данных о том, что у больных с мутациями в гене *ATP13A2* наблюдается нарушение функционирования лизосом, связанное с нестабильностью мембраны, нарушением кислотности органеллы и нарушением деградациии специфичных для лизосом белков, что в свою очередь приводит к накоплению α -синуклеина и смерти нейронов (Dehay et al., 2013; Ramirez et al., 2006).

Новые гены семейной болезни Паркинсона. Необходимо отметить, что на сегодняшний день далеко не во всех семьях с БП установлены генетические причины развития заболевания, несмотря на скрининг мутаций во всех генах семейной формы БП. В связи с этим актуальным остается поиск новых генов семейной формы БП. За последние несколько лет с использованием современных высокопроизводительных NGS-технологий, таких как полногеномное и полноэкзомное секвенирование, было выявлено четыре новых гена: *VPS35*, *EIF4G1*, связанные с развитием семенной аутосомно-доминантной формы БП, и *DNAJC6*, *SYNJ1*, сцепленные с развитием аутосомно-рецессивной формой БП (Bonifati, 2014). Однако только для одного из этих генов – гена *VPS35*, на данный момент имеются многочисленные исследования (более пятнадцати), показывающие, что мутации в нем хоть и встречаются редко, но приводят к развитию БП в различных этнических группах (Spatola, Wider, 2014).

Ген *VSP35* стал первым геном, который был идентифицирован с помощью полноэкзомного секвенирования. В 2011 г. двумя независимыми исследовательскими

группами была обнаружена мутация D620N (1858G>A) в гене *VPS35*, и была установлена ее строгая косегрегация с заболеванием в двух больших семьях с аутосомно-доминантной формой БП из Австрии и Швейцарии (Gagliardi et al., 2014; Trinh, Farrer, 2013). В дальнейшем было показано, что данная мутация является очень редкой причиной развития БП и встречается у 0,1–1% больных с семейной аутосомно-доминантной формой БП. Кроме того, на данный момент в гене *VPS35* выявлено еще несколько вариантов P316S, R524W, I560T, H599R, M607V, которые могут быть сцеплены БП, но патогенетическую значимость которых еще предстоит доказать (Deng et al., 2013).

Ген *VPS35* расположен на хромосоме 16q11.2, содержит 17 экзонов и относится к группе генов, кодирующих вакуолярные белки сортировки (Edgar, Polak, 2000). Белок *VPS35* является субъединицей ретромерного комплекса, играющего важную роль в ретроградном транспорте различных трансмембранных белков из эндосом к аппарату Гольджи или к мембранам (Bonifacino, Hurley, 2008). Имеющиеся на сегодня данные позволяют предполагать, что мутации в гене *VPS35* могут блокировать активность ретромерного комплекса, который необходим для обеспечения рециркуляции белков Wnt сигнального пути (Port et al., 2008). Нарушение Wnt сигнального пути в свою очередь может приводить к гибели дофаминергических нейронов среднего мозга и развитию БП (L'Episcopo et al., 2011). Кроме того, предполагается, что нарушение нормального функционирования ретромерного комплекса может приводить к нарушению нормальной рециркуляции транспортера двухвалентного железа DMT1 и накоплению железа в нейронах, что также может приводить к развитию нейродегенеративных процессов (Donovan et al., 2006; Dusek et al., 2012).

Ген GBA: между семейной и sporadicческой формами болезни Паркинсона. Традиционно считалось, что мутации в гене β-глюкоцереброзидазы (*GBA*) приводят к развитию болезни Гоше – аутосомно-рецессивного заболевания, относящегося к группе лизосомальных болезней накопления. Однако начиная с середины 1990-х годов, когда были впервые описаны характерные признаки паркинсонизма у пациентов с классической болезнью Гоше (Neudorfer et al., 1996), начинается активное изучение роли гена *GBA* в патогенезе БП. Среди sporadicческих больных БП выявлено большое число гетерозиготных носителей патогенетически значимых вариантов гена *GBA*. Высокая частота таких мутаций у больных БП говорит о том, что наличие мутаций в этом гене может значительно повышать риск развития заболевания. На данный момент имеются данные о более чем 100 различных вариантах гена *GBA*, ассоциированных с риском развития БП. Причем среди них есть как «мягкие» варианты N370S и R496H, приводящие к незначительному снижению активности фермента и повышающие риск развития БП только в два раза, так и «тяжелые» варианты 84GG, IVS2+1, V394L, D409H, L444P, которые приводят к резкому снижению количества β-глюкоцереброзидазы (Gan-Or et al., 2008). «Тяжелые» варианты повышают риск развития заболевания более чем в 13 раз и фактически являются патогенетически значимыми мутациями с низкой пенетрантностью (Gan-Or et al., 2008). Анализ больных БП из России выявил две гетерозиготные мутации N370S и L444P в гене *GBA* с общей частотой встречаемости 2,7% и повышающие риск развития заболевания более чем в шесть раз (Emelyanov et al., 2012).

Ген *GBA* кодирует β -глюкоцереброзидазу (GBA) – лизосомальный фермент, катализирующий расщепление глюкозилцерамида до церамида и глюкозы. В исследованиях *in vivo* и *in vitro* было показано, что снижение активности данного фермента приводит к нарушению функционирования лизосом, это приводит к накоплению абнормального α -синуклеина и образованию токсичных олигомеров. В свою очередь α -синуклеиновые олигомеры препятствуют нормальному трафику GBA от эндоплазматического ретикулума к лизосоме, что приводит к усилению лизосомной дисфункции. Таким образом, наблюдается обратная положительная связь между лизосомной дисфункцией и накоплением абнормального α -синуклеина. Имеющиеся данные позволяют предполагать, что снижение активности GBA может играть важную роль в развитии процессов нейродегенерации (Swan, Saunders-Pullman, 2013).

3. Генетические факторы в патогенезе спорадической болезни Паркинсона

Изучение моногенных форм БП позволил выделить основные возможные патогенетические механизмы, которые могут быть также связаны с развитием спорадической формы БП. В первую очередь к ним относятся нарушение убиквитин-зависимой протеасомной деградации белков и дифференцировки дофаминергических нейронов, митохондриальная дисфункция и окислительный стресс, нарушение нормального функционирования синапса.

В большинстве случаев у больных развитие БП носит спорадический характер и определяется сложным взаимодействием между генетической конституцией организма и факторами внешней среды. В связи с этим возникает вопрос о том, какой вклад вносят в патогенез спорадической формы БП гены семейных форм заболевания и других генетических факторов.

Анализ генов моногенных форм БП, белки которых принимают участие в протеасомной деградации белков, показал, что все они могут быть вовлечены в патогенез спорадической формы БП. Так, в гене α -синуклеина выявлено несколько ассоциированных со спорадической формой БП интронных ОНП и динуклеотидный полиморфизм в промоторной области. Предполагают, что эти полиморфизмы могут влиять на транскрипционную активность гена и стабильность мРНК (Brighina et al., 2008). Для другого гена, гена паркина, установлено, что гомозиготность, или компаундная гетерозиготность по мутациям в этом гене приводит к развитию заболевания у 5–10% больных со спорадической БП с ранним (до 50 лет) началом развития заболевания. Как уже говорилось выше, даже в гетерозиготном состоянии мутация в гене *PARK2* может приводить к развитию заболевания или повышать чувствительность организма к действию факторов внешней среды (West et al., 2002). На последней стадии процессов деградации белков важную роль играют убиквитин-гидролазы, которые высвобождают свободный убиквитин из комплекса с белком. Одним из таких ферментов является убиквитин-карбоксигидролаза UCHL1, мутации в гене которого ведут к развитию семейной формы БП. Возможно, что полиморфизм этого гена может влиять на риск развития спорадической формы БП.

Так, в настоящее время выявлена ассоциация между риском развития БП и частым полиморфизмом S18Y, расположенным в кодирующей области гена *UCHL1*, и установлено, что вариант 18Y снижает риск развития заболевания (Maraganore et al., 1999). В патогенезе БП могут также играть роль белки-мишени паркина, к которым относится синфиллин-1. Как и α -синуклеин, он входит в состав телец Леви. В гене синфиллина-1 выявлена мутация R621C у спорадических больных БП с поздним началом развития. Однако нельзя исключить, что данная мутация является редким нормальным полиморфизмом и не связана с развитием БП (Marx et al., 2003). Кроме перечисленных выше белков, в процессах убиквитин-зависимого протеолиза могут принимать участие и другие ферменты, которые также могут быть вовлечены в патогенез БП. Так, кроме убиквитина в протеасомной деградации принимают участие убиквитин-подобные белки NEDD8 и SUMO-1. Первый из них выявляется в тельцах Леви, тогда как белок SUMO-1 играет заметную роль в модификации белка DJ-1 (Dil Kuazi et al., 2003). Эти данные позволяют рассматривать гены этих белков как возможные кандидатные гены БП.

Роль нарушения процессов дифференцировки дофаминергических нейронов в патогенезе БП подтверждается выявлением мутаций в гене транскрипционного фактора *Nurr1* при одной из семейных форм БП. Ген *Nurr1* кодирует транскрипционный фактор, необходимый для дифференцировки постмитотических дофаминергических нейронов и контролирующей экспрессию генов, белковые продукты которых связаны с синтезом и хранением дофамина, а именно – тирозингидроксилазы (TH), транспортера дофамина (DAT), везикулярного транспортера моноаминов (VMAT2), декарбоксилазы ароматических аминокислот (AADC) (Chinta, Andersen, 2005). Свой вклад в патогенез спорадической формы БП могут также вносить и другие транскрипционные факторы, необходимые для дифференцировки дофаминергических нейронов, такие как транскрипционные факторы *Pitx3* и *Lmx1b*. В настоящее время в гене одного из них – фактора *Pitx3*, который специфичен для дофаминергических нейронов вентральной и вентромедиальной части черной субстанции, выявлены два полиморфизма, расположенные в первом интроне и в непосредственной близости от 5'-конца гена *Pitx3*, ассоциированные со спорадической формой БП (Bergman et al., 2008). Кроме того, в дифференцировке и поддержании нормального функционирования дофаминергических нейронов особую роль играют нейротрофический фактор мозгового происхождения (BDNF), нейротрофический фактор глиального происхождения (GDNF) и трансформирующий фактор роста α – TGF- α . Известно, что BDNF и GDNF влияют на обмен дофамина в черной субстанции. Однако только для одного из этих белков – BDNF, который регулирует экспрессию D3 рецептора дофамина на нейронах стриатума, был обнаружен полиморфизм *V66M* в гене *BDNF*, который ассоциирован со спорадической БП в японской популяции (Toda et al., 2003). Анализ же этого полиморфного варианта и других полиморфизмов в гене *BDNF* в европейских популяциях не выявил каких-либо ассоциаций с БП (Håkansson et al., 2003; Xiromerisiou et al., 2007).

Снижение синтеза АТФ митохондриями может приводить к развитию БП по двум механизмам – через снижение уровня АТФ-зависимой протеасомной дегра-

дации белков и через повышение уровня свободных радикалов в клетке в условиях дисфункции электрон-транспортной цепи митохондрий. В свою очередь, повышение уровня свободных радикалов приводит к снижению активности протеасомного комплекса (Ding, Keller, 2001; Hogglinger et al., 2003). Важная роль в патогенезе БП доказывается ранее описанными мутациями в гене белка DJ-1 при семейных формах заболевания. Белок DJ-1 играет роль протектора оксидантного стресса и тем самым защищает клетки от их повреждения свободными радикалами.

О возможной роли митохондриальной дисфункции в патогенезе БП говорит снижение активности комплекса I дыхательной цепи митохондрий в черной субстанции и стриатуме больных (Hattori et al., 1991), а также выявление нескольких семей с БП, наследуемой по материнской линии (Wooten et al., 1997). Об этом же также свидетельствует описанная в работе (Van der Walt et al., 2003) ассоциация между митохондриальными митотипами и риском развития спорадической БП. В ней показано, что у европейцев с митотипами J риск развития заболевания значительно ниже, чем у носителей самого частого в Европе митотипа H. Другим ассоциированным с развитием БП вариантом митохондриальной ДНК является полиморфизм 10398G, влияющий на активность NADH-дегидрогеназы 3. Еще одним подтверждением роли митохондриального генома в БП являются эксперименты по получению цитоплазматических гибридов из клеток нейробластомы и митохондрий из черной субстанции больных паркинсонизмом. В таких гибридах наблюдалось образование включений, напоминающих по своей морфологии и составу тельца Леви (Trimmer et al., 2004). Повышение уровня свободных радикалов может быть обусловлено нарушением обмена железа. В черной субстанции у больных БП содержание железа повышено, причем наблюдается сдвиг соотношения между ионами двухвалентного и трехвалентного железа в сторону более окисленной формы (Sofic et al., 1988). Свободные ионы железа приводят к образованию супероксид-аниона и перекисных соединений и индуцируют аутоокисление дофамина с образованием изохолина. Показано также, что повышение уровня железа стимулирует процесс образования агрегатов α -синуклеина (Hashimoto et al., 1999).

Поддержание гомеостаза железа связано с рядом функциональных систем, таких как система транспорта железа в плазме крови (трансферрин и лактоферрин), система транспорта и хранения железа в клетке (ферритин, рецептор трансферина, HFE-белок), система обмена (фратаксин и церулоплазмин) и обратного транспорта (церулоплазмин и гемоксигеназа I) железа в клетке. Гены, кодирующие белки перечисленных систем, могут рассматриваться как кандидатные гены БП. В последние годы была выявлена ассоциация некоторых из них с развитием заболевания (Borie et al., 2002; Buchanan et al., 2002; Kimpara et al., 1997).

Однако весь спектр возможных путей этиопатогенеза данной формы БП вышеперечисленными механизмами не исчерпывается. Наблюдаемая при БП симптоматика возникает в результате снижения синтеза дофамина в черной субстанции и в стриатуме и уменьшения его концентрации в стриатуме. Одной из причин этого может быть нарушение функционирования системы обмена дофамина – его синтеза, транспорта, синаптического выброса и рецепции.

При синтезе дофамина скорость процесса лимитируется реакцией превращения тирозина в ДОФА, катализируемой тирозингидроксилазой (ТН). В связи с этим ген ТН можно рассматривать как один из наиболее вероятных кандидатных генов БП. Однако до сих пор не обнаружено каких либо ассоциаций между полиморфными вариантами гена ТН и развитием заболевания. С другой стороны, большую роль в патогенезе БП играют белки, регулирующие активность (α -синуклеин) и транскрипцию гена (*Nurr1*) тирозингидроксилазы. В связи с этим можно предположить, что особое место в развитии БП может иметь нарушение синтеза кофактора тирозингидроксилазы – тетрагидробиоптерина (ВН4). В некоторых случаях мутации в гене ГТФ циклогидролазы (*GCH1*), первого фермента цикла биосинтеза ВН4, приводит к развитию паркинсон-подобного фенотипа, неклассической картине ДОФА-зависимой торзионной дистонии. Ген фермента *SRR*, катализирующий последний этап биосинтеза ВН4, картирован в области локуса *PARK3*, и не исключено, что именно мутации в этом гене ответственны за *PARK3*-форму БП (Karamohamed et al., 2003).

Уровень дофамина в клетке зависит также от скорости его деградации и под действием моноаминоксидазы В (МАО-В), и активности дофамин- β -гидролазы, использующей дофамин при синтезе норадреналина. Для всех генов этих ферментов выявлены ассоциации различных полиморфных вариантов с развитием БП (Healy et al., 2004; Mellick et al., 1999; Yoritaka et al., 1997).

Не исключена также роль в развитии БП системы обратного транспорта дофамина и рецепторов дофамина. Наиболее заметно при БП изменяется экспрессия рецепторов дофамина D3, уровень которого снижается на 40–45% в области *nucleus accumbens* и покрышке, и D4, уровень которого в покрышке возрастает на 15% (Ryoo et al., 1998). Однако в настоящее время нет убедительных данных о наличии ассоциации между генами рецепторов дофамина и БП.

Развитие БП может быть связано с токсическим действием различных ксенобiotиков. В связи с этим важную роль в патогенезе заболевания могут играть ферменты системы детоксикации. Проводится активное изучение как ферментов первой стадии этого процесса, при которой происходит активация ксенобiotиков, в первую очередь белков суперсемейства цитохрома P450 (*CYP2E1*, *CYP2D6*), так и ферментов второй стадии, заключающейся в детоксикации эндогенных и экзогенных токсинов, – глутатион-S-трансфераз (*GSTT1*, *GSTM1*, *GSTP1*) и N-ацетилтрансферазы (*NAT2*). Однако до настоящего времени не выяснено, могут ли ферменты первой стадии детоксикации играть какую-либо роль в развитии БП (Riedl et al., 1998). Более интересные данные получены при изучении ферментов второй стадии. Так, для аллельных вариантов гена *GSTP1* (I104V, A113V) установлено наличие ассоциации с развитием БП (Kelada et al., 2003), в то время как для «нулевых» аллельных вариантов генов *GSTT1*, *GSTM1* не выявлено какой-либо связи с развитием заболевания. Результаты метаанализа данных, полученных в различных этнических группах, для фенотипа медленных метаболизаторов фермента *NAT2*, к которому приводят различные мутации в гене *NAT2*, показали, что данный фенотип ассоциирован с развитием БП (Tan et al., 2000).

Кроме того, к настоящему времени проведено более трех десятков полногеномных исследований ассоциаций для БП (Allen, Satten, 2009; Fung et al., 2006; Gao et

al., 2009; Hamza et al., 2010; Latourelle et al., 2009; Lesnick et al., 2007; Maraganore et al., 2005; Pankratz et al., 2009; Saad et al., 2011; Simon-Sanchez et al., 2011; Spatola, Wider, 2014; Srinivasan et al., 2009; Tan et al., 2010; The UK Parkinson's Disease..., 2011). Необходимо отметить, что ассоциации, полученные в первых исследованиях (работы Д.Н. Марагано и др., Т.Г. Лесник и др., Х.С. Фанг и др.) не были воспроизведены в других более поздних работах (Allen, Satten, 2009; Evangelou et al., 2010; Sharma et al., 2009). Это связано с тем, что данные, полученные в первых работах, не являются достоверными? согласно позднее появившемуся критерию достоверности для полногеномных ассоциативных исследований. Так как при полногеномном анализе ассоциаций проводится одновременный анализ большого числа ОНП, обычный уровень достоверности ($p < 0,05$) приводит к появлению большого числа ложноположительных ассоциаций. Было вычислено новое значение достоверности, которое учитывает одновременный анализ 1 миллиона ОНП, путем введения поправки на многократное тестирование (аналог поправки Бонферрони). На данный момент считается, что отдельный ОНП может считаться ассоциированным с развитием заболевания при $p < 5 \cdot 10^{-8}$ (Dudbridge, Gusnanto, 2008).

Большое число работ по полногеномному анализу ассоциаций позволило провести также метаанализ данных, полученных в различных полногеномных исследованиях ассоциаций при БП (табл. 2).

Суммируя данные по проведенным на сегодняшний день полногеномным ассоциативным исследованиям, можно сделать вывод, что только для двух генов – *SNCA* и *MAPT* – были выявлены строгие ассоциации с БП практически во всех исследованиях. Для генов *BST1*, *LRRK2*, *GAK-DGKQ*, *HLA-DRA* и локуса *PARK16* были выявлены ассоциации лишь в ряде работ и не были подтверждены большинством исследователей (Trinh, Farrer, 2013).

Основной причиной таких различий в получаемых результатах при полногеномных ассоциативных исследованиях является необходимость использования очень больших по размеру выборок больных. В результате в исследованиях используются гетерогенные выборки – как клинически, так и этнически. Кроме того, ассоциации отдельных ОНП с БП могут быть специфичны для разных популяций (Sharma et al., 2009).

В России в настоящее время начаты работы по верификации данных, полученных при полногеномном анализе ассоциаций в европейских популяциях. Проведен анализ однонуклеотидного полиморфизма в гене *WNT3* (rs415430), расположенном рядом с геном *MAPT*, и отобранного по результатам полногеномных исследований ассоциаций (Simon-Sanchez et al., 2009). Однако ассоциация данного полиморфизма с риском развития БП в российской популяции не была выявлена (Филатова и др., 2011).

4. Транскриптомные исследования при болезни Паркинсона

В основе формирования любого признака лежит информация, заложенная в первичной структуре ДНК. Однако регуляция любых процессов происходит на

Гены, выявленные при полногеномных исследованиях при болезни Паркинсона

ИССЛЕДОВАНИЕ	ВЫЯВЛЕННЫЕ ОНП		OR	P
	Ген	rs		
Simón-Sánchez et al., 2009	<i>SNCA</i>	rs2736990	1,23	$2,24 \cdot 10^{-16}$
	<i>MAPT</i>	rs393152	0,77	$1,95 \cdot 10^{-16}$
	<i>PARK16</i>	rs823128	0,66	$7,29 \cdot 10^{-8}$
Satake et al., 2009	<i>SNCA</i>	rs11931074	1,37	$7,25 \cdot 10^{-17}$
	<i>PARK16</i>	rs947211	1,30	$1,52 \cdot 10^{-12}$
	<i>BST1</i>	rs11931532	1,24	$5,13 \cdot 10^{-9}$
		rs12645693	1,24	$8,65 \cdot 10^{-9}$
		rs4538475	1,24	$3,94 \cdot 10^{-9}$
	<i>LRKK2</i> :	rs4698412	1,24	$1,78 \cdot 10^{-8}$
		rs1994090	1,39	$2,72 \cdot 10^{-8}$
rs7304279		1,38	$5,06 \cdot 10^{-8}$	
rs2708453		1,38	$9,60 \cdot 10^{-8}$	
rs2046932		1,39	$4,34 \cdot 10^{-8}$	
Edwards et al., 2010	<i>SNCA</i>	rs2736990	1,29	$6,70 \cdot 10^{-8}$
	<i>MAPT</i>	rs11012	0,70	$5,60 \cdot 10^{-8}$
International Parkinson Disease Genomics Consortium, 2011	<i>SNCA</i>	rs356219	1,30	$7,90 \cdot 10^{-26}$
	<i>MAPT</i>	rs2942168	0,76	$3,91 \cdot 10^{-19}$
	<i>GAK</i>	chr4:911311	1,21	$1,80 \cdot 10^{-12}$
	<i>STK39</i>	rs2102808	1,28	$3,31 \cdot 10^{-11}$
	<i>ACMSD</i>	rs6710823	1,38	$1,35 \cdot 10^{-9}$
	<i>CCDC62/HIP1R</i>	rs12817488	1,16	$4,43 \cdot 10^{-9}$
	<i>LRKK2</i>	rs1491942	1,19	$3,23 \cdot 10^{-8}$
	<i>SYT11</i>	chr1:154105678	1,67	$1,02 \cdot 10^{-8}$
	<i>BST1</i>	rs11724635	0,87	$1,85 \cdot 10^{-8}$
	<i>MCCCI/LAMP3</i>	rs11711441	0,82	$2,10 \cdot 10^{-8}$
<i>HLA-DRB5</i>	chr6:32588205	0,70	$2,58 \cdot 10^{-8}$	

разных уровнях, в том числе и на уровне транскриптома. В связи с этим изучение транскриптома имеет важное значение для лучшего понимания патогенеза любого заболевания, включая БП. В последние годы началось активное изучение изменения экспрессии как отдельных генов, так и больших массивов генов, которые могут быть связаны с развитием данного заболевания.

4.1. Анализ экспрессии в тканях головного мозга

В настоящее время активно ведутся работы по изучению при БП как транскриптома в целом, так и экспрессии генов отдельных метаболических путей. На данный момент проведено более 15 работ (табл. 3) по анализу транскрипционных профилей головного мозга пациентов с БП (Diao et al., 2012). В первую очередь изучались клетки компактной области черной субстанции, поскольку именно в этой области мозга больных БП происходят основные нейродегенеративные процессы.

Как видно из данных, представленных в табл. 3, были выявлены изменения экспрессионных профилей для большого числа генов, относящихся к различным клеточным процессам, таким как: функционирование митохондрий и убиквитин-зависимой протеасомной системы деградации белков, развитие оксидантного стресса, обмен дофамина, передача нервного импульса, функционирование цитоскелета, процессы модификации белков и др. При этом хотелось бы отметить, что в большинстве случаев для выявленных генов наблюдается общая тенденция к снижению их экспрессии у больных БП. Это, скорее всего, связано с нарушением нормального функционирования дофаминергических нейронов. В то же время, наблюдаемая тенденция может являться отражением значительного уменьшения числа дофаминергических нейронов, особенно в случаях снижения экспрессии генов, связанных с обменом дофамина.

Необходимо также отметить, что полученные в разных работах результаты совпадают частично или вообще довольно сильно отличаются. Так, например, в работах (Grünblatt et al., 2004; Simunovic et al., 2009) были, с одной стороны, выявлены изменения в одинаковых клеточных процессах в целом (см. табл. 3). В то же время данные по изменению экспрессии конкретных генов сильно различаются. Е. Грунблатт с соавторами сообщили о значительных изменениях в экспрессии для 137 генов. Для 68 генов было обнаружено снижение их экспрессии, а для 69 генов увеличение. Авторы в своей работе особое внимание обратили на уменьшение экспрессии гена белка SKP1A, который входит в состав SCF(E3) лигазного комплекса. Однако данный результат не был воспроизведен в других работах. Ф. Симонович и др. обнаружили значительное изменение экспрессии для 378 генов, в том числе для 358 генов установлено уменьшение экспрессии, а для 20 генов – увеличение. При этом только для единичных генов были выявлены схожие результаты с работой (Grünblatt et al., 2004) (*HIP2*, *GABARAPL2*, *TUBB2* и др.). Обращает на себя внимание и тот факт, что в работе Ф. Симоновича и др. были обнаружены изменения в экспрессии большинства генов моногенных форм БП (*SNCA*, *UCHL1*, *PINK1*, *PARK7*, *ATP13A2*), тогда как Е. Грунблатт и др. вообще не выявили изменения в экспрессии в данных генах (Grünblatt et al., 2004; Simunovic et al., 2009).

Вероятно, наблюдаемые отличия в разных работах можно объяснить разными подходами к постановке экспериментов – разными выборками пациентов и групп сравнения, разными методами анализа транскриптома и статистической обработки.

Так, основным отличием между двумя вышерассмотренными работами является то, что Е. Грунблатт и др. изучали образцы ткани черной субстанции, т.е. анализировали большое количество клеток, тогда как Ф. Симонович и др. проводили анализ единичных дофаминергических нейронов, полученных с помощью лазерной микродиссекции из мозга больных БП (Grünblatt et al., 2004, Simunovic et al., 2009).

Кроме того, необходимо также учитывать пол больных. Так, Ф. Симонович и др. опубликовали два исследования по анализу транскриптома у больных БП. Обе работы осуществлялись с использованием одних и тех же выборок и методов, но дали лишь частично совпадающие результаты. Единственное отличие состояло в том, что в первой работе использовалась объединенная выборка больных (Simunovic et al., 2009), а во второй работе мужчины и женщины анализировались отдельно. При

**Изменения экспрессии генов различных метаболических путей при болезни Паркинсона
в тканях головного мозга (черная субстанция)**

Снижение экспрессии генов	Повышение экспрессии генов
<i>Функционирование митохондрий и окислительное фосфорилирование</i>	
Гены различных субъединиц цитохрома С Гены различных субъединиц NADH дегидрогеназы и гены белков, влияющих на её активность, АТФ-синтазозависимый транспорт протонов	<i>MTND2</i> (субъединица NADH дегидрогеназы)
<i>Оксидантный (окислительный стресс)</i>	
Гены различных субъединиц PIK3	Гены различных субъединиц PIK3 <i>PINK1</i> и <i>PARK7</i>
<i>Убиквитин-зависимый протеолиз, функционирование лизосом</i>	
<i>HIP2, ATP6V1E1, ATP13A2, RIMS3, SNCA UCHL1, SKP1A</i> , АТФ-синтазозависимый транспорт протонов	<i>RIMS1</i>
<i>Функционирование цитоскелета и процессы адгезии</i>	
<i>TUBB2</i> (тубулины), различные белки семейства кинезинов, гены белков цитоскелета и клеточной адгезии, <i>MAPT</i>	Гены белков цитоскелета и клеточной адгезии
<i>Процессы транскрипции, трансляции, процессы модификации белков (шапероны)</i>	
<i>ST13, NR4A2</i> , гены, вовлеченные в процессы транскрипции, трансляции и модификации белков	
<i>Процессы передачи нервного импульса</i>	
<i>GABARAPL2, RIMS3, ALDH1A1, SEC22L1, ARPP-21</i> , гены белков, связанных с синаптической передачей, гены ионных каналов	Рецепторы к нейромедиаторам, <i>PENK, PDXK</i> (синтез ДА), <i>SRGPA3</i> (передача сигнала), гены ионных каналов
<i>Процессы транспорта</i>	
Гены различных переносчиков растворимых веществ, <i>VMAT, TRAPPC4</i>	Гены различных переносчиков растворимых веществ

этом были обнаружены различные профили экспрессирующихся генов у мужчин и женщин (Simunovic et al., 2010).

Необходимо также учитывать, что анализ экспрессии в тканях головного мозга проводится в полученных при аутопсии тканях. Возможности в получении таких тканей у исследователей крайне ограничены и в результате возникают проблемы в формировании выборок больных и групп сравнения. Кроме того, анализируемые в таких работах больные находились на последних и самых тяжелых стадиях заболевания, а также прошли активное медикаментозное лечение. Многие больные страдают и другими тяжелыми заболеваниями, в первую очередь сердечно-сосудистыми. Поэтому полученные данные об изменении экспрессии генов, скорее всего, лишь частично отражают самые поздние стадии БП, причем зачастую отягощенные другими заболеваниями. В связи с этим в настоящее время не менее актуален анализ изменения экспрессии генов в более доступных тканях организма, например спинномозговой жидкости и крови. Это значительно упрощает работу по формированию как выборок больных, так и групп сравнения. Появляется также возможность проводить анализ на разных стадиях развития заболевания, в том числе и на самых ранних, до начала медикаментозного лечения.

4.2. Анализ изменения экспрессии генов в периферической крови

Исследование экспрессии генов в крови открывает широкие перспективы в поиске генов, изменяющих экспрессию на разных стадиях заболевания, что позволит лучше понять механизмы патогенеза БП. Клетки крови, в частности лимфоциты, имеют некоторые характеристики, типичные для дофаминергического нейрона: в них содержатся оба фермента синтеза дофамина, мембранный переносчик дофамина и экспрессируется ряд рецепторов дофамина (Barbanti et al., 1999; Buttarelli et al., 2009; Nagai et al., 1996). Это позволяет предположить, что изменения, обнаруженные в периферической крови больных БП, могут отражать те процессы, которые протекают в дофаминергических нейронах черной субстанции.

В настоящее время исследований, посвященных как анализу уровней экспрессии отдельных генов, так и глобальному анализу экспрессионных профилей в крови при БП, крайне мало. Так, опубликована только одна работа по полногеномному анализу транскриптома в крови пациентов с БП. С.Р. Шерзер и др. недавно показали, что из более чем 20 000 проанализированных генов только у 22 генов значительно снижается экспрессия при БП (Scherzer et al., 2007). Для двух из них, *HIP2* и *ST13*, другими авторами также было показано уменьшение количества транскриптов в черной субстанции головного мозга при БП (см. табл. 3). Однако С.Р. Шерзер и др. отмечают, что экспрессия гена супрессора опухолей 13 (*ST13*) в крови при БП снижается сильнее. Кодированный геном *ST13* белок – это адаптерный белок, который взаимодействует в составе убиквитин-протеасомного пути с белком теплового шока 70 и служит посредником при соединении белков теплового шока HSP70 и HSP90 (Shi et al., 2007). HSP70 регулирует сворачивание α -синуклеина и подавляет его токсичность в культуре клеток, дрожжей и у мух. *ST13* стабилизирует АДФ-

форму HSP70, которая имеет высокое сродство к субстрату. Посредством своей собственной шаперонной активности ST13 может способствовать взаимодействию HSP70 с другими субстратными белками, что также может играть определенную роль в патогенезе БП.

Работ по изучению изменений транскрипции отдельных генов также немного. Так, исследователями из Кореи было показано увеличение экспрессии гена α -синуклеина в периферической крови пациентов со спорадической формой БП (Kim et al., 2004). М. Реал и др. показали на культурах лимфоцитов из периферической крови пациентов с БП прямую корреляцию экспрессии генов цитокинов и хемокинов (MCP-1, RANTES, MIP-1- α , IL-8, IFN- γ , IL-1 β , TNF- α , а также NF- κ B(p65)) со стадией БП (Reale et al., 2009), что отражает дисрегуляцию цитокинов в крови при БП и, вероятно, свидетельствует об активации воспаления. У больных со спорадической формой БП в лейкоцитах были обнаружены изменения в экспрессии генов, вовлеченных в аутофагию (Wu et al., 2011). У носителей мутации G2019S в гене *LRRK2* в лейкоцитах были обнаружены изменения в уровнях транскриптов генов убиквитин-протеасомной системы, митохондриальной оксидантной системы, воспаления, роста аксона, кальциевого сигналинга и апоптоза (Mutez et al., 2011). Однако на данный момент систем для диагностики БП на основе оценки уровней транскриптов генов в крови разработать не удается (Grünblatt et al., 2010).

5. Роль микро-РНК в патогенезе болезни Паркинсона

Влияние микро-РНК на биологические процессы стало предметом многих исследований. В частности, участие микро-РНК в дифференцировке нейронов подтверждается функциональными изменениями экспрессии микро-РНК в процессе развития мозга (Krichevsky et al., 2003; Miska et al., 2004; Smirnova et al., 2005). Значение микро-РНК в физиологии нервной системы также основывается на данных, показывающих участие микро-РНК в дифференцировке нервных клеток в экспериментах *in vitro* и *in vivo* (Kim et al., 2007; Schratt et al., 2006; Vo et al., 2005). Кроме того, в ряде исследований показано, что микро-РНК могут быть вовлечены в патогенез различных заболеваний (Bushati, Cohen, 2008; Kloosterman, Plasterk, 2006; Santosh et al., 2009). Особый интерес представляет роль микро-РНК при НДЗ, и в частности при БП (Bushati, Cohen, 2008; Doxakis, 2010; Nelson et al., 2008). В этом обзоре будут рассмотрены все известные на настоящий момент данные об участии микро-РНК в функционировании ДА-нейронов и их возможном влиянии на развитие патологических процессов при БП.

5.1. Роль белков биогенеза микро-РНК в болезни Паркинсона

В нескольких исследованиях было показано, что нарушение биогенеза микро-РНК может существенно влиять на развитие и функционирование нервной системы, а также организма в целом (Junn, Mouradian, 2012; Kim et al., 2007).

Впервые роль микро-РНК и белков их биогенеза в патогенезе БП была показана в 2007 г. (Kim et al., 2007). Согласно этим данным, тканеспецифическое удаление гена *Dicer* *in vivo* в ДА-нейронах черной субстанции у мышей приводит к гибели этих клеток. Исследования поведения животных с нокаутом гена *Dicer* методом открытого поля выявили снижение их подвижности, сходное с фенотипом при БП. При этом было установлено, что делеция гена *Dicer* частично компенсируется трансфекцией малых РНК, полученных из среднего мозга эмбрионов здоровых мышей (Kim et al., 2007).

Также *in vitro* было выявлено, что при удалении гена *Dicer* из-за блокирования биогенеза микро-РНК дифференцировка ДА-нейронов из эмбриональных стволовых клеток мышей ухудшается. Тем не менее, скорость созревания ДА-нейронов из таких клеток может быть частично восстановлена трансфекцией фракции низкомолекулярных РНК, выделенных из немутантных эмбриональных клеток среднего мозга мыши (Kim et al., 2007).

Интересно, что нейродегенерация наблюдается также у мышей с делецией гена *Dicer* в мозжечке. Отсутствие белка *Dicer* приводит к гибели нейронов Пуркинье, что ведет к развитию атаксии. Модель дегенерации нейронов Пуркинье при отсутствии микро-РНК демонстрирует очевидные сходства с процессами, происходящими при медленно прогрессирующих НДЗ, таких как болезни Альцгеймера и Паркинсона (Schaefer et al., 2007).

В другой работе ген *Dicer* удаляли из нейронов стриатума мышей, несущих рецепторы к дофамину (Cuellar et al., 2008). Авторы обнаружили у таких животных ряд физиологических проявлений, включающих уменьшение размера мозга и нейронов, атаксию, атрофию, преждевременную смерть (Cuellar et al., 2008), однако уменьшение количества ДА-нейронов выявлено не было (Choi et al., 2008; Evans, Lees, 2004).

Кроме того, был проведен целый ряд исследований роли других ферментов биогенеза микро-РНК в развитии и функционировании нервной системы, но конкретных данных об их участии в патогенезе БП пока нет (Ugrumov et al., 2011).

5.2. Роль микро-РНК в регуляции генов семейных форм болезни Паркинсона

На настоящий момент выявлен целый ряд микро-РНК, которые могут принимать прямое или опосредованное участие в развитии БП. В нескольких работах было показано, что экспрессия генов *SNCA*, *PARK2*, *PINK1*, *PARK7*, а также *LRKK2* может регулироваться различными микро-РНК и влиять на развитие патологии (Doxakis, 2010; Junn et al., 2009; Ugrumov et al., 2011; Wang et al., 2008).

В одном из недавних исследований был выявлен ранее не известный механизм, с помощью которого в нервной системе происходит регулирование уровня транскрипта *SNCA*, чья повышенная экспрессия является характерным признаком БП (Doxakis, 2010). В частности, показано, что miR-7 и miR-153, экспрессирующиеся в больших количествах в мозге, связываются, главным образом, с 3'-нетранслируемой областью (3'-НТО) мРНК *SNCA* и значительно снижают уровень синте-

за белка SNCA, а miR-7, кроме того, ингибирует SNCA-зависимую гибель клеток (Junn et al., 2009). Анализ количеств транскриптов генов и белка SNCA выявил коэкспрессию miR-7, miR-153 и SNCA в ходе развития нервной системы и в зрелой нервной ткани. Таким образом, было показано, что, во-первых, miR-7 и miR-153 являются синергистами по своему действию; во-вторых, требуется именно 3'-НТО мРНК SNCA для регулирования экспрессии этого гена; в-третьих, микро-РНК не взаимодействуют с кодирующей областью SNCA для регуляции экспрессии SNCA; в-четвертых, микро-РНК действуют на претрансляционном уровне (Doxakis, 2010). Поскольку ни одна из этих микро-РНК полностью не комплементарна мРНК SNCA, то регуляция уровня этой мРНК, вероятно, обеспечивается увеличением уровня деаденилирования и декэпирования мРНК, индуцируемого miR-7 и miR-153 (Behm-Ansmant et al., 2006; Eulalio et al., 2009). Высокие уровни экспрессии miR-7, miR-153, мРНК SNCA и белка SNCA выявлены в нервных тканях, в частности в среднем мозге, гиппокампе и коре. Более того, уровни miR-7, miR-153 и мРНК SNCA значительно выше в нейронах, чем в астроцитах. В остальных тканях, таких как легкие и сердце, количество транскриптов этих РНК было намного меньше. Интересно, что miR-7, miR-153 и мРНК SNCA активно синтезируются в среднем мозге. Показано, что miR-7 присутствует в черной субстанции, и это, возможно, указывает на ее участие в поддержании нормального функционирования ДА-нейронов. Кроме того, уровни как экспрессии мРНК, так и количества белка SNCA показывают, что в процессе развития организма белок транслируется при постоянном уровне мРНК SNCA, регулируемом микро-РНК. Эти результаты свидетельствуют о том, что miR-7 и miR-153 коэкспрессируются с SNCA в нейронах для регулирования уровня транскрипции гена SNCA по типу прямой связи (Doxakis, 2010). Следует также отметить, что miR-7 снижает чувствительность клеток нейробластом к окислительному стрессу, индуцированному мутантной формой SNCA, что подтверждает протективный эффект этой микро-РНК против клеточного стресса в нервных клетках (Junn et al., 2009; Lau, de Strooper, 2010). Таким образом, перечисленные выше данные указывают на то, что miR-7 и miR-153 играют важную роль в регуляции уровня белка SNCA в нервной системе.

Кроме того, было также показано, что на изменение экспрессии SNCA могут влиять другие микро-РНК. Так, была обнаружена корреляция увеличенной экспрессии SNCA с повышенной трансляцией FGF20 в культурах клеток и тканях мозга пациентов с БП. FGF20 экспрессируется преимущественно в черной субстанции и стимулирует созревание ДА-нейронов (Wang et al., 2008). В 2001 г. при проведении ассоциативного анализа была обнаружена связь риска развития БП с наличием однонуклеотидных полиморфизмов (ОНП) на участке хромосомы 8, содержащей ген фактора роста фибробластов 20 (*FGF20*) (Scott et al., 2001). Позднее в этом гене была выявлена ассоциация ОНП rs12720208 с риском развития БП. Этот ОНП находится в 3'-НТО *FGF20*, и *in vitro* было показано, что на данном участке гена расположена область узнавания miR-433, которая активно экспрессируется в мозге (Wang et al., 2008). Кроме того, было показано наличие полиморфизмов в области узнавания miR-433 в 3'-НТО SNCA, однако никакого регуляторного влияния этих

полиморфизмов и самой микро-РНК на экспрессию α -синуклеина показано не было (Schmitt et al., 2012).

В одной из первых работ, посвященной поиску вовлеченных в развитие БП микро-РНК в крови человека, было выявлено 6 микро-РНК, уровни которых отличались от контроля. При этом было показано, что уровни miR-1, miR-22* и miR-29a у пациентов, не подвергавшихся лечению, ниже, чем в здоровом контроле. В то же время, уровни miR-16-2*, miR-26a-2* и miR-30a оказались выше у пациентов, подвергавшихся лечению, чем у пациентов, не подвергавшихся лечению. При этом необходимо отметить, что все эти микро-РНК могут быть косвенно связаны с функционированием SNCA. Так, известно, что miR-1 и miR-30a вовлечены в регуляцию транспорта дофамина. Мишенями miR-1 являются гены, кодирующие белок, запускающий полимеризацию тубулина (*TPPP/p25*), обнаруженный во включениях в мозге пациентов с БП, и белок тяжелой цепи клатрина (*CLTC*) (Beckstead et al., 2005). Повышенная экспрессия *TPPP/p25* может служить маркером патологических процессов, связанных с агрегацией SNCA (Bellen et al., 2004). Клатрин, в свою очередь, может быть вовлечен в микроглиальный эндоцитоз агрегированного SNCA, а также связан с активацией микроглии (Pesah et al., 2004). Мишенью miR-30a является ген транспортера дофамина *DAT (SLC6A3)*, который кодирует белок, осуществляющий в комплексе с другими белками обратный захват свободного дофамина в синапсе. SNCA модулирует работу белка *DAT*, регулируя синаптическую концентрацию дофамина (Sidhu et al., 2004). Таким образом, miR-1 и miR-30a могут быть вовлечены в патогенез БП. Кроме того, miR-30a может связываться с *FGF20*, который имеет сайт связывания также с miR-16-2* (Beckstead et al., 2005). Мишенью miR-22* может быть ген опухолевого супрессора – p53-связывающий белок 2 (*TP53BP2*) и ген предшественника глутаматного рецептора 1 (*GRIA1*), являющийся также мишенью miR-26a-2* и miR-30a (Ng et al., 2009). Мишенью miR-29a является ген белка септина (*SEPT4*). Было показано, что в постмортальных тканях черной субстанции пациентов с БП концентрация септина 4 повышена. Также было отмечено параллельное повышение уровня септина 4 и SNCA у пациентов с БП (Flagler et al., 2009).

При анализе трансгенных линий дрозофил, несущих мутацию в гене *lrrk* (I1915T) или экспрессирующих ген *LRRK2* человека с мутацией G2019S, было показано, что дефектный *LRRK2* лишен ГТФазной активности. При этом *LRRK2* переставал регулировать трансляцию транскрипционных факторов E2F1 и DP (Ugrumov et al., 2011), которые вовлечены в контроль клеточного цикла и выживаемость клеток (Butson et al., 2009). Также было выявлено, что микро-РНК семейства *let-7* и miR-184* подавляют активность данных факторов. В то же время, делеция гена *let-7*, блокирование *let-7* и miR-184*, а также блокирование сайтов связывания *let-7* и miR-184* в 3'-НТО их мРНК-мишеней приводили к увеличению синтеза E2F1 и DP и возникновению токсического эффекта, сходного с тем, что наблюдается у мух, трансгенных по гену *LRRK2*. Это в свою очередь приводит к снижению двигательной активности и уменьшению числа ДА-нейронов. С другой стороны, повышение уровней *let-7* и miR-184* ослабляет неблагоприятный эффект мутантного *LRRK2* (Ugrumov et al., 2011).

В одном из недавних исследований было показано, что низкие уровни miR-34b и miR-34c в ДА-нейронах, дифференцированных из SH-SY5Y клеток нейробластомы, сопровождались снижением концентрации белков паркина и DJ1, что приводило к нарушению функционирования митохондрий и снижению выживаемости клеток. Кроме того, было обнаружено значительное снижение уровней miR-34b/c в мозге пациентов с БП по сравнению со здоровым контролем. Примечательно, что в образцах мозга пациентов, больных БП, где были обнаружены пониженные уровни miR-34b/c, также была значительно снижена концентрация белков паркина и DJ1. Гены этих микро-РНК располагаются на 11-ой хромосоме и транскрибируются как один предшественник микро-РНК. В миндалевидном теле, черной субстанции и лобной коре пациентов с БП уровни miR-34b и miR-34c снижены на 40–65%, однако является ли это снижение следствием потери ДА-нейронов или специфических процессов в оставшихся ДА-нейронах, пока не выяснено (Minones-Moyano et al., 2011). Тем не менее, экспериментальных подтверждений того, что мишенями miR34b/c являются гены белков паркина и DJ1 пока нет.

5.3. Микро-РНК и другие гены-кандидаты в патогенезе болезни Паркинсона

Работа (Kim et al., 2007) стала первым исследованием, в котором был проанализирован профиль экспрессии 224 предшественников микро-РНК в мозге пациентов с БП. При этом был показан высокий уровень экспрессии микро-РНК miR-133b в среднем мозге при нормальных условиях, однако у пациентов с БП обнаружить miR-133b не удалось. Кроме того, обнаружено, что блокирование *in vivo* miR-133b в культуре ДА-нейронов, полученных из эмбриональных стволовых клеток или из среднего мозга, увеличивает экспрессию маркеров ДА-нейронов, повышая уровни транскриптов тирозингидроксилазы и переносчиков дофамина в ДА-нейронах. В то же время, было выявлено, что miR-133b действует как ингибитор последней стадии созревания ДА-нейронов: повышенный уровень экспрессии miR-133b приводит к уменьшению, а пониженный – к увеличению количества ДА-нейронов в клеточных культурах (Kim et al., 2007).

В настоящее время есть данные о том, что мишенью miR-133b является один из генов-кандидатов БП и маркер ДА-нейронов – PITX3. PITX3 является транскрипционным фактором и необходим для дифференцировки и выживаемости ДА-нейронов черной субстанции среднего мозга. Кроме того, в гене *PITX3* были выявлены два полиморфизма, ассоциированные со спорадической формой БП (Bergman et al., 2008). При моделировании БП у мышей было показано, что miR-133b и Pitx3 регулируют экспрессию друг друга по механизму отрицательной обратной связи (Kim et al., 2007): Pitx3 способствует транскрипции miR-133b, которая, в свою очередь, подавляет активность Pitx3 (Barbato et al., 2009). Тем не менее, важный вопрос о том, вносит ли потеря этой микро-РНК вклад в развитие БП, остается нерешенным. И хотя пока не создано мышей с нокаутом гена miR-133b (Nelson et al., 2008), скорее всего, БП является следствием потери Pitx3-зависимой экспрессии генов,

а не отсутствия miR-133b. Однако данные результаты нуждаются в дальнейшей проверке.

При анализе 115 микро-РНК у *C. elegans* с гиперэкспрессией гена *SNCA* человека, несущего мутацию A53T, было выявлено изменение уровней для 12 микро-РНК. У модельных организмов с мутацией в гене везикулярного транспортера катехоламинов (*cat-1*) изменились уровни 5 микро-РНК, а у организмов, мутантных по ортологу паркина *pdg-1* (функциональная делеция), наблюдалось изменение уровней 3 микро-РНК. Из всех изученных микро-РНК только уровни miR-64 и miR-65 оказались ниже у нематод с гиперэкспрессией *SNCA* и организмов, трансгенных по *cat-1*. Уровень микро-РНК *let-7* был ниже у организмов с повышенным синтезом *SNCA* или мутантных по *pdg-1*. Возможными мишенями miR-64 и miR-65 являются гены *mdl-1* и *ptc-1*, экспрессия которых увеличивается как у нематод, трансгенных по *SNCA*, так и у нематод с заблокированным синтезом miR-64 и miR-65. Ген *mdl-1* кодирует транскрипционный фактор (dHLH), сходный с транскрипционными регуляторами позвоночных MAD. Ген *ptc-1* кодирует ортолог белка человека РТСН, содержащий домен, чувствительный к стеролу. Возможно, данные микро-РНК также могут быть вовлечены в патогенез БП у человека (Asikainen et al., 2010).

Таким образом, за последние несколько лет были проведены десятки исследований, посвященных попыткам раскрыть роль тех или иных микро-РНК в патогенезе БП. Полученные данные позволяют предположить, что микро-РНК могут быть вовлечены в патогенез данного заболевания и принимать участие в нарушении процессов, связанных с регуляцией экспрессии генов, вовлеченных в его развитие. Кратко наиболее значимые результаты этих работ отражены в табл. 4.

6. Генетический анализ болезни Паркинсона как ключ к этиопатогенезу заболевания

Достигнутый за последние годы значительный прогресс в изучении генетических факторов, лежащих в основе как моногенных, так и спорадических форм БП, позволил значительно расширить наши представления об этиопатогенезе заболевания. На рис. 1 схематически представлена роль девяти ключевых генов (см. табл. 1) в патогенезе БП (Trinh, Farrer, 2013). Так α -синуклеин способствует экзоцитозу и может играть определенную роль в стабилизации образующихся эндосом в пресинаптических аксонах. LRRK2 регулирует фосфорилирование эндофилина А, который принимает участие в освобождении покрытых клатрином эндосомных везикул в постсинаптическом нейроне, а также в регуляции аутофагии, фосфорилировании МАРТ и стабилизации микротрубочек. VPS35 является неотъемлемой частью комплекса, обеспечивающего распознавание трансмембранных рецепторов и их обратный транспорт от эндосом к аппарату Гольджи или к мембране. VPS35 обеспечивает везикулярный транспорт между митохондрией и пероксисомой. GBA является лизосомальной гидролазой. Кроме того, GBA необходима для комплекса, обеспечивающего обратный транспорт. Паркин, PINK1 и DJ-1 вовлечены в митохондриальный биогенез и индукцию аутофагии. ATR13A2 принимает учас-

Микро-РНК в развитии болезни Паркинсона

Микро-РНК	Гены-мишени	Органы и ткани	Объект исследования	Функция
miR-133b	Pitx3	ДА-нейроны среднего мозга	ЭСК, <i>Mus musculus</i> , мыши с афакией, лишённые Pitx3, мыши, с индуцированным 6-гидроксидофамином паркинсонизмом, МЧ	регуляция созревания и функционирования ДА-нейронов среднего мозга
miR-433	<i>FGF20</i>	кровь пациентов с БП, ДА-нейроны среднего мозга	МЧ, клеточные линии фибробластов, SH-SY5Y, пациенты с БП, здоровые добровольцы	подавление экспрессии <i>FGF20</i>
miR-7	<i>SNCA</i>	черная субстанция, стриатум, средний мозг, гиппокамп	НЕК293Т, SH-SY5Y, NS20Y нейробластомы мыши, мозг мыши, МРТ-модель на SH-SY5Y, НЕК293, кортикальные нейроны мыши и крысы, мозговые ткани мыши	регуляция экспрессии <i>SNCA</i> в нервной системе, защита от окислительного стресса и разрушения протеасом, индуцируемого <i>SNCA</i> , miR-7
miR-153	<i>SNCA</i>	средний мозг, гиппокамп	НЕК293, кортикальные нейроны мыши и крысы, мозговые ткани мыши	регуляция экспрессии <i>SNCA</i> в нервной системе. miR-153 синергист miR-7, при этом miR-153 инициирует разрушение мРНК <i>SNCA</i>
miR-1	<i>TPPP/p25 CLTC</i>	лимфоциты крови	лимфоциты крови человека	экспериментально не подтверждена
miR-22*	<i>TP53BP2 GRIA1</i>	лимфоциты крови	лимфоциты крови человека	экспериментально не подтверждена
miR-29a	<i>SEPT4</i>	лимфоциты крови	лимфоциты крови человека	экспериментально не подтверждена
miR-16-2*	<i>FGF20</i>	лимфоциты крови	лимфоциты крови человека	экспериментально не подтверждена
miR-26a-2*	<i>GRIA1</i>	лимфоциты крови	лимфоциты крови человека	экспериментально не подтверждена
miR-30a	<i>SLC6A3 GRIA1</i>	лимфоциты крови	лимфоциты крови человека	экспериментально не подтверждена
miR-34b	не выявлены	ДА-нейроны	SH-SY5Y, МЧ	вероятно регулирует экспрессию <i>PARK2</i> и <i>PARK7</i>
miR-34c	не выявлены	ДА-нейроны	SH-SY5Y, МЧ	вероятно регулирует экспрессию <i>PARK2</i> и <i>PARK7</i>
miR-let-7	pdr-1 E2F1	нейроны	<i>C. elegans</i> , НЕК293Т, <i>D. Melanogaster</i>	влияние на экспрессию ортолога паркина pdr-1 влияние на патогенность мутантного LRRK2 через E2F1 и DP
miR-64	<i>mdl-1, ptc-1</i>	данных нет	<i>C. elegans</i>	экспериментально не подтверждено

miR-65	<i>mdl-1</i> , <i>ptc-1</i>	данных нет	<i>C. elegans</i>	экспериментально не подтверждено
miR-184*	DP	нейроны	HEK293T, <i>D. Melanogaster</i>	влияние на патогенность мутантного LRRK2 через E2F1 и DP

ЭСК – эмбриональные стволовые клетки; МЧ – постмортальные ткани мозга человека; SH-SY5Y – культура клеток нейробластомы человека; HEK293T – человеческие эмбриональные клетки почек, трансфицированные Т-антигеном вируса SV-40; HEK293 – человеческие эмбриональные клетки почек.

тие в лизосомальной аутофагии. MAPT принимает участие в аксональном транспорте.

Таким образом, анализ всех возможных функций ключевых генов патогенеза БП, представленных в табл. 1 и рис. 1, позволяет предположить, что наряду с нарушением процессов нормального функционирования митохондрий и процессов протеолиза важную роль в патогенезе БП может играть нарушение процессов везикулярного синаптического транспорта и нормального функционирования синапса.

С другой стороны, анализ всех известных генетических вариантов в девяти ключевых генах БП позволяет разделить их на три основные группы, представленные на рис. 2 (Sharma et al., 2012). К первой группе относятся очень редкие варианты с очень высоким риском развития БП – фактически это мутации, приводящие к развитию семейных форм заболевания. Ко второй группе относятся мутации в гене *GBA*, которые встречаются намного чаще, чем мутации в генах семейных форм, но имеют более низкий риск развития БП. В третью группу входят генетические варианты в трех генах *SNCA*, *LRRK2*, *MAPT*, которые имеют высокую аллельную частоту, но очень низкий риск развития заболевания.

В заключение хотелось бы отметить, что, несмотря на очевидный прогресс, достигнутый в изучении молекулярно-генетических факторов и механизмов патогенеза БП, еще остается целый ряд нерешенных и очень важных вопросов, связанных развитием нейродегенеративных процессов при БП. Так, до сих пор остается неизвестным, где начинаются процессы нейродегенерации – в соме нейрона или на его периферии, а также – какие именно процессы запускают развитие патологии. Кроме того, все выявленные на сегодняшний день мутации в генах моногенных форм БП описывают не более 50% все известных семей с аутосомно-рецессивной формой БП и только около 20% семей с аутосомно-доминантной формой БП (Sharma et al., 2012).

Следовательно, выявлены далеко не все гены и описаны не все мутации, которые могут быть вовлечены в патогенез БП, и работы по их поиску необходимо продолжать. При этом необходимо использовать самые современные и высокопроизводительные технологии (полногеномный, полноэкзомный и полнотранскриптомный анализ), а также проводить параллельное изучение различных моделей заболевания и всех доступных тканей (в первую очередь лейкоцитов) больных БП, находящихся на разных стадиях заболевания. И только такой комплексный по-

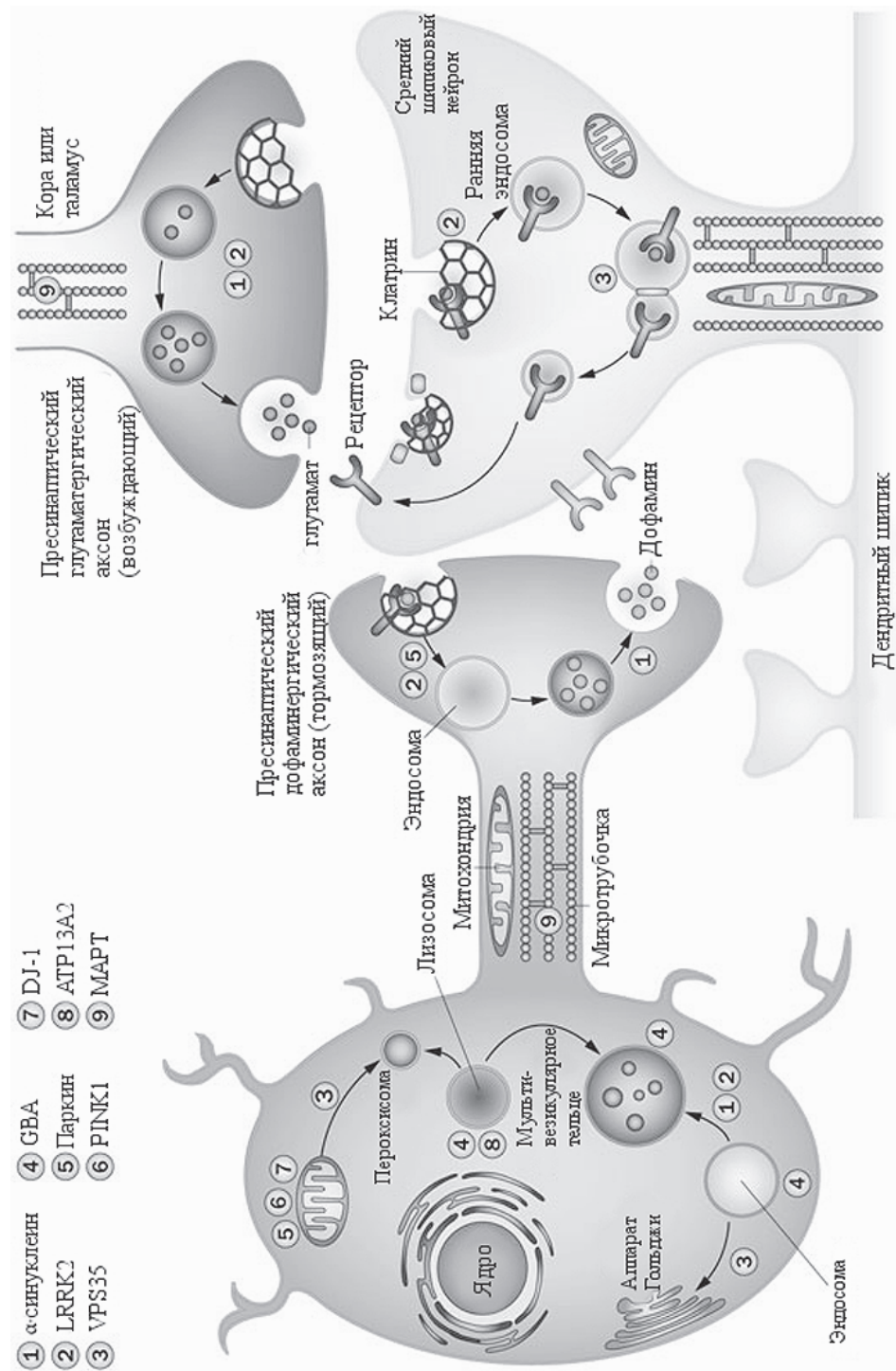


Рис. 1. Современные представления об этиопатогенезе болезни Паркинсона и возможная роль ключевых кандидатных генов заболевания в патологическом процессе



Рис. 2. Относительный риск развития болезни Паркинсона у носителей генетических факторов риска в зависимости от их аллельной частоты

ход позволит сформировать полную картину этиопатогенеза БП и ответить на все вопросы, поставленные выше.

Литература

- Багыева Г.Х., Иллариошкин С.Н., Сломинский П.А. и др. Сочетание мутаций в локусах PARK2 и PARK8 у пациентки с ранней формой болезни Паркинсона // Неврол. журнал. 2007. Т. 2. С. 15-18.
- Иллариошкин С.Н., Сломинский П.А., Шадрин М.И. и др. Гетерогенность спорадической болезни Паркинсона: Молекулярный подход к решению проблемы // Анн. клин. эксперим. неврологии. 2007. Т. 1. С. 23-31.
- Семенова Е.В., Шадрин М.И., Сломинский П.А. и др. Анализ изменения дозы гена альфа-синуклеина при аутосомно-доминантной форме болезни Паркинсона // Генетика. 2009. Т. 45. № 4. С. 573-576.
- Филатова Е.В., Шадрин М.И., Федотова Е.Ю. и др. Анализ однонуклеотидного полиморфизма rs415430 в гене WNT3 в российской популяции при болезни Паркинсона // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. 2011. Т. 2. С. 3-4.
- Шадрин М.И., Сломинский П.А. Молекулярная генетика болезни Паркинсона // Генетика. 2006. № 8. Т. 42. № 2. С. 1045-1059.
- Шадрин М.И., Семенова Е.В., Сломинский П.А. и др. Метод определения делеций и дупликаций в гене паркина с использованием полимеразной цепной реакции в реальном времени // Мед. генетика. 2006. Т. 5. № 2. С. 52-54.
- Шадрин М.И., Иллариошкин С.Н., Багыева Г.Х. и др. PARK8-форма болезни Паркинсона: мутационный анализ гена LRRK2 в российской популяции // Журнал невропат. и псих. им. С.С. Корсакова. 2007. Т. 3. С. 46-50.
- Allen A.S., Satten G.A. Novel haplotype-sharing approach for genome-wide case-control association studies implicates the calpastatin gene in Parkinson's disease // Genetic Epidemiology. 2009. Vol. 33. P. 657-667.
- Asikainen S., Rudgalvyte M., Heikkinen L. et al. Global microRNA expression profiling of caenorhabditis elegans Parkinson's disease models // J. Mol. neurosci. 2010. Vol. 41. № 1. P. 210-218.
- Barbanti P., Fabbrini G., Ricci A. et al. Increased expression of dopamine receptors on lymphocytes in Parkinson's disease // Mov. Disord. 1999. Vol. 14. P. 764-771.

- Barbato C., Ruberti F., Cogoni C.* Searching for MIND: MicroRNAs in Neurodegenerative Diseases // *J. Biomed. Biotechnol.* 2009. P. ID 871313.
- Beckstead R.B., Ner S.S., Hales K.G. et al.* Bonus, a Drosophila TIF1 homolog, is a chromatin-associated protein that acts as a modifier of position-effect variegation // *Genetics.* 2005. Vol. 169. № 2. P. 783-94.
- Behm-Ansmant I., Rehwinkel J., Doerks T. et al.* mRNA degradation by miRNAs and GW182 requires both CCR4:NOT deadenylase and DCP1:DCP2 decapping complexes // *Genes. Dev.* 2006. Vol. 20. № 14. P. 1885-1898.
- Bellen H.J., Levis R.W., Liao G. et al.* The BDGP gene disruption project: single transposon insertions associated with 40% of Drosophila genes // *Genetics.* 2004. Vol. 167. № 2. P. 761-81.
- Berg D., Schweitzer K.J., Leitner P. et al.* Type and frequency of mutations in the LRRK2 gene in familial and sporadic Parkinson's disease // *Brain.* 2005. Vol. 128. P. 3000-3011.
- Bergman O., Hakansson A., Westberg L. et al.* PITX3 polymorphism is associated with early onset Parkinson's disease // *Neurobiol. Aging.* 2008. Vol. 31. № 1. P. 554-565.
- Bertoli-Avella A.M., Giroud-Benitez J.L., Akyol A. et al.* Novel parkin mutations detected in patients with early-onset Parkinson's disease // *Mov. Disord.* 2005. Vol. 20. № 4. P. 424-431.
- Biskup S., Moore D.J., Celsi F. et al.* Localization of LRRK2 to membranous and vesicular structures in mammalian brain // *Ann Neurol.* 2006. Vol. 60. P. 557-569.
- Bonifacino J.S., Hurley J.H.* Retromer // *Curr. Opin. Cell Biol.* 2008. Vol. 20. № 4. P. 427-36.
- Bonifati V.* Genetics of Parkinson's disease-state of the art, 2013 // *Parkinsonism Relat. Disord.* 2014. Vol. 20. Suppl. 1. P. 23-28.
- Bonifati V., Rizzu P., Van Baren M.J. et al.* Mutations in the DJ-1 gene associated with autosomal recessive early-onset parkinsonism // *Science.* 2003. Vol. 299. P. 256-259.
- Borie C., Gasparini F., Verpillat P. et al.* Association study between iron-related genes polymorphisms and Parkinson's disease // *J. Neurol.* 2002. Vol. 249. № 7. P. 801-804.
- Brighina L., Frigerio R., Schneider N.K. et al.* Alpha-synuclein, pesticides, and Parkinson disease: a case-control study // *Neurology.* 2008. Vol. 70. № 16. Pt 2. P. 1461-1469.
- Buchanan D.D., Silburn P.A., Chalk J.B. et al.* The Cys282Tyr polymorphism in the HFE gene in Australian Parkinson's disease patients // *Neurosci. Lett.* 2002. Vol. 327. № 2. P. 91-4.
- Bushati N., Cohen S.M.* MicroRNAs in neurodegeneration // *Curr. Opin. in Neurobiology.* 2008. Vol. 18. P. 292-296.
- Butson M.J., Cheung T., Yu P.K. et al.* Dose and absorption spectra response of EBT2 Gafchromic film to high energy x-rays // *Australas Phys. Eng. Sci. Med.* 2009. Vol. 32. № 4. P. 196-202.
- Buttarelli F.R., Capriotti G., Pellicano C. et al.* Central and peripheral dopamine transporter reduction in Parkinson's disease // *Neurol. Res.* 2009. Vol. 31. № 7. P. 687-691.
- Chinta S.I., Andersen J.K.* Dopaminergic neurons // *Intern. J. Biochem. Cell. Biol.* 2005. Vol. 37. № 5. P. 942-946.
- Choi P.S., Zakhary L., Choi W.Y. et al.* Members of the miRNA-200 family regulate olfactory neurogenesis // *Neuron.* 2008. Vol. 57. P. 41-55.
- Cookson M.R.* The biochemistry of Parkinson's disease // *Annu. Rev. Biochem.* 2005. Vol. 74. P. 29-52.
- Coppede F.* Genetics and epigenetics of Parkinson's disease // *Sci. World J.* 2012. P. 489830.
- Cuellar T.L., Davis T.H., Nelson P.T. et al.* Dicer loss in striatal neurons produces behavioral and neuroanatomical phenotypes in the absence of neurodegeneration // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2008. Vol. 105. P. 5614-5619.
- Dehay B., Martinez-Vicente M., Caldwell G.A. et al.* Lysosomal impairment in Parkinson's disease // *Mov. Disord.* 2013. Vol. 28. № 6. P. 725-732.
- Deng H., Gao K., Jankovic J.* The VPS35 gene and Parkinson's disease // *Mov. Disord.* 2013. Vol. 28. № 5. P. 569-575.
- Diao H., Li X., Hu S. et al.* Gene expression profiling combined with bioinformatics analysis identify biomarkers for Parkinson disease // *PLoS One.* 2012. Vol. 7. № 12. P. e52319.
- Dil Kuazi A., Kito K., Abe Y. et al.* NEDD8 protein is involved in ubiquitinated inclusion bodies // *J. Pathol.* 2003. Vol. 199. № 2. P. 259-66.
- Ding Q., Keller J.N.* Proteasomes and proteasome inhibition in the central nervous system // *Free Radic. Biol. Med.* 2001. Vol. 31. P. 574-584.

- Ding W.X., Yin X.M. Mitophagy: mechanisms, pathophysiological roles, and analysis // *Biol. Chem.* 2012. Vol. 393. № 7. P. 547-564.
- Donovan A., Roy C.N., Andrews N.C. The ins and outs of iron homeostasis // *Physiology (Bethesda)*. 2006. Vol. 21. P. 115-123.
- Doxakis E. Post-transcriptional regulation of α -synuclein expression by mir-7 and mir-153 // *J. Biol. Chem.* 2010. Vol. 285. P. 12726-12734.
- Dudbridge F., Gusnanto A. Estimation of significance thresholds for genomewide association scans // *Gen. Epidemiol.* 2008. Vol. 32. № 3. P. 227-234.
- Dusek P., Jankovic J., Le W. Iron dysregulation in movement disorders // *Neurobiol. Dis.* 2012. Vol. 46. № 1. P. 1-18.
- Edgar A.J., Polak J.M. Human homologues of yeast vacuolar protein sorting 29 and 35 // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2000. Vol. 277. № 3. P. 622-630.
- Edwards T.L., Scott W.K., Almonte C. et al. Genome-wide association study confirms SNPs in SNCA and the MAPT region as common risk factors for Parkinson disease // *Ann. Hum. Genet.* 2010. № 2. P. 97-109.
- Emelyanov A., Boukina T., Yakimovskii A. et al. Glucocerebrosidase gene mutations are associated with Parkinson's disease in Russia // *Mov. Disord.* 2012. Vol. 27. № 1. P. 158-159.
- Eulalio A., Huntzinger E., Nishihara T. et al. Deadenylation is a widespread effect of miRNA regulation // *RNA*. 2009. Vol. 15. № 1. P. 21-32.
- Evangelou E., Maraganore D.M., Annesi G. et al. Non-replication of association for six polymorphisms from meta-analysis of genome-wide association studies of Parkinson's disease: Large-scale collaborative study // *Am. J. Med. Genet.* 2010. Vol. 153. Pt. B. P. 220-228.
- Evans A.H., Lees A.J. Dopamine dysregulation syndrome in Parkinson's disease // *Curr. Opin. Neurol.* 2004. Vol. 17. P. 393-398.
- Farrer M., Wavrant-De Vrieze F., Crook R. et al. Low frequency of alpha-synuclein mutations in familial Parkinson's disease // *Ann. Neurol.* 1998. Vol. 43. P. 394-397.
- Farrer M., Kachergus J., Forno L. et al. Comparison of kindreds with parkinsonism and alpha-synuclein genomic multiplications // *Ann. Neurol.* 2004. Vol. 55. № 2. P. 174-179.
- Flagler D.J., Huang C.Y., Yuan T.Y. et al. Intracellular flow cytometric measurement of extracellular matrix components in porcine intervertebral disc cells // *Cell Mol. Bioeng.* 2009. Vol. 2. № 2. P. 264-273.
- Fortin D.L., Troyer M.D., Nakamura K. et al. Lipid rafts mediate the synaptic localization of alphasynuclein // *J. Neurosci.* 2004. Vol. 24. P. 6715-6723.
- Funayama M., Hasegawa K., Kowa H. et al. A new locus for Parkinson's disease (PARK8) maps to chromosome 12p11.2-q13.1 // *Ann. Neurol.* 2002. Vol. 51. P. 296-301.
- Fung H.C., Chen C.M., Hardy J. et al. Lack of G2019S LRRK2 mutation in a cohort of Taiwanese with sporadic Parkinson's disease // *Mov. Disord.* 2006. Vol. 21. № 6. P. 880-881.
- Gagliardi M., Annesi G., Tarantino P. et al. Frequency of the ASP620ASN mutation in VPS35 and Arg1205His mutation in EIF4G1 in familial Parkinson's disease from South Italy // *Neurobiol. Aging*. 2014. Vol. 35. № 10. P. 2422.e1-2.
- Gan-Or Z., Giladi N., Rozovski U. et al. Genotype-phenotype correlations between GBA mutations and Parkinson disease risk and onset // *Neurology*. 2008. № 24. P. 2277-2283.
- Gandhi S., Muqit M.M., Stanyer L. et al. PINK1 protein in normal human brain and Parkinson's disease // *Brain*. 2006. Vol. 129. P. 1720-1731.
- Gao X., Martin E.R., Liu Y. et al. Genome-wide Linkage Screen in Familial Parkinson Disease Identifies Loci on Chromosomes 3 and 18 // *Am. J. Hum. Genet.* 2009. Vol. 84. P. 499-504.
- Grünblatt E., Mandel S., Jacob-Hirsch J. et al. Gene expression profiling of parkinsonian substantia nigra pars compacta; alterations in ubiquitin-proteasome, heat shock protein, iron and oxidative stress regulated proteins, cell adhesion/cellular matrix and vesicle trafficking genes // *J. Neural. Transm.* 2004. Vol. 111. P. 1543-1573.
- Grünblatt E., Zehetmayer S., Jacob C.P. et al. Pilot study: peripheral biomarkers for diagnosing sporadic Parkinson's disease // *J. Neural. Transm.* 2010. Vol. 117. № 12. P. 1387-1393.
- Håkansson A., Melke J., Westberg L. et al. Lack of association between the BDNF Val166Met polymorphism and Parkinson's disease in Swedish population // *Ann. Neurol.* 2003. Vol. 53. № 6. P. 823.
- Hamza T.H., Zabetian C.P., Tenesa A. et al. Common genetic variation in the HLA region is associated with late-onset sporadic Parkinson's disease // *Nat. Genet.* 2010. Vol. 42. № 9. P. 781-785.

- Hashimoto M., Hsu L.J., Xia Y. et al. Oxidative stress induces amyloid-like aggregate formation of NACP, alpha-synuclein in vitro // *Neuroreport*. 1999. Vol. 10. № 4. P. 717-721.
- Hatano T., Kubo S., Imai S. et al. Leucine-rich repeat kinase 2 associates with lipid rafts // *Hum. Mol. Genet*. 2007. Vol. 16. P. 678-690.
- Hatano Y., Li Y.J., Sato K. et al. Novel PINK1 mutations in early-onset parkinsonism // *Ann. Neurol*. 2004. Vol. 56. P. 424-427.
- Hattori N., Tanaka M., Ozawa T. et al. Immunohistochemical studies on complexes I, II, III, and IV of mitochondria in Parkinson's disease // *Ann. Neurol*. 1991. Vol. 30. P. 563-571.
- Healy D.G., Abou-Sleiman P.M., Ozawa T. et al. A functional polymorphism regulating dopamine beta-hydroxylase influences against Parkinson's disease // *Ann. Neurol*. 2004. Vol. 55. № 3. P. 443-446.
- Hedrich K., Marder K., Harris J. et al. Evaluation of 50 probands with early-onset Parkinson's disease for parkin mutations // *Neurology*. 2002. Vol. 58. P. 1239-1246.
- Hilker R., Klein C., Ghaemi M. et al. Positron emission tomographic analysis of the nigrostriatal dopaminergic system in familial parkinsonism associated with mutations in the parkin gene // *Ann. Neurol*. 2001. Vol. 49. № 3. P. 367-376.
- Hoglinger G.U., Carrard G., Michel P.P. et al. Dysfunction of mitochondrial complex I and the proteasome: Interactions between two biochemical de. cits in a cellular model of Parkinson's disease // *J. Neurochem*. 2003. Vol. 86. P. 1297-1307.
- Ibanez P., Lesage S., Janin S. et al. Alpha-synuclein gene rearrangements in dominantly inherited parkinsonism: frequency, phenotype, and mechanisms // *Arch. Neurol*. 2009. Vol. 66. № 1. P. 102-108.
- Illarionovskin S.N., Ivanova-Smolenskaya I.A., Markova E.D. et al. Lack of alpha-synuclein gene mutations in families with autosomal dominant Parkinson's disease in Russia // *J. Neurol*. 2000. Vol. 247. № 12. P. 968-969.
- Illarionovskin S.N., Periquet M., Rawal N. et al. Mutation analysis of the parkin gene in Russian families with autosomal recessive juvenile parkinsonism // *Mov. Disord*. 2003. Vol. 18. № 8. P. 914-919.
- Illarionovskin S.N., Shadrina M.I., Slominsky P.A. et al. A common leucine-rich repeat kinase 2 gene mutation in familial and sporadic Parkinson's disease in Russia // *Eur. J. Neurol*. 2007. Vol. 14. № 4. P. 413-417.
- International Parkinson Disease Genomics C. Imputation of sequence variants for identification of genetic risks for Parkinson's disease: a meta-analysis of genome-wide association studies. *Nalls M.A., Plagnol V. et al. // Lancet*. 2011. № 9766. P. 641-649.
- Junn E., Lee K.-W., Jeong B.S. et al. Repression of a-synuclein expression and toxicity by microRNA-7 // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2009. Vol. 106. № 31. P. 13052-13057
- Junn E., Mouradian M.M. MicroRNAs in neurodegenerative diseases and their therapeutic potential // *Pharmac. and therapeutics*. 2012. Vol. 133. № 2. P. 142-150.
- Kahns S., Kalai M., Jakobsen L.D. et al. Caspase-1 and caspase-8 cleave and inactivate cellular parkin // *J. Biol. Chem*. 2003. Vol. 278. № 26. P. 23376-80.
- Kann M., Jacobs H., Mohrmann K. et al. Role of parkin mutations in 111 community-based patients with early-onset parkinsonism // *Ann. Neurol*. 2002. Vol. 51. P. 621-625.
- Karamohamed S., DeStefano A.L., Wilk J.B. et al. A haplotype at the PARK3 locus influences onset age for Parkinson's disease: the GenePD study // *Neurology*. 2003. Vol. 61. № 11. P. 1557-1561.
- Kay D.M., Kramer P.L., Higgins D.S. et al. Escaping Parkinson's disease: a neurologically healthy octogenarian with the LRRK2 G2019S mutation // *Mov. Disord*. 2005. Vol. 20. P. 1077-1078.
- Kelada S.N., Stapleton P.L., Farin F.M. et al. Glutathione S-transferase M1, T1, and P1 polymorphisms and Parkinson's disease // *Neurosci. Lett*. 2003. Vol. 337. № 1. P. 5-8.
- Kim J., Inoue K., Ishii J. et al. A microRNA feedback circuit in midbrain dopamine neurons // *Science*. 2007. Vol. 317. № 5842. P. 1220-1224.
- Kim S., Leon B.S.J., Heo C. et al. α -Synuclein induces apoptosis by altered expression in human peripheral lymphocytes in Parkinson's disease // *FASEB J*. 2004. Vol. 18. P. 1615-1617.
- Kimpara T., Takeda A., Watanabe K. et al. Microsatellite polymorphism in the human heme oxygenase-1 gene promoter and its application in association studies with Alzheimer and Parkinson disease // *Hum. Genet*. 1997. Vol. 100. № 1. P. 145-147.
- Kitada T., Asakawa S., Hattori N. et al. Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism // *Nature*. 1998. Vol. 392. P. 605-608.

- Kloosterman W.P., Plasterk R.H.A.* The diverse functions of microRNAs in animal development and disease // *Dev. Cell.* 2006. Vol. 9. № 4. P. 441-450.
- Krichevsky A.M., King K.S., Donahue C.P. et al.* A microRNA array reveals extensive regulation of microRNAs during brain development // *RNA.* 2003. Vol. 9. № 10. P. 1274-1281.
- Kruger R., Kuhn W., Muller T. et al.* Ala30Pro mutation in the gene encoding alpha-synuclein in Parkinson's disease // *Nat. Genet.* 1998. Vol. 18. P. 106-108.
- Latourelle J.C., Pankratz N., Dumitriu A. et al.* Genomewide association study for onset age in Parkinson disease // *BMC Medical Genetics.* 2009. Vol. 10. P. 98.
- Lau P., de Strooper B.* Dysregulated microRNAs in neurodegenerative disorders // *Seminars Cell. Develop. Biol.* 2010. Vol. 21. P. 768-773.
- L'Episcopo F., Serapide M.F., Tiroleo C. et al.* A Wnt1 regulated Frizzled-1/beta-Catenin signaling pathway as a candidate regulatory circuit controlling mesencephalic dopaminergic neuron-astrocyte crosstalk: Therapeutic relevance for neuron survival and neuroprotection // *Mol. Neurodegener.* 2011. Vol. 6. P. 49.
- Lesage S., Brice A.* Parkinson's disease: from monogenic forms to genetic susceptibility factors // *Human molec. genetics.* 2009. Vol. 18. № R1. P. R48-59.
- Lesage S., Durr A., Tazir M. et al.* LRRK2 G2019S as a cause of Parkinson's disease in North African Arabs // *New Engl. J. Med.* 2006. Vol. 354. P. 422-423.
- Lesnick T.G., Papapetropoulos S., Mash D.C. et al.* A genomic pathway approach to a complex disease: axon guidance and Parkinson disease // *PLoS Genet.* 2007. Vol. 3. № 6. P. e98.
- MacLeod D., Dowman J., Hammond R. et al.* The familial parkinsonism gene LRRK2 regulates neurite process morphology // *Neuron.* 2006. Vol. 52. P. 587-593.
- Mandemakers W., Morais V.A., Strooper D.* A cell biological perspective on mitochondrial dysfunction in Parkinson disease and other neurodegenerative diseases // *J. Cell. Sci.* 2007. Vol. 120. Pt. 10. P. 1707-1716.
- Maraganore D.M., Farrer M.J., Hardy J.A. et al.* Case-control study of the ubiquitin carboxyterminal hydrolase L1 gene in Parkinson's disease // *Neurology.* 1999. Vol. 53. P. 1858-1860.
- Maraganore D.M., de Andrade M., Lesnick T.G. et al.* High-Resolution Whole-Genome Association Study of Parkinson Disease // *Am. J. Hum. Genet.* 2005. Vol. 77. P. 685-693.
- Marx F.P., Holzmann C., Strauss K.M. et al.* Identification and functional characterization of a novel R621C mutation in the synphilin-1 gene in Parkinson's disease // *Hum. Mol. Genet.* 2003. Vol. 12. P. 1223-1231.
- Mellick G.D., Buchanan D.D., McCann S.J. et al.* Variations in the monoamine oxidase B (MAOB) gene are associated with Parkinson's disease // *Mov. Disord.* 1999. Vol. 14. № 2. P. 219-24.
- Minones-Moyano E., Porta S., Escaramis G. et al.* MicroRNA profiling of Parkinson's disease brains identifies early downregulation of miR-34b/c which modulate mitochondrial function // *Hum. Mol. Genet.* 2011. Vol. 20. № 15. P. 3067-78.
- Miska E.A., Alvarez-Saavedra E., Townsend M. et al.* Microarray analysis of microRNA expression in the developing mammalian brain // *Genome. Biol.* 2004. Vol. 5. P. R68.
- Mutez E., Larvor L., Lepretre F. et al.* Transcriptional profile of Parkinson blood mononuclear cells with LRRK2 mutation // *Neurobiol. Aging.* 2011. Vol. 32. № 10. P. 1839-1848.
- Nagai Y., Ueno S., Saeki Y. et al.* Decrease of the D3 dopamine receptor mRNA expression in lymphocytes from patients with Parkinson's disease // *Neurology.* 1996. Vol. 46. P. 791-795.
- Nelson P.T., Wang W.-X., Rajeev B.W.* MicroRNAs (miRNAs) in Neurodegenerative Diseases // *Brain Pathology.* 2008. Vol. 18. P. 130-138.
- Neudorfer O., Giladi N., Elstein D. et al.* Occurrence of Parkinson's syndrome in type I Gaucher disease // *QJM.* 1996. Vol. 89. № 9. P. 691-694.
- Ng K.H., Cheung K.Y., Hu Y.M. et al.* The role, responsibilities and status of the clinical medical physicist in AFOMP // *Australas Phys. Eng. Sci. Med.* 2009. Vol. 32. № 4. P. 175-179.
- Oliveira S.A., Scott W.K., Martin E.R. et al.* Parkin Mutations and Susceptibility Alleles in Late-Onset Parkinson's Disease // *Ann. Neurol.* 2003. Vol. 53. P. 624-629.
- Ozelius L.J., Senthil G., Suanders-Pullman R. et al.* LRRK2 G2019S as a cause of Parkinson's disease in Ashkenazi Jewish // *New Engl. J. Med.* 2006. Vol. 354. P. 424-425.
- Paisan-Ruiz C., Jain S., Evans E.W. et al.* Cloning of the gene containing mutations that cause PARK8-linked Parkinson's disease // *Neuron.* 2004. Vol. 44. P. 595-600.

- Pan T., Kondo S., Le W. et al.* The role of autophagy-lysosome pathway in neurodegeneration associated with Parkinson's disease // *Brain*. 2008. Vol. 131. Pt. 8. P. 1969-1978.
- Pankratz H., Foroud T.* Genetics of Parkinson disease // *NeuroRx*. 2004. Vol. 1. P. 235-242.
- Pankratz N., Wilk J.B., Latourelle J.C. et al.* Genomewide association study for susceptibility genes contributing to familial Parkinson disease // *Hum. Genet.* 2009. Vol. 124. P. 593-605.
- Pastor P., Munoz E., Ezquerra M. et al.* Analysis of the coding and the 5'-flanking regions of the alpha-synuclein gene in patients with Parkinson's disease // *Mov. Disord.* 2001. Vol. 16. P. 1115-1119.
- Periquet M., Latouche M., Lohmann E. et al.* Parkin mutations are frequent in patients with isolated early-onset parkinsonism // *Brain*. 2003. Vol. 126. P. 1271-1278.
- Pesah Y., Pham T., Burgess H. et al.* Drosophila parkin mutants have decreased mass and cell size and increased sensitivity to oxygen radical stress // *Development*. 2004. Vol. 131. № 9. P. 2183-2194.
- Polymeropoulos M.H., Higgins J.J., Golbe L.I. et al.* Mapping of a gene for Parkinson's disease to chromosome 4q21 – q23 // *Science*. 1996. Vol. 274. P. 1197-1199.
- Polymeropoulos M.H., Lavedan C., Leroy E. et al.* Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease // *Science*. 1997. Vol. 276. P. 2045-2047.
- Port F., Kuster M., Herr P. et al.* Wingless secretion promotes and requires retromer-dependent cycling of Wntless // *Nat. Cell. Biol.* 2008. Vol. 10. № 2. P. 178-185.
- Ramirez A., Heimbach A., Grundemann J. et al.* Hereditary parkinsonism with dementia is caused by mutations in ATP13A2, encoding a lysosomal type 5 P-type ATPase // *Nat. Genet.* 2006. Vol. 38. P. 1184-1191.
- Reale M., Iarlori C., Thomas A. et al.* Peripheral cytokines profile in Parkinson's disease // *Brain Behav. Immun.* 2009. Vol. 23. № 1. P. 55-63.
- Riedel A.G., Watts P.M., Jenner P. et al.* P450 enzymes and Parkinson's disease: the story so far. // *Mov. Disord.* 1998. Vol. 13. № 2. P. 212-220.
- Ross G.W., Petrovitch H., Abbott R.D. et al.* Association of olfactory dysfunction with risk for future Parkinson's disease // *Ann. Neurol.* 2008a. Vol. 63. № 2. P. 167-173.
- Ross O.A., Braithwaite A.T., Skipper L.M. et al.* Genomic investigation of alpha-synuclein multiplication and parkinsonism // *Ann. Neurol.* 2008b. Vol. 63. № 6. P. 743-50.
- Ryoo H.L., Pierrotti D., Joyce J.N.* Dopamine D3 receptor is decreased and D2 receptor is elevated in the striatum of Parkinson's disease // *Mov. Disord.* 1998. Vol. 13. P. 788-797.
- Saad M., Lesage S., Saint-Pierre A. et al.* Genome-wide association study confirms BST1 and suggests a locus on 12q24 as the risk loci for Parkinson's disease in the European population // *Hum. Mol. Genet.* 2011. Vol. 20. № 3. P. 615-627.
- Santosh S., Arora N., Sarma P. et al.* Interaction map and selection of microRNA targets in Parkinson's disease-related genes // *J. Biomed. Biotech.* 2009. P. ID363145.
- Satake W., Nakabayashi Y., Mizuta I. et al.* Genome-wide association study identifies common variants at four loci as genetic risk factors for Parkinson's disease // *Nat. Genet.* 2009. Vol. 3. № 12. P. 1303-1307.
- Schaefer A., O'Carroll D., Tan C.L. et al.* Cerebellar neurodegeneration in the absence of microRNAs // *JEM.* 2007. Vol. 204. № 7. P. 1553-1558.
- Scherzer C.R., Eklund A.C., Morse L.J. et al.* Molecular markers of early Parkinson's disease based on gene expression in blood // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2007. Vol. 104. № 3. P. 955-960.
- Schmitt I., Wullner U., van Rooyen J.P. et al.* Variants in the 3'UTR of SNCA do not affect miRNA-433 binding and alpha-synuclein expression // *Eur. J. Hum. Genet.* 2012. Vol. 20. № 12. P. 1265-1269.
- Schneider L., Zhang J.* Lysosomal function in macromolecular homeostasis and bioenergetics in Parkinson's disease // *Mol. Neurodegener.* 2010. Vol. 5. P. 14.
- Schratt G.M., Tuebinger F., Nigh E.A. et al.* A brain-specific microRNA regulates dendritic spine development // *Nature*. 2006. Vol. 439. № 7074. P. 283-289.
- Scott W.K., Nance M.A., Watts R.L. et al.* Complete genomic screen in Parkinson disease: evidence for multiple genes // *JAMA*. 2001. Vol. 286. № 18. P. 2239-2244.
- Semenova E.V., Shadrina M.I., Slominsky P.A. et al.* Analysis of PARK2 Gene Exon Rearrangements in Russian Patients with Sporadic Parkinson's Disease // *Mov. Disorders.* 2012. Vol. 27. № 1. P. 139-142.
- Shadrina M.I., Semenova E.V., Slominsky P.A. et al.* Effective quantitative real-time polymerase chain reaction analysis of the parkin gene (PARK2) exon 1-12 dosage // *BMC Med. Gen.* 2007. Vol. 8. № 6. P. 1-7.

- Sharma M., Lichtner P., Kruger R. et al. Further delineation of the association signal on chromosome 5 from the first whole genome association study in Parkinson's disease // *Neurobiol. Aging*. 2009. Vol. 30. P. 1706-1709.
- Sharma M., Ioannidis J.P., Aasly J.O. et al. Large-scale replication and heterogeneity in Parkinson disease genetic loci // *Neurology*. 2012. Vol. 79. № 7. P. 659-67.
- Shi Z.-z., Zhang J.-w., Zheng S. What we know about ST13, a co-factor of heat shock protein, or a tumor suppressor? // *J. Zhejiang University SCIENCE B*. 2007. Vol. 8. № 3. P. 170-176.
- Shimura H., Hattori N., Kubo S. et al. Familial Parkinson disease gene product, parkin, is a ubiquitinprotein ligase // *Nat. Genet.* 2000. Vol. 25. P. 302-305.
- Sidhu A., Wersinger C., Vernier P. a-Synuclein regulation of the dopaminergic transporter: a possible role in the pathogenesis of Parkinson's disease // *FEBS Letters*. 2004. Vol. 565. № 1-3. P. 1-5.
- Simon-Sanchez J., Schulte C., Bras J.M. et al. Genome-wide association study reveals genetic risk underlying Parkinson's disease // *Nat Genet.* 2009. № 12. P. 1308-1312.
- Simon-Sanchez J., van Hilten J.J., van de Warrenburg B. et al. Genome-wide association study confirms extant PD risk loci among the Dutch // *Eur. J. Hum. Genet.* 2011. Vol. 19. № 6. P. 655-661.
- Simunovic F., Yi M., Wang Y. et al. Gene expression profiling of substantia nigra dopamine neurons: further insights into Parkinson's disease pathology // *Brain*. 2009. Vol. 132. Pt. 7. P. 1795-809.
- Simunovic F., Yi M., Wang Y. et al. Evidence for gender-specific transcriptional profiles of nigral dopamine neurons in Parkinson disease // *PLoS One*. 2010. Vol. 5. № 1. P. e8856.
- Smirnova L., Gräfe A., Seiler A. et al. Regulation of miRNA expression during neural cell specification // *Eur. J. Neurosci.* 2005. Vol. 21. № 6. P. 1469-1477.
- Sofic E., Riederer P., Heinsen H. et al. Increased iron (III) and total iron content in post mortem substantia nigra of parkinsonian brain // *J. Neural. Transm.* 1988. Vol. 74. № 3. P. 199-205.
- Spatola M., Wider C. Genetics of Parkinson's disease: the yield // *Parkinsonism Relat Disord.* 2014. Vol. 20. Suppl. 1. P. S35-S38.
- Srinivasan B.S., Doostzadeh J., Absalan F. et al. Whole genome survey of coding SNPs reveals a reproducible pathway determinant of Parkinson disease // *Hum. Mutation*. 2009. Vol. 30. № 2. P. 228-238.
- Sudhof T.C., Rizo J. Synaptic vesicle exocytosis // *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2011. Vol. 3. P. 12.
- Swan M., Saunders-Pullman R. The association between ss-glucocerebrosidase mutations and parkinsonism // *Curr. Neurol. Neurosci. Rep.* 2013. № 8. P. 368.
- Tan E., Skipper L.M. Pathogenic mutations in Parkinson disease // *Hum. Mutation*. 2007. Vol. 28. P. 641-653.
- Tan E.K., Khajavi M., Thornby J.I. et al. Variability and validity of polymorphism association studies in Parkinson's disease // *Neurology*. 2000. Vol. 55. № 4. P. 533-538.
- Tan E.K., Shen H., Tan L.C. et al. The G2019S LRRK2 mutation is uncommon in an Asian cohort of Parkinson's disease patients // *Neurosci. Lett.* 2005. Vol. 384. P. 327-329.
- Tan E.K., Kwok H.H., Tan L.C. et al. Analysis of GWAS-linked loci in Parkinson disease reaffirms PARK16 as a susceptibility locus // *Neurology*. 2010. Vol. 75. № 6. P. 508-512.
- The UK Parkinson's disease consortium and the wellcome trust case control consortium 2 Dissection of the genetics of Parkinson's disease identifies an additional association 5' of SNCA and multiple associated haplotypes at 17q21 // *Hum. Molec. Gen.* 2011. Vol. 20. № 2. P. 345-353.
- Toda T., Momose Y., Murata M. et al. Toward identification of susceptibility genes for sporadic Parkinson's disease // *J. Neurol.* 2003. Vol. 250. Suppl. 3. P. III40-44.
- Trimmer P.A., Borland M.K., Keeney P.M. et al. Parkinson's disease transgenic mitochondrial cybrids generate Lewy inclusion bodies // *J. Neurochem.* 2004. Vol. 88. № 4. P. 800-812.
- Trinh J., Farrer M. Advances in the genetics of Parkinson disease // *Nat. Rev. Neurol.* 2013. Vol. 9. № 8. P. 445-54.
- Ugrumov M.V., Khaindrava V.G., Kozina E.A. et al. Modeling of presymptomatic and symptomatic stages of parkinsonism in mice // *Neurosci.* 2011. Vol. 181. P. 175-88.
- Valente E.M., Bentivoglio A.R., Dixon P.H. et al. Localization of a novel locus for autosomal recessive early-onset parkinsonism, PARK6, on human chromosome 1p35-p36 // *Am. J. Hum. Genet.* 2001. Vol. 68. P. 895-900.
- Valente E.M., Abou-Sleiman P.M., Caputo V. et al. Hereditary early-onset Parkinson's disease caused by mutations in PINK1 // *Science*. 2004. Vol. 304. P. 1158-1160.

- Van der Walt J.M., Nicodemus K.K., Martin E.R. et al.* Mitochondrial polymorphisms significantly reduce the risk of Parkinson disease // *Am. J. Hum. Genet.* 2003. Vol. 72. № 4. P. 804-811.
- Van Duijn C.M., Dekker M.C., Bonifati V. et al.* Park7, a novel locus for autosomal recessive earlyonset parkinsonism, on chromosome 1p36 // *Ibid.* 2001. Vol. 69. P. 629-634.
- Vo N., Klein M.E., Varlamova O. et al.* A cAMP-response element binding protein-induced microRNA regulates neuronal morphogenesis // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2005. Vol. 102. № 45. P. 16426-16431.
- Wang G., van der Walt J.M., Mayhew G. et al.* Variation in the miRNA-433 binding site of FGF20 confers risk for Parkinson disease by overexpression of a-synuclein // *Am. J. Hum. Genet.* 2008. Vol. 82. P. 283-289.
- West A., Periquet M., Lincoln S. et al.* Complex relationship between Parkin mutations and Parkinson disease // *Am. J. Med. Genet. B: Neuropsychiatr. Genet.* 2002. Vol. 114. № 5. P. 584-591.
- West A.B., Moore D.J., Biskup S. et al.* Parkinson's disease-associated mutations in leucinerich repeat kinase 2 augment kinase activity // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2005. Vol. 102. P. 16842-16847.
- Wooten G.F., Currie L.J., Bennett J.P. et al.* Maternal inheritance in Parkinson's disease // *Ann. Neurol.* 1997. Vol. 41. P. 265-268.
- Wu G., Wang X., Feng X. et al.* Altered expression of autophagic genes in the peripheral leukocytes of patients with sporadic Parkinson's disease // *Brain Res.* 2011. Vol. 1394. P. 105-111.
- Xiromerisiou G., Hadjigeorgiou G.M., Eerola J. et al.* BDNF tagging polymorphisms and haplotype analysis in sporadic Parkinson's disease in diverse ethnic groups // *Neurosci. Lett.* 2007. Vol. 415. № 1. P. 59-63.
- Yavich L., Tanila H., Vepsäläinen S. et al.* Role of alpha-synuclein in presynaptic dopamine recruitment // *J. Neurosci.* 2004. Vol. 24. P. 11165-11170.
- Yoritaka A., Hattori N., Yoshino H. et al.* Catechol-O-methyltransferase genotype and susceptibility to Parkinson's disease in Japan. Short communication // *J. Neural. Transm.* 1997. Vol. 104. № 11-12. P. 1313-1317.
- Youle R.J., Narendra D.P.* Mechanisms of mitophagy // *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 2011. Vol. 12. № 1. P. 9-14.
- Zarranz J.J., Alegre J., Gomez-Esteban J.C. et al.* The new mutation, E46K, of alpha-synuclein causes Parkinson and Lewy body dementia // *Ann. Neurol.* 2004. Vol. 55. P. 164-173.
- Zhang L., Shimoji M., Thomas B. et al.* Mitochondrial localization of the Parkinson's disease related protein DJ-1: Implications for pathogenesis // *Hum. Mol. Genet.* 2005. Vol. 14. P. 2063-2073.
- Zhu X., Siedlak S.L., Smith M.A. et al.* LRRK2 protein is a component of Lewy bodies // *Ann. Neurol.* 2006. Vol. 60. P. 617-618.
- Zimprich A., Biskup S., Leitner P. et al.* Mutations in LRRK2 cause autosomal-dominant parkinsonism with pleomorphic pathology // *Neuron.* 2004. Vol. 44. P. 601-607.

Молекулярные основы болезни Паркинсона, обусловленной мутациями в гене *LRRK2*

С.Н. Пчелина, А.К. Емельянов, Т.С. Усенко

Содержание

1. Введение
2. Спектр мутаций в гене *LRRK2* и особенности клинического течения *LRRK2*-ассоциированной формы БП
3. Мутации в гене *LRRK2* и активность фермента
4. Влияние мутаций в гене *LRRK2* на агрегацию и метаболизм α -синуклеина
5. Роль *LRRK2* в иммунном ответе и индукции апоптоза
6. Заключение

1. Введение

Болезнь Паркинсона (БП) – распространенное прогрессирующее нейродегенеративное заболевание. Нарастающая симптоматика (тремор, ригидность, брадикинезия) в ряде случаев приводит к полной обездвиженности. В большинстве развитых стран в возрасте старше 65 лет БП страдает до 2% населения. При этом в настоящее время в 20% случаев начало заболевания приходится на трудоспособный возраст – до 50 лет. Заболевание может носить как спорадический, так и семейный характер. Независимо от этиологии БП симптомы заболевания коррелируют с гибелью дофаминергических нейронов черной субстанции мозга (Иллариошкин, 2002). Механизмы нейродегенерации остаются неизвестными, в силу этого сегодня не существует лекарственных средств, способных предотвратить или замедлить процесс нейродегенерации. Подбор нейропротекторной терапии осложняется тем, что клиническая симптоматика заболевания проявляется при гибели 80% нейронов черной субстанции, а также отсутствием лабораторных диагностических тестов заболевания. Исследование механизмов нейродегенерации при БП будет способствовать разработке методов прееклинической диагностики заболевания и новых подходов к его лечению.

В настоящее время в качестве одного из основных звеньев патогенеза БП рассматривается формирование нейротоксических агрегатов небольшого пресинаптического белка α -синуклеина. Предполагается, что индуцировать агрегацию этого белка может ряд факторов, включая точковые мутации и мультипликации гена, кодирующего α -синуклеин (ген *SNCA*), усиление окислительного стресса, митохондриальная дисфункция, нарушения систем клеточной деградации белка и т.д.

Сокращения: БП – болезнь Паркинсона; УПС – убиквитин-протеосомная система деградации белка; NFAT – негативный регулятор ядерного активатора Т-клеток.

(Шадрина, Сломинский. 2008; Cookson, Bandmann, 2010). При этом, нарушение регуляции апоптоза дофаминергических нейронов черной субстанции рассматривается как один из возможных механизмов их гибели (Levyetal, 2009). В то же время, обсуждается возможность вовлечения в патогенез БП таких механизмов, как воспаление и аутофагия (Mizushima et al., 2008; Levy et al., 2009).

Исследование механизма нейродегенерации при моногенных формах БП с известной молекулярной природой заболевания представляется важным шагом в понимании патогенеза более распространенных спорадических форм заболевания. Сегодня с развитием наследственных форм БП в геноме человека ассоциировано 18 локусов (Bekrisetal, 2010). Однозначно доказано, что мутации в пяти генах ответственны за развитие менделирующих форм заболевания: ген α -синуклеина (*SNCA*), E3-убиквитин лигазы (паркин, *PARK2*), митохондриальной киназы *PINK1*, редокс-зависимого шаперона *DJ-1* и обогащенной лейциновыми повторами киназы 2 (*LRRK2*). В то время как мутации в генах *PARK2*, *DJ1*, *PINK1* ассоциированы с развитием редких аутосомно-рецессивных форм заболевания с ранним началом (как правило до 40 лет), мутации в гене *LRRK2* обнаруживаются у пациентов с аутосомно-доминантной формой БП с поздним началом, а также могут выявляться у пациентов со спорадической формой заболевания. Таким образом, мутации в гене *LRRK2* являются наиболее частой причиной развития наследственных форм БП, известной сегодня (Hardy, 2010). Несмотря на то что в некоторых популяциях распространение мутаций в гене *LRRK2* среди пациентов с семейной формой БП достигает 40% (Ozeliusetal., 2006; Lesageetal., 2006), механизм нейродегенерации при данной форме заболевания остается неясным. Широкое распространение мутаций в гене *LRRK2* впервые дает возможность создания репрезентативной группы пациентов с однородной этиологией БП, с одной стороны? для описания клинической особенной данной формы заболевания и, с другой стороны, для исследования молекулярных механизмов ее развития.

В ходе многолетнего исследования нами описано 14 случаев БП, обусловленной мутациями в гене *LRRK2*, выявлены особенности клинического течения данной формы заболевания, а также впервые проведены исследования влияния мутаций в гене *LRRK2* на метаболизм α -синуклеина и индукцию апоптоза с использованием клеток крови пациентов с мутациями в данном гене.

2. Спектр мутаций в гене *LRRK2* и особенности клинического течения *LRRK2*-ассоциированной формы БП

Локус *PARK8* был картирован в 2002 г. в японской семье (Funayama et al., 2002). Впервые, практически одновременно, мутации в гене *LRRK2*, расположенном в этом локусе, были обнаружены у пациентов с аутосомно-доминантным типом наследования БП в одной британской семье, а также в семьях басков в Испании (Paisan-Ruiz et al., 2004; Zimprich et al., 2004). Ген *LRRK2* находится на длинном плече 12-й хромосомы и состоит из 51 экзона. Ген *LRRK2* кодирует большой белок (2527 а.о., 286 кДа), содержащий ряд функциональных доменов, в том числе киназный

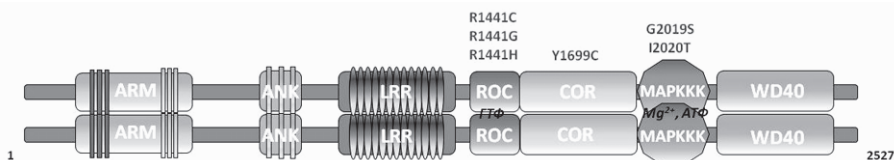


Рис. 1. Структура белка LRRK2 с указанием консервативных доменов: (ARM (Armadillo), ANK (Ankyrinrepeat), LRR (leucine-richrepeat), Roc (Rasofcomplexproteins: GTPase), COR (C-terminalofRoc), MAPKKK (mitogenactivatedkinasekinasekinase), WD-40 domain)

Указаны мутации, приводящие к развитию БП

и ГТФ-азный домены (рис. 1). В отсутствие знаний о физиологических субстратах данной киназы представление о клеточных функциях LRRK2 далеко не полно (Greggio, Cookson, 2009). Белок относят к семейству ROCO-протеинов, так как он наряду с киназным доменом имеет в своем составе ROC и COR домены (см. рис.1). Считается, что LRRK2 обладает как киназной, так и ГТФазной активностями, которые могут быть взаимосвязаны (Greggio, 2012). Исходя из структуры, LRRK2 представляет собой большой белок с центральной ГТФ-азной/киназной каталитической областью, окруженной мотивами белок-белковых и, возможно, белок-мембранных взаимодействий, способный к образованию гомо- и, возможно, гетеродимеров.

Сегодня мутации в гене *LRRK2* выявлены в семьях с аутосомно-доминантной формой БП в различных популяциях (Paisan-Kuiz et al., 2005; Giasson, Van Deerlin, 2008). Они обнаруживаются также при спорадической форме заболевания и являются наиболее частой генетической причиной развития БП, известной сегодня. Наиболее распространенной из всех описанных в гене *LRRK2* мутаций (около 75% мутантных аллелей) среди пациентов с БП является мутация G6055A, приводящая к замене глицина на серин в 2019 положении (G2019S), локализуется в киназном домене. Мутация встречается в европейских популяциях в 5–7% случаев семейной БП, также обнаруживается в 0,6–1,6% спорадических случаев. В некоторых изолированных популяциях, например, среди арабов Северной Африки и евреев ашкенази, частота данной мутации среди семейных форм БП достигает 30–40% (Ozelius et al., 2006; Lesage et al., 2006). В то же время, мутация G2019S не обнаружена в некоторых азиатских популяциях (Tan et al., 2005; Fung et al., 2006).

Сегодня в гене *LRRK2* описано более 50 мутаций (Shulman et al., 2011). Все мутации (в основном миссенс мутации), обнаруженные у больных БП в гетерозиготном состоянии, сегрегировали с заболеванием и не встречались в контроле. Кроме того, мутации в данном гене не были найдены при других неврологических заболеваниях (Lee et al., 2006; Whittle et al., 2007; Chang et al., 2010). Считается доказанным, что кроме наиболее распространенной мутации G2019S по крайней мере еще пять мутаций определенно приводят к развитию аутосомно-доминантной формы БП: в 31 экзоне гена *LRRK2* нуклеотидные замены C4321T/C4321G/G4322A приводят к замене аргинина в 1441 положении на цистеин/глицин/гистидин (мутации R1441C/G/H), в 35 экзоне гена *LRRK2* нуклеотидная замена A5096G приводит к аминокислотной замене тирозина в 1699 положении на цистеин (Y1699C), в 41 экзоне гена *LRRK2* нуклеотидная замена T6059C приводит к аминокислотной за-

мене в тирозинкиназном домене *LRRK2* изолейцина на треонин (мутация I2020T) (Giasson, Van Deerlin, 2008; Lesage, Brice, 2009) (см. рис. 1). Все мутации расположены в функциональных доменах белка: ROC (R1441C/G/H), COR (Y1699C) и киназном (G2019S, I2020T) (см. рис.1). Мутации R1441C/G/H, Y1699C и I2020T оказались менее распространенными, чем G2019S, однако в ряде случаев их частота показывала сильные межпопуляционные различия. Так, неожиданно высокая частота мутации R1441G (16,4% и 4% среди семейных и спорадических форм БП, соответственно) была обнаружена среди популяции басков в Испании (Simón-Sánchez et al., 2006).

В России частота мутаций в гене *LRRK2* среди пациентов с БП оказалась сопоставима с данными, полученными в большинстве европейских популяций, где мутация G2019S обнаруживается в 5% случаев семейной БП и примерно в 0,6% спорадических случаев (Giasson, Van Deerlin, 2008; Pchelina et al., 2008; Greggio, 2012). Так, по нашим данным, частота *LRRK2*-ассоциированной БП среди семейных форм заболевания (8%) была значительно выше, чем среди спорадических случаев (1,3%). Наиболее распространенной являлась мутация G2019S (7% – среди семейной БП и 0,8% – среди спорадической) (Пчелина и др., 2006, 2011; Pchelina et al., 2006, 2008). Интересно отметить, что все выявленные носители мутации G2019S сообщали о происхождении, связанном с евреями ашкенази, что неудивительно, если принимать во внимание высокую частоту этой мутации среди данной популяции. Описанная нами новая замена тимина на цитозин в положении 4838, приводящая к замене валина на аланин в положении 1613 (V1613A), оказалась редкой причиной развития БП, поскольку была выявлена только в одной семье с аутосомно-доминантной формой БП (Pchelina et al., 2008). Мутация R1441C, являющаяся второй по распространенности (10% мутантных аллелей) в Европе, была выявлена нами у одного пациента со спорадической БП (Giasson, Van Deerlin, 2008; Pchelina et al., 2008).

Как было показано в ряде исследований, возраст начала заболевания при наличии мутаций в гене *LRRK2*, а также тяжесть его течения может варьировать у носителей одной и той же мутации даже в пределах одной семьи (Пчелина и др., 2011; Paisan-Ruiz et al., 2005). При сопоставлении осложнений при приеме препаратов Л-ДОФА между группами сравнения (пациенты с положительным ответом на терапию Л-ДОФА, принимающие препарат более пяти лет: 1) с мутацией G2019S и 2) с отсутствием мутаций в гене *LRRK2*) нами была выявлена повышенная частота побочных эффектов в группе с наследственной формой БП, обусловленной мутацией G2019S (Пчелина и др., 2011). Повышенная частота Л-ДОФА-индуцированных дискинезий при *LRRK2*-ассоциированной БП была выявлена также в работах зарубежных авторов (Lesage et al., 2008; Nishioka et al., 2010). Можно заключить, что БП, обусловленная мутацией G2019S *LRRK2*, характеризуется повышенной частотой осложнений при проведении терапии Л-ДОФА-содержащими препаратами.

Таким образом, очевидно, что в целях выявления наследственной аутосомно-доминантной формы БП в первую очередь может быть показано тестирование мутации G2019S *LRRK2* у пациентов с семейной формой заболевания. Данное тестирование может быть полезно в качестве дополнительного диагностического теста

для проведения дифференциальной диагностики с другими неврологическими заболеваниями, а также для проведения молекулярно-генетического обследования родственников пациентов с выявленной мутацией, что позволит выявить больных с БП на преклинической стадии заболевания. При проведении медико-генетического консультирования носителей мутации G2019S LRRK2 следует принимать во внимание зависимость от возраста пациента пенетрантность этой мутации, а также повышенный риск развития осложнений при проведении терапии Л-ДОФА.

3. Мутации в гене *LRRK2* и активность фермента

Начиная с момента описания первых мутаций в гене *LRRK2* в 2004 г. предпринят ряд попыток оценить влияние мутаций, выявляемых у пациентов с БП, на активность фермента. В отсутствие знаний о физиологическом субстрате LRRK2 для этой цели широко использовали способность LRRK2 к аутофосфорилированию. Независимыми группами исследователей описано несколько сайтов аутофосфорилирования, большинство из которых локализовано в ROC-домене (Greggio, 2012). Считается доказанным, что в физиологических условиях LRRK2 способна к гомодимеризации и проявляет функциональную активность как димер (см. рис.1) (Greggio et al., 2008). При этом, аутофосфорилирование может происходить в процессе формирования данной структуры и регулировать активность киназы. Необходимо, однако, отметить, что способность LRRK2 к аутофосфорилированию продемонстрирована в исследованиях *in vitro*. Использование специфичных антител не позволило выявить фосфорилированную форму LRRK2 в клеточных лизатах. Существует вероятность того, что оно протекает только в особых условиях, в частности, в условиях стресса, на что указывает обсуждаемое взаимодействие LRRK2 с МКК- (mitogen-activated protein kinase kinases) и JPs (JNK (c-JunN-terminal kinase)-interacting proteins) белками в условиях генерации клеточного стресса (Hsu et al., 2010). Несмотря на то что вопрос о протекании аутофосфорилирования *in vivo* остается открытым, оценка активности этого процесса была широко использована в экспериментах по исследованию влияния известных мутаций гена *LRRK2* на работу данной киназы. Однозначное повышение активности LRRK2 (по меньшей мере в три раза) было продемонстрировано только для мутации G2019S, расположенной в активной петле киназного домена (Greggio, Cookson, 2009). Данные об изменении киназной активности LRRK2 при наличии других мутаций R1441C/G/H, Y1699C, I2020T носят противоречивый характер (Smith et al., 2006; Jaleel et al., 2007; West et al., 2007).

Не до конца ясна взаимосвязь ГТФ-азной и киназной активностей LRRK2. В нескольких работах было показано, что мутации ГТФ-азного домена (R1441C/G/H) не позволяют ему связываться с ГТФ, снижают ГТФ-азную активность белка, значительно ослабляя при этом и киназную активность (Smith et al., 2006; Xiong et al., 2010). В то же время, имеются данные, свидетельствующие о том, что отсутствие связывания LRRK2 с ГТФ, ГДФ, ГМФ не влияет на ее киназную активность (Cookson, 2012). Противоречивость полученных данных, вероятно, связана с использованием в эксперименте различных субстратов.

В экспериментах *in vitro*, преимущественно использующих различные линии нейробластомы, также широко исследовалось влияние мутаций гена *LRRK2* на выживаемость и морфологию клеток (Macleod et al., 2006). Многократно показано, что в отличие от *LRRK2* дикого типа нейротоксический эффект наблюдается при экспрессии гена *LRRK2* со всеми патогенными мутациями, и для проявления этого эффекта необходимо наличие киназного домена (Cookson, 2012). Рядом независимых лабораторий подтверждено влияние мутаций в гене *LRRK2* на рост и ветвление нейрональных отростков. Наличие мутаций приводило к укорачиванию нейритов и уменьшению их числа (Macleod et al., 2006). Важно отметить, что индукция нейродегенерации в моделях *in vivo* при экспрессии мутантных форм *LRRK2* также зависела от киназной активности (Lee et al., 2010).

Простая интерпретация вышеприведенных результатов дает основание предположить, что ингибирование киназной или ГТФ-азной активности *LRRK2* будет снижать нейротоксичность, и что данный подход может быть перспективным при разработке нейропротекторных средств. В действительности все не так однозначно. Так, показано, что мутация Y1699C, расположенная в COR-домене белка, усиливает внутримолекулярное взаимодействие между доменами ROC:COR, приводя к ослаблению ROC:ROC-взаимодействия, необходимого для формирования активного димера *LRRK2*. В конечном итоге данная мутация приводит к более выраженной дестабилизации гомодимера *LRRK2*, снижению ГТФ-азной активности, чем мутации ГТФ-связывающего домена (R1441C/G/H), что в свою очередь может снижать и киназную активность фермента (Daniëls et al., 2011). Более того, было показано, что аминокислотная замена G2385R *LRRK2*, известный фактор риска развития спорадических форм БП, приводит к снижению киназной активности по сравнению с киназой дикого типа (Rudenko et al., 2012). До сих пор не ясно, как интерпретировать полученные результаты. По-видимому, в то время как киназная активность необходима для проявления нейротоксичности *LRRK2*, чрезмерное снижение активности также может приводить к повышению риска развития БП. Поэтому при разработке терапевтических средств, основанных на ингибировании активности *LRRK2*, нужно ожидать, что «окно» эффективности ингибиторов может оказаться достаточно узким. Необходимо отметить, что до сих пор не выяснено, способствуют ли патогенные мутации, выявляемые при БП, приобретению ферментом новых функций или потере активности (механизмы «gain-of-function» или «loss-of-function»). Описание физиологических субстратов *LRRK2* поможет существенно прояснить влияние патогенных мутаций на активность фермента и ее роли в патогенезе БП.

4. Влияние мутаций в гене *LRRK2* на агрегацию и метаболизм α -синуклеина

Как уже отмечалось выше, в настоящий момент считается, что агрегация белка α -синуклеина является центральным звеном патогенеза БП (Cookson, Bandmann, 2010). α -синуклеин является основным компонентом белковых агрегатов (телец Леви)

в дофаминергических нейронах черной субстанции у пациентов как с наследственными, так и со спорадическими случаями заболевания (Spillantini et al., 1997; Cookson, 2010). Для выяснения молекулярных механизмов патогенеза БП, обусловленной мутациями в гене *LRRK2*, представляется крайне важным ответить на вопрос о влиянии мутаций в гене *LRRK2* на метаболизм и агрегацию α -синуклеина, а также выяснить, является ли α -синуклеин субстратом данной киназы.

Известно, что фосфорилирование α -синуклеина может происходить по одному из пяти аминокислотных остатков (S87, Y125, S129, Y133, S136). Наиболее изученным является белок, фосфорилированный по серину в 129 положении (S-129). Фосфорилирование α -синуклеина S-129 усиливает формирование филаментов и олигомерных форм данного белка и преобладает в α -синуклеин-положительных тельцах Леви в нейронах черной субстанции у пациентов с БП (Fujiwara et al., 2002). Косвенным подтверждением возможного взаимодействия *LRRK2* и α -синуклеина является их колокализация в тельцах Леви (Alegre-Abarrategui et al., 2008; Vitte et al., 2010). Учитывая тот факт, что тельца Леви выявляются в аутоптатах мозга большинства пациентов с мутациями в гене *LRRK2*, можно было бы предполагать непосредственное участие *LRRK2* в фосфорилировании α -синуклеина. На сегодня всего в одном исследовании в условиях *in vitro* было показано, что лизат клеток, экспрессирующих ген *LRRK2*, обладает способностью фосфорилировать рекомбинантный α -синуклеин в положении S-129 (Qing et al., 2009). Коиммунопреципитация *LRRK2* и α -синуклеина из аутоптатов мозга пациентов с деменцией с тельцами Леви и из клеток НЕК 293 на фоне индукции окислительного стресса указывает на то, что эти два белка при стрессовых состояниях могут локализоваться в клетке в одних и тех же компартментах и участвовать в одних и тех же биологических процессах, а киназная активность *LRRK2* напрямую или косвенно может влиять на фосфорилирование α -синуклеина. Однако полученные авторами результаты не были подтверждены в ряде других исследований, выполненных как на клеточных культурах, так и на животных моделях при гиперэкспрессии гена *LRRK2* дикого типа, либо с мутацией G2019S, что, вероятно, указывает на неспособность *LRRK2* усиливать агрегацию α -синуклеина непосредственно за счет прямого фосфорилирования последнего. Таким образом, следует отметить, что до сих пор нет подтверждения прямого биохимического взаимодействия между α -синуклеином и *LRRK2* или прямого фосфорилирования α -синуклеина *LRRK2*. С другой стороны, нельзя исключить влияние *LRRK2* на метаболизм α -синуклеина путем участия этой киназы в процессах фосфорилирования белков, связанных с α -синуклеином. В частности, предполагается участие *LRRK2* в фосфорилировании белков-шаперонов семейства 14-3-3, взаимодействующих с α -синуклеином и участвующих в различных внутриклеточных процессах, включая транспорт и белковое взаимодействие (Dzambo et al., 2010; Nichols et al., 2010).

Альтернативно можно предположить опосредованное влияние *LRRK2* на агрегацию α -синуклеина. Подтверждением данной гипотезы могут служить результаты исследования (Lin et al., 2009), выполненного на трансгенных мышях. В результате данного исследования было обнаружено, что коэкспрессия гена *LRRK2* и

α -синуклеина с мутацией A53T в значительной степени ускоряет нейродегенеративные процессы в доза-зависимой манере независимо от генотипа гена *LRRK2*. Двойной трансген обнаруживал резкую гибель дофаминергических нейронов уже в возрасте 1 месяца, указывая на совместную роль α -синуклеина и *LRRK2* в нейродегенерации (Lin et al., 2009). Интересно, что ни одна модель на трансгенных мышцах с гиперэкспрессией гена *LRRK2* не демонстрировала возрастной нейродегенерации (Li et al., 2009).

В последнее время накапливается все больше доказательств вовлеченности как α -синуклеина, так и *LRRK2* в регуляцию одних и тех же клеточных процессов, в частности – в регуляции транспорта синаптических везикул в нейронах и динамики цитоскелета. Так, показано, что как α -синуклеин, так и *LRRK2* взаимодействует с мембранами синаптических везикул, участвуя в регуляции их эндоцитоза (Shin et al., 2008; Cookson, 2010). *LRRK2* также вовлечена в процесс регуляции сборки F-актина (филаменты основного белка цитоскелета актина), контролируя активности белков семейства эзрин, радиксин, миезин (ERM) посредством их фосфорилирования (Jaleel et al., 2007; Parisiadou et al., 2009). Предполагается участие *LRRK2* в регуляции стабильности микротрубочек. В клеточном экстракте мозга нокаутных по гену *Lrrk2* мышей показано повышение свободного тубулина (Gillardon, 2009). Напротив, в гомогенате мозга трансгенных по гену *LRRK2* с мутацией G2019S показано его снижение (Lin et al., 2009), что свидетельствует о стабилизирующей роли белка *LRRK2* в процессе сборки микротрубочек. *LRRK2* способна влиять на систему микротрубочек, также влияя на функциональную активность ассоциированного с микротрубочками белка тау. Фосфорилированный белок тау теряет эффективность связывания с микротрубочками и способность их стабилизации, приводя к нарушению аксонального транспорта. Накопление фосфорилированного τ -белка было обнаружено в линиях трансгенных мышей по гену *LRRK2* с мутациями G2019S, R1441G (Li et al., 2009; Lin et al., 2009; Melrose et al., 2010). Интересно отметить, что у трети пациентов с БП с мутациями в гене *LRRK2* в аутоптатах мозга обнаруживают тау-положительные включения в отсутствие телец Леви (Covy et al., 2009). При этом у большинства пациентов выявляются α -синуклеин-положительные включения, а у части пациентов белковые включения отсутствуют (Taymans, Cookson, 2010). Очевидно, что нейродегенерация клеток черной субстанции, обусловленная дисфункцией *LRRK2*, может происходить без образования белковых агрегатов. Эти наблюдения дают основание предполагать, что *LRRK2* функционирует в каскаде патологических событий «над» событиями, приводящими к агрегации того или иного белка и действует в качестве сигнальной молекулы, необходимой для транспорта органелл, сборки микротрубочек и стабильности клетки. Нарушение функции *LRRK2* может приводить к дестабилизации микротрубочек, и как результат – к нарушению транспорта α -синуклеин-ассоциированных везикул.

Нельзя также исключить опосредованного влияния *LRRK2* на агрегацию α -синуклеина путем нарушения клеточных процессов, влияющих на деградацию этого белка, а именно – убиквитин-протеосомную систему деградации белка (УПС) и аутофагию. Коэкспрессия α -синуклеина с заменой A53T, и *LRRK2* с заме-

ной G2019S у мышей приводила к нарушению активности УПС и усилению агрегации альфа-синуклеина (Lin et al., 2009). У мышей с нокаутом гена *Lrrk2* наблюдается нарушение процесса аутофагии, накопление α -синуклеина в почках (Tong et al., 2010). В исследованиях *in vitro* экспрессия гена *LRRK2* с мутацией R1441C вызывала нарушение аутофагии за счет накопления в клетке аутофагийных вакуолей, содержащих неполностью деградированный белковый материал (Alegre-Abarategui et al., 2009). Более того, гиперэкспрессия гена *LRRK2* с мутацией G2019S в клеточной линии нейробластомы SH-SY5Y не только приводила к увеличению количества аутофагийных вакуолей, но также к изменению морфологии нейритов (Plowey et al., 2008), что говорит о возможной взаимосвязи этих двух событий.

Обсуждаемые выше исследования, направленные на изучение влияния мутаций в гене *LRRK2* на агрегацию α -синуклеина, выполнены *in vitro* или на модельных животных. Широкое распространение мутаций гена *LRRK2* среди пациентов с семейной формой БП впервые дает возможность формирования группы пациентов с БП с однородной этиологией заболевания. В настоящее время опубликовано несколько исследований, где в качестве одной из групп сравнения обследована группа пациентов с мутациями в гене *LRRK2*. Так, лимфоциты крови пациентов с *LRRK2*-ассоциированной БП были исследованы с целью выявления нарушений в работе киназного каскада при этой форме заболевания (White et al., 2007). Нами проведено исследование по изучению уровня общего и олигомерного α -синуклеина в крови у пациентов с БП, обусловленной мутациями в гене *LRRK2*. Было показано снижение уровня общего α -синуклеина в группе с *LRRK2*-ассоциированной БП по сравнению с группой пациентов со спорадической формой БП и контролем, в то время как отличий в уровне олигомерного α -синуклеина выявлено не было (Пчелина и др., 2010; Andoskin et al., 2013). Выявленное нами снижение уровня α -синуклеина у пациентов с мутациями в гене *LRRK2* на фоне нормальной экспрессии гена *SNCA* позволяет предположить влияние не на уровне транскрипции гена, а на уровне белок-белковых взаимодействий. В частности, не исключено накопление фосфорилированной формы по S87 α -синуклеина. Отсутствие изменений в уровне олигомерного α -синуклеина в группе пациентов с БП с мутациями в гене *LRRK2* показано также группой исследователей (Gorostidi et al., 2012). Несколькими учеными не выявлено также повышения олигомерных форм α -синуклеина в плазме крови пациентов со спорадической формой БП неизвестной этиологии (Пчелина, 2011; Foulds et al., 2011; Park et al., 2011). Отсутствие изменений в уровне олигомерных форм α -синуклеина в клетках крови у пациентов с БП, и в частности у пациентов с мутациями в гене *LRRK2*, может объясняться ограниченным временем жизни клеток крови, проявлением иммунного ответа и клеточных компенсаторных механизмов.

В заключение следует отметить, что до настоящего времени остается неясным, как мутации в гене *LRRK2* влияют на метаболизм и агрегацию α -синуклеина, а также, является ли α -синуклеин вероятным субстратом данной киназы. Суммируя данные зарубежных исследователей и собственные результаты, можно предположить, что *LRRK2* работает на ранних этапах, в каскаде, регулирующем агрегацию α -синуклеина, и данные белки не взаимодействуют непосредственно.

5. Роль LRRK2 в иммунном ответе и индукции апоптоза

С момента описания в гене *LRRK2* мутаций, приводящих к развитию БП, в 2004 г. предпринимались многочисленные попытки выявить ассоциацию генетических вариантов этого гена с другими нейродегенеративными заболеваниями. Был исключен вклад генетических вариантов G2019S, I2020T, R1828P, G2385A, гена *LRRK2* в риск развития болезни Альцгеймера и бокового амиотрофического склероза (Lee et al., 2006; White et al., 2007; Chang et al., 2010). Несмотря на единичные сообщения об ассоциации полиморфизма R1628P гена *LRRK2* с болезнью Альцгеймера (Zhao et al., 2011; Li et al., 2013), долгое время казалось, что генетические нарушения в этом гене ассоциированы исключительно с БП. Неожиданной явилась связь полиморфизма гена *LRRK2* с рядом заболеваний, в патогенезе которых ключевую роль играет воспаление. Так, в двух независимых GWAS-исследованиях была выявлена ассоциация генетических вариантов гена *LRRK2* с воспалительными заболеваниями кишечника (болезнь Крона; язвенный колит), проказа, хроническое инфекционное заболевание, вызванное *Mycobacterium leprae* (Greggio et al., 2012).

В последние годы накапливается все больше данных об участии LRRK2 в генерации иммунного ответа, а также в процессах, регулирующих жизнедеятельность клеток, таких как апоптоз и аутофагия. При оценке уровня мРНК гена *LRRK2* в различных тканях человека наиболее высокая экспрессия гена выявляется в клетках иммунной системы, в особенности в макрофагах, В-клетках и дендритных клетках (Hakimi et al., 2011; Greggio et al., 2012). Предполагается, что экспрессия гена *LRRK2* индуцируется через стимуляцию INF- γ (Gardet et al., 2010). В то же время, повышенный уровень INF- γ , цитокина, координирующего работу различных генов иммунной системы, является важной особенностью болезни Крона (Schroder et al., 2004). Можно предположить, что повышенный уровень INF- γ , наблюдаемый при болезни Крона, приводит к индукции экспрессии гена *LRRK2*. Предполагают также, что LRRK2 может активировать ядерный транскрипционный фактор NF- κ B, который играет ключевую роль в иммунном ответе на инфекции и стабильно повышен в периферических мононуклеарных клетках при болезни Крона (Gardet et al., 2010). Таким образом, ряд исследований указывает, что при бактериальной инфекции увеличение экспрессии цитокина INF- γ активирует гены, участвующие в иммунном ответе, включая LRRK2. LRRK2, в свою очередь, активирует ядерный транскрипционный фактор NF- κ B, который координирует механизмы иммунного ответа (Greggio et al., 2012).

Другие интересные данные об участии LRRK2 в иммунном ответе были получены в исследовании, выполненном на мышцах с нокаутом гена *Lrrk2*. Данные мыши были более чувствительны к воспалительным заболеваниям, имели гиперактивный иммунный ответ и нарушение в работе транскрипционных факторов семейства NFAT, регулирующих врожденный иммунный ответ в макрофагах, нейтрофилах и дендритных клетках (Lui et al., 2011). При нокауте гена *Lrrk2*-/-NFAT1 локализовался у ядра, а при LRRK2 дикого типа (wt LRRK2) – в цитоплазме. Таким образом, результаты исследования предполагают, что LRRK2 ингибирует активацию NFAT1 за счет предотвращения перемещения NFAT1 из цитоплазмы в ядро. Таким образом,

было продемонстрировано, что у мышей *LRRK2* является негативным регулятором ядерного активатора Т-клеток (NFAT). Другими исследователями в активированной липополисахаридом первичной микроглии у R1441G *LRRK2* трансгенных мышей выявлена индукция воспаления наряду с увеличением экспрессии гена *LRRK2* и усилением секреции TNF- α (Gillardon et al., 2012). Показано также, что ингибирование *LRRK2* у мышей снижает высвобождение TNF- α микроглией, выявляя тот факт, что киназная активность в популяции этих клеток может играть важную роль в процессе воспаления (Moehle et al., 2012). Вышесказанное предполагает, что нарушение функции *LRRK2* у пациентов с БП может приводить к активации микроглии и индукции воспаления. При этом остается вопрос о том, что первично: эффект мутаций в гене *LRRK2*, который наблюдается непосредственно в дофаминергических нейронах мозга, или изначально мутации индуцируют воспаление, а нейротоксический эффект опосредован?

Изучение функций *LRRK2* в клетках осложняется отсутствием представлений о физиологических субстратах этой киназы. Недавние исследования, выполненные на нейрональных клеточных линиях, позволяют предположить, что мутации в гене *LRRK2*, выявляемые при наследственных формах БП, могут активировать апоптоз, однако вопрос о пути активации апоптоза остается открытым (Iaccarino et al., 2007; Ho et al., 2009; Milosevic et al., 2009). В исследовании *in vitro*, было продемонстрировано взаимодействие *LRRK2* с белком FADD (Fas-associated death domain) в нейрональной культуре клеток. В лизатах головного мозга у пациентов с БП, ассоциированной с мутациями в гене *LRRK2*, показана активация каспазы 8, которая приводит к аутопротеолитическому расщеплению фермента на небольшие субъединицы и последующей индукции внешнего пути апоптоза (Ho et al., 2009). С другой стороны, в экспериментах *in vitro* было показано, что экспрессия мутантной *LRRK2* (мутация G2019S) вызывает гибель клеток путем индукции внутреннего пути апоптоза за счет высвобождения цитохрома с в цитоплазму (Iaccarino et al., 2007). Предполагается, что *LRRK2* может связываться с мембраной митохондрии и, в случае мутации в гене *LRRK2* приводить к нарушению работы митохондрий (Vila et al., 2008). Интересно, что чувствительность нейрональных клеточных линий к апоптозу меняется при экспрессии мутантной формы *LRRK2* с мутацией I2020T, расположенной, так же как и мутация G2019S, в киназном домене белка (Ohta et al., 2010). Неясно, насколько важно наличие киназной активности *LRRK2* в регуляции апоптоза. Мыши, нокаутные по гену *Lrrk2*, обнаруживают активацию апоптоза (Tong et al., 2010). Все цитируемые выше исследования о влиянии *LRRK2* на индукцию апоптоза получены на животных моделях паркинсонизма или в экспериментах *in vitro*.

Нами впервые проведено исследование по оценке уровня апоптоза (включая оценку уровня экспрессии генов *FAS*, *BCL2*) лимфоцитов крови у пациентов с БП, имеющих мутации в гене *LRRK2* (мутации G2019S, V1613A) и выявлено усиление спонтанного апоптоза по сравнению с контролем. Повышенный апоптоз лимфоцитов периферической крови у пациентов с *LRRK2*-ассоциированной БП наряду с увеличением уровня мРНК *FAS* дает основание предположить активацию внешне-го пути апоптоза при наличии мутации гена *LRRK2*. Наши наблюдения индукции

апоптоза лимфоцитов и повышении уровня мРНК гена *FAS* у пациентов с БП, имеющих мутации в гене *LRRK2*, не позволяют говорить о прямом или опосредованном участии данной киназы в индукции апоптоза. Предполагается, что выявляемые изменения могут отражать индукцию апоптоза в нейронах мозга.

Анализ литературных данных показывает, что наличие мутации в гене *LRRK2* могут также оказывать влияние на процесс аутофагии. Гиперэкспрессия мутантного гена (мутация G2019S) приводила к накоплению аутофагосом в нейрональных клеточных линиях (White et al., 2007). Для другой мутации R1441C показано также, что гиперэкспрессия мутантного гена *LRRK2* приводит к блокированию аутофагии, в результате происходит накопление больших аутофагосом, содержащих неположительно деградированный материал (Plowey et al., 2008). Таким образом, можно сделать предположение о том, что *LRRK2* регулирует аутофагически-лизосомальный клиренс как в нейронах, так и в других типах клеток, поскольку мутации в данном гене неизбежно приводят к нарушению аутофагии (Gómez-Suaga et al., 2012). Необходимо отметить, что нарушения аутофагии, приводящие к повреждению различных органелл клетки, в частности митохондрий, может также способствовать индукции апоптотической гибели клеток.

Появляющаяся информация о связи нарушений в гене *LRRK2* с развитием злокачественных опухолей, в основном груди и простаты, в меньшей степени почек и легких, косвенно подтверждает возможность вовлеченности *LRRK2* в регуляцию иммунного ответа и контроль пролиферации и гибели клеток. Недавние исследования соматического рака выявили, что мутация G2019S, приводящая к усилению киназной активности *LRRK2*, приводит к усилению роста клеток и как следствие – усиливает вероятность развития злокачественных опухолей (Saunders-Pullman et al., 2010). *LRRK2* принадлежит к семейству Roco белков и содержит Ras-родственный ГТФ-аный домен и характерный COR-домен. Интересно, что два других белка из семейства Roco, *DAPK1* и *MFHAS1*, вовлечены в патогенез рака (Bandmann, Cookson, 2012).

Совокупность вышеприведенных данных позволяет рассматривать *LRRK2* как один из вероятных регуляторов иммунного ответа. По нашим данным, нарушение работы *LRRK2* может приводить к увеличению экспрессии гена *FAS* и как следствие – к индукции внешнего пути апоптоза. В то же время, *LRRK2* влияет на индукцию другого проапоптотического рецептора – TNF. Таким образом, регулируя индукцию основных проапоптотических рецепторов, *LRRK2* может оказывать влияние на процесс воспаления путем активации апоптоза – основного механизма регуляции жизнедеятельности клеток иммунной системы. Также было показано, что дисфункция *LRRK2* приводит к нарушению аутофагии, что также может индуцировать апоптотическую гибель клеток.

6. Заключение

Исследование спектра мутаций в гене *LRRK2* среди пациентов с семейной формой БП в Северо-Западном регионе России показало, что в гене имеется мажор-

ная мутация (G2019S), выявляемая в 7% случаев семейной формы заболевания и в 0,8% – спорадической. Таким образом, для выявления наследственной аутосомно-доминантной формы БП показано тестирование мутации G2019S LRRK2 у пациентов с семейной формой заболевания в качестве дополнительного диагностического теста. Молекулярно-генетическое обследование родственников пациентов с выявленной мутацией позволит выявить больных с данной наследственной формой БП на преклинической стадии заболевания.

С момента открытий мутаций в гене *LRRK2*, приводящих к развитию наследственных форм БП, прошло почти десять лет, однако до настоящего времени функции *LRRK2* однозначно не определены. Высказывается предположение, что трудности выявления субстратов этой киназы могут быть связаны с потерей ее функций, связанных с киназной активностью в процессе эволюции, либо с ее предпочтительной индукцией в особых условиях стресса. Альтернативно можно предположить, что в физиологических условиях, возможно в условиях стресса, киназная активность *LRRK2* проявляется в аутофосфорилировании и необходима исключительно для формирования стабильного димера *LRRK2*.

Исследования последних лет указывают на возможное участие *LRRK2* в иммунном ответе. Кроме того, предполагается, что дисфункция *LRRK2*, обусловленная патогенными мутациями, приводящими к БП, может влиять на ряд клеточных процессов, таких как апоптоз, аутофагия, динамика цитоскелета (рис. 2). В отсутствие знаний о физиологических субстратах *LRRK2* трудно сделать окончательный вывод о влиянии мутаций в гене *LRRK2* на механизмы нейродегенерации.

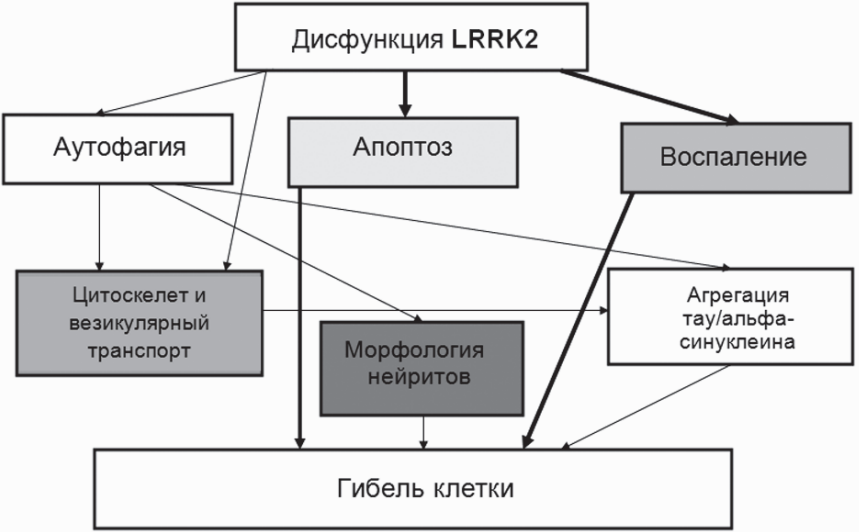


Рис. 2. Возможные пути влияния мутаций в гене *LRRK2* на механизмы клеточной гибели, приводящие к развитию БП

Толщина стрелок отображает предполагаемую интенсивность влияния нарушений в работе *LRRK2* на различные физиологические процессы

Наблюдаемые нарушения в росте нейритов, аксональном транспорте и динамике цитоскелета при наличии патогенных мутаций могут объяснять связь мутаций в гене *LRRK2* с селективной гибелью дофаминергических нейронов, наблюдаемой при БП. При этом анализ данных литературы и результаты собственных исследований позволяют высказать предположение об отсутствии прямого влияния мутаций в гене *LRRK2* на агрегацию α -синуклеина, в то же время указывая на возможное участие *LRRK2* в процессах, контролирующей жизнедеятельность клеток, таких как аутофагия и апоптоз. Вероятно, при БП *LRRK2* функционирует в патологическом каскаде «над» событиями, приводящими к агрегации α -синуклеина, и нарушение функции последнего может происходить вследствие влияния мутантной *LRRK2* на цитоскелет и транспорт синаптических везикул (см. рис. 2), с которыми в нейроне ассоциировано до 50% α -синуклеина. Для прояснения влияния *LRRK2* на механизмы нейродегенерации при БП важно получить представление – как мутации гена *LRRK2* влияют на активность, что затруднительно сегодня в отсутствие представления о физиологическом субстрате данной киназы.

Литература

- Иллариошкин С.Н. Конформационные болезни мозга. М.: Янус-К, 2002. 246 с.
- Пчелина С.Н. Альфа-синуклеин как биомаркер болезни Паркинсона // Анналы клинической и экспериментальной неврологии. 2011. № 6. Р. 46-51.
- Пчелина С.Н., Иванова О.Н., Емельянов А.К., Якимовский А.Ф., Шварцман А.Л. Мутации в гене *LRRK2* у больных с болезнью Паркинсона в России // Медицинская генетика. 2006. Вып. 5. № 2. Р. 48-51.
- Пчелина С.Н., Емельянов А.К., Якимовский А.Ф. и др. Сниженный уровень альфа-синуклеина в лейкоцитах периферической крови у пациентов с *LRRK2*-ассоциированной болезнью Паркинсона // Бюлл. эксперим. биол. мед. 2010. Вып. 150. № 12. Р. 619-621.
- Пчелина С.Н., Иванова О.Н., Емельянов А.К., Якимовский А.Ф. Клиническое течение *LRRK2*-ассоциированной болезни Паркинсона // Журнал невр. и псих. им. С.С. Корсакова. 2011. Вып. 111. № 12. Р. 56-62.
- Шадрина М.И., Сломинский П.А. Значение митохондриальной дисфункции и окислительных повреждений в молекулярной патологии болезни Паркинсона // Молекулярная биология. 2008. Вып. 42. № 5. Р. 809-819.
- Alegre-Abarrategui J., Ansorge O., Esiri M., Wade-Martins R. *LRRK2* is a component of granular alpha-synuclein pathology in the brainstem of Parkinson's disease // Neuropathol. Appl. Neurobiol. 2008. Vol. 34. № 3. Р. 272-283.
- Alegre-Abarrategui J., Christian H., Lufino M. et al. *LRRK2* regulates autophagic activity and localizes to specific membrane microdomains in a novel human genomic reporter cellular model // Hum. Mol. Gen. 2009. Vol. 18. № 21. Р. 4022-4034.
- Andoskin P. A., Emelyanov A. K., Yakimovsky A. F., Timofeeva A. A., Pchelina S. N. Oligomeric alpha-synuclein levels in blood plasma in *LRRK2* – linked Parkinson's disease // J. Hum. Gen. 2013. Vol. 21 (Supplement 2). Р. 513.
- Bandmann O., Cookson M. R. Parkinson disease, cancer, and *LRRK2*: causation or association? // Neurology. 2012. Vol. 78. № 11. Р. 772-773.
- Bekris L. M., Mata I. F., Zabetian C. P. The genetics of Parkinson's disease // J. Geriatr. Psychiatry. Neurol. 2010. Vol. 23. Р. 228-242.
- Chang T. Y., Kuo H. C., Lu C. S., Wu-Chou Y. H., Huang C. C. Analysis of the *LRRK2* Gly2385Arg variant in Alzheimer's disease in Taiwan // Parkinsonism Relat Disord. 2010. Vol. 1. Р. 28-30.

- Cookson M.R.* The role of leucine-rich repeat kinase 2 (LRRK2) in Parkinson's disease // *Nat. Rev. Neurosci.* 2010. Vol. 11. № 12. P. 791-797.
- Cookson M.R.* Cellular effects of LRRK2 mutations // *Biochem. Soc. Trans.* 2012. Vol. 40. № 5. P. 1070-1073.
- Cookson M.R., Bandmann O.* Parkinson's disease: insights from pathways // *Hum. Mol. Genet.* 2010. Vol. 19. № R1. P. R21-27.
- Covy J.P., Yuan W., Waxman E.A. et al.* Clinical and pathological characteristics of patients with leucine-rich repeat kinase-2 mutations // *Mov. Disord.* 2009. Vol. 24. № 1. P. 32-39.
- Daniëls V., Vancraenenbroeck R., Law B.M. et al.* Insight into the mode of action of the LRRK2 Y1699C pathogenic mutant // *J. Neurochem.* 2011. Vol. 116. № 2. P. 304-315.
- Dzamko N., Deak M., Hentati F., Reith A.D. et al.* Inhibition of LRRK2 kinase activity leads to dephosphorylation of Ser(910)/Ser(935), disruption of 14-3-3 binding and altered cytoplasmic localization // *Biochem. J.* 2010. Vol. 430. № 3. P. 405-413.
- Fujiwara H., Hasegawa M., Dohmae N. et al.* Alpha-Synuclein is phosphorylated in synucleinopathy lesions // *Nat. Cell. Biol.* 2002. Vol. 4. № 2. P. 160-164.
- Foulds P.G., Mitchell J.D., Parker A. et al.* Phosphorylated α -synuclein can be detected in blood plasma and is potentially a useful biomarker for Parkinson's disease // *FASEBJ.* 2011. Vol. 25. № 12. P. 4127-37.
- Funayama M., Hasegawa K., Kowa H., Saito M., Tsuji S., Obata F.* A new locus for Parkinson's disease (PARK8) maps to chromosome 12p11.2-p13.1 // *Ann. Neurol.* 2002. Vol. 51. P. 296-301.
- Fung H.C., Chen C.M., Hardy J. et al.* Lack of G2019S LRRK2 mutation in a cohort of Taiwanese with sporadic Parkinson's disease // *Mov. Disord.* 2006. Vol. 21. P. 880-881.
- Gardet A., Benita Y., Li C., Sands B.E. et al.* LRRK2 is involved in the IFN-gamma response and host response to pathogens // *J. Immunol.* 2010. Vol. 185. № 9. P. 5577-5585.
- Giasson B.I., Van Deerlin V.M.* Mutations in LRRK2 as a Cause of Parkinson's disease // *Neurosignals.* 2008. Vol. 16. P. 99-105.
- Gillardon F.* Leucine-rich repeat kinase 2 phosphorylates brain tubulin-beta isoforms and modulates microtubule stability – a point of convergence in parkinsonian neurodegeneration? // *J. Neurochem.* 2009. Vol. 110. № 5. P. 1514-1522.
- Gillardon F., Schmid R., Draheim H.* Parkinson's disease-linked leucine-rich repeat kinase 2(R1441G) mutation increases proinflammatory cytokine release from activated primary microglial cells and resultant neurotoxicity // *Neuroscience.* 2012. Vol. 208. P. 41-48.
- Gómez-Suaga P., Fdez E., BlancaRamírez M., Hilfiker S.* A link between autophagy and the pathophysiology of LRRK2 in Parkinson's disease // *Parkinson's Dis.* 2012, P. 324521.
- Gorostidi A., Bergareche A., Ruiz-Martínez J. et al.* α -synuclein levels in blood plasma from LRRK2 mutation carriers // *PLoS One.* 2012. Vol. 7. № 12. P. e52312.
- Greggio E.* Role of LRRK2 kinase activity in the pathogenesis of Parkinson's disease // *Biochem. Soc. Trans.* 2012. Vol. 40. № 5. P. 1058-1062.
- Greggio E., Cookson M.R.* Leucine-rich repeat kinase 2 mutations and Parkinson's disease: three question // *ASN Neuro.* 2009. Vol. 1. № 1. P. pii: e00002.
- Greggio E., Zambrano I., Kaganovich A. et al.* The Parkinson disease-associated leucine-rich repeat kinase 2 (LRRK2) is a dimer that undergoes intramolecular autophosphorylation // *J. Biol. Chem.* 2008. Vol. 283. P. 16906-16914.
- Greggio E., Civiero L., Bisaglia M., Bubacco L.* Parkinson's disease and immune system: is the culprit LRRK2 in the periphery? // *J. Neuroinflammation.* 2012. Vol. 9. P. 94.
- Hakimi M., Selvanantham T., Swinton E. et al.* Parkinson's disease-linked LRRK2 is expressed in circulating and tissue immune cells and upregulated following recognition of microbial structures // *J. Neural. Transm.* 2011. Vol. 118. № 5. P. 795-808.
- Hardy J.* Genetics analysis of pathways to Parkinson's disease. *Neuron.* 2010. Vol. 68. P. 201-206.
- Ho C.C., Rideout H.J., Ribe E., Troy C.M., Dauer W.T.* The Parkinson disease protein leucine-rich repeat kinase 2 transduces death signals via Fas-associated protein with death domain and caspase-8 in a cellular model of neurodegeneration // *J. Neurosci.* 2009. Vol. 29. № 4. P. 1011-1016.
- Hsu C.H., Chan D., Wolozin B.* LRRK2 and the stress response: interaction with MKKs and JNK-interacting proteins // *Neurodegener. Dis.* 2010. Vol. 7. № 1-3. P. 68-75.

- Iaccarino C., Crosio C., Vitale C., Sanna G., Carri M.T., Barone P. Apoptotic mechanisms in mutant LRRK2-mediated cell death // *Hum. Mol. Genet.* 2007. Vol. 16. № 11. P. 1319-1326.
- Jaleel M., Nichols R. J., Deak M. et al. LRRK2 phosphorylates moesin at threonine-558: characterization of how Parkinson's disease mutants affect kinase activity // *Biochem. J.* 2007. Vol. 405. P. 307-317.
- Lee E., Hui S., Ho G., Tan E.K., Chen C.P. LRRK2 G2019S and I2020T mutations are not common in Alzheimer's disease and vascular dementia // *Am. J. Med. Genet. B Neuropsychiatr. Genet.* 2006. Vol. 141B. № 5. P. 549-550.
- Lee B.D., Shin J.H., VanKampen J. et al. Inhibitors of leucine-rich repeat kinase-2 protect against models of Parkinson's disease // *Nat. Med.* 2010. Vol. 16. № 9. P. 998-1000.
- Lesage S., Brice A. Parkinson's disease: from monogenic forms to genetic susceptibility factors // *Hum. Mol. Genet.* 2009. Vol. 18. № R1. P. R48-5.
- Lesage S., Dürr A., Tazir M., Lohmann E. et al. French Parkinson's Disease Genetics Study Group. LRRK2 G2019S as a cause of Parkinson's disease in North African Arabs // *New Engl. J. Med.* 2006. Vol. 354. P. 422-423.
- Lesage S., Belarbi S., Troiano A. et al. Is the common LRRK2 G2019S mutation related to dyskinesias in North African Parkinson disease? // *Neurology.* 2008. Vol. 71. № 19. P. 1550-1552.
- Levy O.A., Malagelada C., Greene L.A. Cell death pathways in Parkinson's disease: proximal triggers, distal effectors, and final steps // *Apoptosis.* 2009. Vol. 14. № 4. P. 478-500.
- Li Y., Liu W., Oo T.F., Wang L. et al. Mutant LRRK2 (R1441G) BAC transgenic mice recapitulate cardinal features of Parkinson's disease // *Nat. Neurosci.* 2009. Vol. 12. № 7. P. 826-828.
- Li H.L., Lu S.J., Sun Y.M., Guo Q.H., Sadovnick A.D., Wu Z.Y. The LRRK2 R1628P variant plays a protective role in Han Chinese population with Alzheimer's disease // *CNS Neurosci. Ther.* 2013. Vol. 19. № 4. P. 207-215.
- Lin X., Parisiadou L., Gu X.L. et al. Leucine-rich repeat kinase 2 regulates the progression of neuropathology induced by Parkinson's-disease-related mutant alpha-synuclein // *Neuron.* 2009. Vol. 64. № 6. P. 807-827.
- Liu Z., Lee J., Krummey S., Lu W., Cai H., Lenardo M.J. The kinase LRRK2 is a regulator of the transcription factor NFAT that modulates the severity of inflammatory bowel // *Nat. Immunol.* 2011. Vol. 12. № 11. P. 1063-1070.
- Macleod D., Dowman J., Hammond R., Leete T., Inoue K., Abeliovich A. The familial Parkinsonism gene LRRK2 regulates neurite process morphology // *Neuron.* 2006. Vol. 52. № 4. P. 587-593.
- Melrose H.L., Dächsel J.C., Behrouz B. et al. Impaired dopaminergic neurotransmission and microtubule-associated protein tau alterations in human LRRK2 transgenic mice // *Neurobiol. Dis.* 2010. Vol. 40. № 3. P. 503-517.
- Milosevic J., Schwarz S.C., Ogunlade V. et al. Emerging role of LRRK2 in human neural progenitor cell cycle progression, survival and differentiation // *Mol. Neurodegener.* 2009. Vol. 4. P. 25.
- Mizushima N., Levine B., Cuervo A.M., Klionsky D.J. Autophagy fights disease through cellular self-digestion // *Nature.* 2008. Vol. 451. № 7182. P. 1069-1075.
- Moehle M.S., Webber P.J., Tse T. et al. LRRK2 inhibition attenuates microglial inflammatory responses // *J. Neurosci.* 2012. Vol. 32. № 5. P. 1602-1611.
- Nichols R.J., Dzamko N., Morrice N.A. et al. 14-3-3 binding to LRRK2 is disrupted by multiple Parkinson's disease-associated mutations and regulates cytoplasmic localization // *Biochem. J.* 2010. Vol. 430. № 3. P. 393-404.
- Nishioka K., Kefi M., Jasinska-Myga B. et al. A comparative study of LRRK2, PINK1 and genetically undefined familial Parkinson's disease // *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry.* 2010. Vol. 81. № 4. P. 391-395.
- Ohta E., Kubo M., Obata F. Prevention of intracellular degradation of I2020T mutant LRRK2 restores its protectivity against apoptosis // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2010. Vol. 391. № 1. P. 242-247.
- Ozelius L.J., Senthil G., Suanders-Pullman R. et al. LRRK2 G2019S as a cause of Parkinson's disease in Ashkenazi Jewish // *New Engl. J. Med.* 2006. Vol. 354. P. 424-425.
- Paisan-Ruiz C., Jain S., Evans E.W. et al. Cloning of the gene containing mutations that cause PARK8-linked Parkinson's disease // *Neuron.* 2004. Vol. 44. P. 595-600.
- Paisan-Ruiz C., Lang A.E., Kawarai T. et al. LRRK2 gene in Parkinson's disease: mutation analysis and case control association study // *Neurology.* 2005. Vol. 65. № 5. P. 696-700.

- Parisiadou L., Xie C., Cho H.J. et al. Phosphorylation of ezrin/radixin/moesin proteins by LRRK2 promotes the rearrangement of actin cytoskeleton in neuronal morphogenesis // *J. Neurosci.* 2009. Vol. 29. № 44. P. 13971-13980.
- Park M.J., Cheon S.M., Bae H.R., Kim S.H., Kim J.W. Elevated levels of α -synuclein oligomer in the cerebrospinal fluid of drug-naïve patients with Parkinson's disease // *J. Clin. Neurol.* 2011. Vol. 7. № 4. P. 215-22
- Pchelina S.N., Yakimovskii A.F., Ivanova O.N. et al. G2019S LRRK2 Mutation in Familial and Sporadic Parkinson's Disease in Russia // *Mov. Disord.* 2006. Vol. 21. № 12. P. 2234-2236.
- Pchelina S.N., Yakimovskii A.F., Emelyanov A.K. et al. Screening for LRRK2 Mutations in Patients with Parkinson's Disease in Russia: Identification of a Novel LRRK2 Variant // *Eur. J. Neurol.* 2008. Vol. 5. P. 692-696.
- Plowey E.D., Cherra S.J. 3rd, Liu Y.J., Chu C.T. Role of autophagy in G2019S-LRRK2-associated neurite shortening in differentiated SH-SY5Y cells // *J. Neurochem.* 2008. Vol. 105. № 3. P. 1048-1056.
- Qing H., Wong W., McGeer E.G., McGeer P.L. Lrrk2 phosphorylates alpha synuclein at serine 129: Parkinson disease implications // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2009. Vol. 387. № 1. P. 149-152.
- Rudenko I.N., Kaganovich A., Hauser D.N. et al. The G2385R variant of leucine-rich repeat kinase 2 associated with Parkinson's disease is a partial loss-of-function mutation // *Biochem. J.* 2012. Vol. 446. № 1. P. 99-111.
- Saunders-Pullman R., Barrett M.J., Stanley K.M. et al. LRRK2 G2019S mutations are associated with an increased cancer risk in Parkinson disease // *Mov. Disord.* 2010. Vol. 25. № 15. P. 2536-2541.
- Schroder K., Hertzog P.J., Ravasi T., Hume D.A. Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions // *J. Leukoc. Biol.* 2004. Vol. 75. № 2. P. 163-189.
- Shin N., Jeong H., Kwon J. et al. LRRK2 regulates synaptic vesicle endocytosis // *Exp. Cell. Res.* 2008. Vol. 314. № 10. P. 2055-2065.
- Shulman J.M., DeJager P.L., Feany M.B. Parkinson's disease: Genetics and Pathogenesis // *Ann. Rev. Pathol. Mech.* 2011. Vol. 6. P. 193-222.
- Simón-Sánchez J., Martí-Massó J.F., Sánchez-Mut J.V. et al. Parkinson's disease due to the R1441G mutation in Dardarin: a founder effect in the Basques // *Mov. Disord.* 2006. Vol. 21. № 11. P. 1954-1959.
- Smith W.W., Pei Z., Jiang H. et al. Kinase activity of mutant LRRK2 mediates neuronal toxicity // *Nat. Neurosci.* 2006. Vol. 9. P. 1231-1233.
- Spillantini M.G., Schmidt M.L., Lee V.M.Y. et al. Alpha-synuclein in Lewy bodies // *Nature.* 1997. Vol. 388. P. 839-840.
- Tan E.K., Shen H., Tan L.C. et al. Lack of G2019S LRRK2 mutation in a cohort of Taiwanese with sporadic Parkinson's disease // *Neurosci. Lett.* 2005. Vol. 384. № 3. P. 327-329.
- Taymans J., Cookson M.R. Mechanisms in dominant parkinsonism: The toxic triangle of LRRK2, alpha-synuclein, and tau // *BioEssays.* 2010. Vol. 32. P. 227-235.
- Tong Y., Yamaguchi H., Giaime E. et al. Loss of leucine-rich repeat kinase 2 causes impairment of protein degradation pathways, accumulation of alpha-synuclein, and apoptotic cell death in aged mice // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2010. Vol. 107. № 21. P. 9879-9884.
- Vila M., Ramonet D., Perier C. Mitochondrial alterations in Parkinson's disease: new clues // *J. Neurochem.* 2008. Vol. 107. № 2. P. 317-328.
- Vitte J., Traver S., Maues De Paula A. et al. Leucine-rich repeat kinase 2 is associated with the endoplasmic reticulum in dopaminergic neurons and accumulates in the core of Lewy bodies in Parkinson disease // *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 2010. Vol. 69. № 9. P. 959-972.
- West A.B., Moore D.J., Choi C. et al. Parkinson's disease-associated mutations in LRRK2 link enhanced GTP-binding and kinase activities to neuronal toxicity // *Hum. Mol. Genet.* 2007. Vol. 16. P. 223-232.
- White L.R., Toft M., Kvam S.N., Farrer M.J., Aasly J.O. MAPK-pathway activity, Lrrk2 G2019S, and Parkinson's disease // *J. Neurosci. Res.* 2007. Vol. 85. P. 1288-1294.
- Whittle A.J., Ross O.A., Naini A. et al. Pathogenic Lrrk2 substitutions and Amyotrophic lateral sclerosis // *J. Neural. Transm.* 2007. Vol. 114. № 3. P. 327-329.
- Xiong Y., Coombes C.E., Kilaru A. et al. GTPase activity plays a key role in the pathobiology of LRRK2 // *PLoS Genet.* 2010. Vol. 6. № 4. P.e1000902.

- Zhao Y., Ho P., Yih Y. et al.* LRRK2 variant associated with Alzheimer's disease // *Neurobiol. Aging.* 2011. Vol. 32. № 11. P. 1990-1993.
- Zimprich A., Biskup S., Leitner P. et al.* 2004. Mutations in LRRK2 cause autosomal-dominant parkinsonism with pleomorphic pathology // *Neuron.* 2004. Vol. 44. P. 601-607.

Молекулярно-генетическое изучение болезни Паркинсона в Республике Башкортостан

И.М. Хидиятова, И.Р. Гилязова, Г.Н. Ахмадеева, А.Р. Байтимеров, Р.В. Магжанов, Э.К. Хуснутдинова

Болезнь Паркинсона (БП) – прогрессирующее нейродегенеративное заболевание, частота которого среди лиц старше 55 лет составляет ~2% (Hardy et al., 2006). В популяциях мира распространенность БП составляет 60–187 на 100 000 населения (Голубев и др., 2000), в Республике Башкортостан – 68,6 на 100 000; частота семейных форм БП – 5,95%, что в значительной степени соответствует среднемировым показателям.

В основе БП лежат дегенеративные изменения, в основном в дофаминергических нейронах черной субстанции ствола головного мозга, и снижение поступления в них двигательного нейромедиатора дофамина. Дефицит дофамина в стриатуме приводит к нарушению функционирования подкорково-корковых систем мозга, регулирующих двигательные функции, и проявляется в виде сочетания гипокинезии с ригидностью и/или тремором покоя и, в более поздней стадии, – с постуральной неустойчивостью. Главным патогенетическим механизмом гибели дофаминергических нейронов считается повышенный уровень апоптоза, обусловленный развитием в клетках окислительного стресса. Ключевую роль в развитии окислительного стресса, ведущего к нейродегенерации, играют митохондриальная дисфункция (блокада митохондриального комплекса I) и нарушение внутриклеточной убиквитин-зависимой деградации поврежденных белков, приводящие к накоплению в клетках свободных радикалов, источниками которых могут являться различные эндогенные и экзогенные нейротоксины (Bekris et al., 2010).

В большинстве случаев БП носит спорадический характер и имеет многофакторную природу с определенной генетической предрасположенностью, но существуют и моногенные формы заболевания. В настоящее время картировано 13 генных локусов, связанных с отдельными наследственными формами БП, отличающимися по типу наследования, возрасту манифестации и характеру прогрессирования заболевания; в одиннадцати из них идентифицированы гены (табл. 1). Для выяснения роли генетических факторов в развитии спорадической БП активно исследуются как гены-кандидаты, продукты которых могут быть задействованы в различных звеньях патогенеза заболевания, так и гены, выявленные на основе полногеномного анализа ассоциаций БП (GWAS) с сотнями тысяч маркеров – однонуклеотидных полиморфных вариантов ДНК (SNP) (Nalls et al., 2011). В настоящее время в электронной базе данных по генетике БП представлены результаты 880 исследований, включающих анализ 915 генов и 3446 их полиморфных локусов, а также 889 мета-анализов, подтвердивших ассоциацию 20 генных локусов со спорадической фор-

Сокращения: БП – болезнь Паркинсона; РБ – Республика Башкортостан; GWAS – полногеномный анализ ассоциаций; SNP – однонуклеотидные полиморфные варианты ДНК.

Гены наследственных форм болезни Паркинсона

Ген (локус)	Хромосомная локализация	Тип наследования	Ссылка
<i>SNCA (PARK1/PARK4)</i>	4q21	АД	Polymeropoulos et al., 1997 Singleton et al., 2003
<i>Parkin (PARK2)</i>	6q25	АР	Kitada et al., 1998
<i>PARK3</i>	2p13	АД	Gasser, 1998
<i>UCH-L1 (PARK5)</i>	4p14	АД	Leroy et al., 1998
<i>PINK1 (PARK6)</i>	1p35-36	АР	Valente et al., 2004
<i>DJ-1 (PARK7)</i>	1p36	АР	Bonifati et al., 2003
<i>LRRK2 (PARK8)</i>	12q12	АД	Paisan-Ruiz et al., 2004 Zimprich et al., 2004
<i>ATP13A2 (PARK9)</i>	1p36	АР	Ramirez et al., 2006
<i>PARK10</i>	1p32	–	Hicks et al., 2002
<i>GIGYF2 (PARK11)</i>	2q36-37	–	Pankratz et al., 2003, 2009 Lautier et al., 2008
<i>PARK12</i>	Xq21-25	–	Pankratz et al., 2003
<i>Omi/HtrA2 (PARK13)</i>	2p12	АД	Strauss et al., 2005
<i>PLA2G6 (PARK14)</i>	22q12-13	АР	Paisan-Ruiz et al., 2010
<i>FBXO7 (PARK15)</i>	22q12-13	АР	Shojaee et al., 2008

мой БП (<http://www.pdgene.org/>). В результате GWAS были выявлены хромосомные области, содержащие определенные варианты SNP, с высоким уровнем статистической значимости, ассоциированные с болезнью Паркинсона (Satake et al., 2009; Simon-Sanchez et al., 2009; Edwards et al., 2010). По данным метаанализа результатов GWAS, проведенного Международным консорциумом по геномным исследованиям БП, с данным заболеванием ассоциированы полиморфные варианты 11 генов (*SNCA*, *MAPT*, *BST1*, *HLA-DRB5*, *LRRK*, *CCD62(HIP1R)*, *CYT11*, *GAK*, *MCCC1 (LAMP3)*, *STK39*, *ACMSD*). Уровень значимости ассоциации выявленных аллелей этих генов составляет 10^{-9} – 10^{-47} , но относительный риск для любого из этих локусов не превышает 1,3 (Nalls et al., 2011). Кроме того, было установлено, что генетические варианты оказывают различный эффект на развитие БП в европейских и азиатских популяциях. В разных этнических группах ассоциации полиморфных локусов генов с БП различны. Популяционные различия могут быть связаны с различной частотой аллелей в популяциях и с неравновесным сцеплением (неслучайной ассоциацией аллелей расположенных рядом локусов). Некоторые гены могут быть ассоциированы с БП как в европейских, так и в азиатских популяциях, но полиморфные маркеры (SNPs) этих генов для разных популяций могут быть раз-

личны (Lill et al., 2012). В связи с этим в настоящее время актуальным является репликативный анализ данных GWAS в различных популяциях мира, характеризующихся своеобразием генофонда и не вошедших в полногеномные исследования.

Молекулярно-генетическое исследование sporadicческой болезни Паркинсона в Республике Башкортостан, проводимое в течение последних десяти лет, включало: 1) поиск у всех обследуемых больных мутаций в генах, связанных с моногенными формами БП – α -синуклеина (*PARK1*), паркина (*PARK2*) и дардарина (*LRRK2*); 2) анализ мтДНК у пациентов с БП и в контрольных группах, включающий определение гаплогрупп мтДНК, поиск мутаций в гене цитохрома *b*; **a** также полное секвенирование мтДНК у 4 больных с определенными гаплогруппами мтДНК; 3) анализ ассоциации sporadicческой БП с полиморфными вариантами ряда генов-кандидатов (**Yb8NBC36 Alu-инсерционного локуса гена клиевого канала** *KCNJ6*; делеционного полиморфизма генов глутатионтрансфераз *GSTM1(0/0)* и *GSTT1(0/0)*; рестрикционных полиморфных вариантов р.Ле462Val гена цитохрома семейства р-450 *CYP1A1*, р.Gln191Arg гена параоксоназы 1 (*PON1*)); исследование роли генов нейромедиаторной системы в развитии sporadicческой БП и нейропсихологических нарушений у пациентов с данным заболеванием, проведенное на основе анализа полиморфизма генов тирозингидроксилазы (*TH*), дофаминового транспортера (*DAT1*), катехол-О-метилтрансферазы (*COMT*), моноаминоксидазы В (*MAO-B*), триптофангидроксилазы (*TPH1*), рецепторов дофамина Д1-Д4 (*DRD1*, *DRD2*, *DRD3*, *DRD4*), серотонинового транспортера (*5-HTT*), рецепторов серотонина 1В (*HTR1B*), 2А (*HTR2A*) и 2С (*HTR2C*); 4) репликацию данных полногеномных анализов ассоциации с БП в Республике Башкортостан.

В работе использован банк ДНК пациентов с идиопатической болезнью Паркинсона (581 чел. – 98 башкир, 219 русских и 264 татар), средний возраст манифестации болезни которых составил $58,6 \pm 0,39$ лет. Клинический осмотр больных проводился сотрудниками кафедры неврологии Башкирского государственного медицинского университета. Выборка группы здоровых доноров (578 чел. – 125 башкир, 139 русских и 314 татар) соответствовала группе больных по возрасту, этнической принадлежности и территории проживания.

Основные, наиболее значимые, на наш взгляд, результаты этих исследований мы представляем в настоящей главе.

Так, было установлено, что мутации в генах, ответственных за моногенные формы БП, вносят небольшой вклад в развитие sporadicческой БП: в гене *PARK2* выявлена новая мутация – делеция 12-го экзона в гетерозиготном состоянии с частотой 5,26% (Сломинский и др., 2003; Хидиятова и др., 2004). 12-й экзон кодирует С-концевой участок паркина, в котором расположен RING домен (Lücking et al., 2000), отвечающий как за связывание с белками-мишенями паркина, так и с E2-убиквитином. Возможно, что обусловленное делецией нарушение структуры гена паркина, по крайней мере частично, блокирует биологическую функцию его белкового продукта. Учитывая это, можно предположить, что делеция экзона 12 гена *PARK2* в гомозиготном состоянии может вести к развитию ювенильной болезни Паркинсона по аналогии с делециями других экзонов этого гена (Kitada et al., 1998; Imai et al., 2001). В гетерозиготном состоянии эту делецию можно рассматривать

как фактор предрасположенности к развитию спорадической БП или даже как причину развития этой формы паркинсонизма. О такой возможности указывают имеющиеся сведения о том, что даже гетерозиготность по мутациям в гене паркина ведет к нарушению обмена дофамина в стриатуме у родственников больных с аутосомно-рецессивным ювенильным паркинсонизмом (Klein et al., 2000). В гене *LRRK2* (leucine-rich repeat kinase 2) **в результате скрининга трех известных, наиболее частых, мутаций у 341 пациента со спорадической БП и у 360 человек из группы контроля были выявлены две миссенс-мутации – p.Gly2019Ser и p.Gly2385Arg; мутация p.Leu2020Thr в наших выборках пациентов с БП и контроля не обнаружена. Мутация p.Gly2019Ser была идентифицирована у одной больной башкирской этнической принадлежности, имеющей акинетико-ригидно-дрожательную форму БП с манифестацией заболевания в 63 года. Ее частота в этнической группе башкир составила 1,79%. Примерно с такой же частотой данная мутация выявлена в популяциях Европы (Di Fonzo et al., 2006). Замена p.Gly2385Arg обнаружена у двух больных татарской этнической принадлежности с частотой 1,28% среди татар. Одна из этих больных имела ригидно-дрожательную форму заболевания с манифестацией в 62 года, один больной – акинетико-ригидно-дрожательную форму БП с манифестацией в 36 лет. Полиморфизм p.Gly2385Arg ранее был описан, он выявлен как среди больных, так и среди контроля в Тайване (Di Fonzo et al., 2006) и Сингапуре (Tan et al., 2007). В исследуемой нами группе контроля описанные две мутации (полиморфные варианты) не обнаружены.**

Исследование роли митохондриальной ДНК в развитии болезни Паркинсона было проведено только в группах больных (N= 157) и контроля (N=183) татарской этнической принадлежности. В результате исследования полиморфизма мтДНК, основанного на секвенировании гипервариабельного сегмента I и рестрикционном анализе 11 однонуклеотидных полиморфных локусов кодирующего региона, были выявлены достоверные различия, характеризующиеся значительным преобладанием среди больных гаплогруппы H (39,5% больных) и у 20,0% контроля (OR=2,58, CI=1,55–4,30, p=0,0008) и уменьшением частоты гаплогруппы U (16,6% и 34,4%, соответственно) (OR=0,38, CI=0,22–0,66, p=0,0002). **Протективные свойства гаплогрупп U, K, J, T для развития БП были показаны ранее и другими авторами (Van der Walt et al., 2003; Wallace, 2005). Ассоциация гаплогруппы H с БП, выявленная нами только в популяции татар, ранее не описана. В результате секвенирования гена митохондриального цитохрома B в выборках больных (n=58) и контроля (80) татарской этнической принадлежности было выявлено 16 миссенс-мутаций и 9 синонимичных нуклеотидных замен. Достоверно значимое различие было показано для мутации T15693C, обнаруженной только в контроле и не выявленной у больных, а также установлен гаплотип 15693C-15218A-14793A, ассоциированный с гаплогруппой U, который можно считать протективным для БП в популяции татар (OR=0,04, CI=0,006–0,65, p=0,002). С целью более углубленного исследования природы выявленных ассоциаций гаплогрупп мтДНК с БП мы провели полное секвенирование мтДНК (16569 пн) у 4 пациентов татарской этнической принадлежности, двое из которых имели гаплогруппу H, двое – кластер гаплогрупп UK; полученные результаты секвенирования сравнивались с Кембриджской последовательностью**

мтДНК (rCRS). Наиболее интересным результатом, на наш взгляд, оказалась выявленная у носителя субгаплогруппы H2 в гомоплазмическом состоянии миссенс-мутация 4659G>A (p.Ala64Thr) в высококонсервативном сайте гена *ND2*. У пациента с гаплогруппой Uk1 была выявлена миссенс-мутация 7637G>A/G (p.Glu18Lys) в гене *COII* в гетероплазмическом состоянии. Обе эти мутации, предположительно, имеют функциональную значимость и могут обуславливать предрасположенность к БП у данных пациентов (Khusnutdinova et al., 2008).

В результате исследования в группах больных и контроля полиморфизма указанных выше ядерных генов-кандидатов БП было установлено, что генетическим фактором риска развития заболевания для всех исследованных этнических групп населения Башкортостана является **Alu-инсерция Yb8NBC36 гена калиевого канала *KCNJ6*** (генотип *I/*I и аллель *I) (Gilyazova et al., 2006).

При исследовании роли полиморфизма генов системы метаболизма моноаминов в развитии БП и нейропсихологических нарушений у пациентов с БП ассоциации с заболеванием установлены в этнических группах татар и башкир: для татар маркерами риска развития БП можно считать генотип *H/*H (p=0,0006; OR=2,3) и аллель *H полиморфного локуса p.Val108Met гена *COMT*; генотип *C*C (p=0,002; OR=1,7) и аллель *C (p=0,02; OR=1,34) локуса rs1800532 гена *TPH1*; аллель *12 полиморфного локуса *STin2* (p=0,04; OR=1,3) гена *5-HTT*; для башкир – аллель *C локуса rs6280 гена *DRD3* (p=0,02; OR=1,85). **При исследовании нейропсихологических нарушений** установлено только влияние полиморфизма локуса p.Val108Met гена *COMT* на развитие деменции у больных БП (Гилязова и др., 2008; Хидиятова и др., 2013).

Репликация данных полногеномного анализа ассоциаций с БП в этнических группах русских, башкир и татар из Республики Башкортостан включала исследование 4 полиморфных локусов гена α -синуклеина (*SNCA*, 4p22) – rs356219, rs356165, rs2737020, rs653219, и 6 полиморфных локусов хромосомного региона 17q21.31, содержащего ген белка тау, ассоциированного с микротрубочками аксонов (*MAPT*) – rs11012, rs2942168, rs393152, rs1724425, rs1981997 и rs12373139. Выбранные для исследования хромосомные регионы и полиморфные локусы, согласно данным GWAS, имели наибольшие показатели степени ассоциации с БП (Nalls et al., 2011). Кроме того, α -синуклеин и τ – это два распространенных белка мозга, агрегаты которых обнаруживаются при нейродегенеративных заболеваниях, таких как болезнь Паркинсона, болезнь Альцгеймера и прогрессирующий супрануклеарный паралич. Кодированный геном *SNCA* α -синуклеин – основной белковый компонент телец Леви, обнаруживаемых у большинства пациентов с БП в сохранных дофаминергических нейронах. Предполагают, что α -синуклеин связывается с мембраной везикул в нервных клетках и участвует в процессах контроля транспорта везикул к пресинаптической мембране, являясь негативным регулятором дофаминергической нейротрансмиссии. Кодированный геном *MAPT* белок тау, ассоциированный с микротрубочками аксонов, регулирует динамику микротрубочек, располагая их параллельными пучками. Известен целый ряд различных мутаций этого гена, приводящих к развитию моногенного нейродегенеративного заболевания – фронто-темпоральной деменции с паркинсонизмом. Ассоциация спорадической болезни

Паркинсона с геном *MAPT* также была описана ранее (Scott et al., 2001), и в некоторых исследованиях было установлено, что большой гаплотипический блок, содержащий ген *MAPT*, ассоциирован с риском развития БП (Healy et al., 2004; Zhang et al., 2005; Zabetian et al., 2007; Tobin et al., 2008). В то же время, установленные ассоциации БП с геном *MAPT* до сих пор являются недостаточно понятными, поскольку при идиопатической БП конкретная патология самого белка тау не установлена и, кроме того, полиморфные локусы гена *MAPT* не были идентифицированы как маркеры риска развития болезни Альцгеймера в GWAS исследовании, где была полностью исключена патология, приводящая к фронтотемпоральной деменции (Lambert et al., 2009). Возможно, что отдельные мутации гена *MAPT* и сцепленные с ними полиморфные маркеры могут быть ассоциированы с отдельными клиническими признаками БП.

После опубликования данных полногеномных анализов ассоциации с БП был проведен ряд репликативных исследований, включающих анализ полиморфных локусов генов *SNCA* и *MAPT*-региона, выявивший, как и ожидалось, достаточно противоречивые результаты.

В ходе проведенного нами репликативного исследования были определены частоты генотипов и аллелей указанных выше десяти полиморфных локусов генов *SNCA* и *MAPT*-региона в группах больных БП и здоровых лиц, представителей трех этнических групп населения РБ. Во всех обследованных выборках по всем исследованным SNP-локусам распределение частот генотипов соответствовало равновесию Харди–Вайнберга ($p > 0,05$); для некоторых полиморфных локусов установлен неоднородный характер распределения частот генотипов и аллелей в трех этнических группах. Интересными оказались результаты анализа ассоциации исследованных полиморфных локусов с болезнью Паркинсона, по-разному проявившейся в трех обследованных нами этнических группах. Так, по трем из четырех локусов гена *SNCA* (rs356219, rs356165 и rs2737020) ассоциация полиморфных вариантов с БП выявлена только в популяции русских и не подтверждена в популяциях татар и башкир; по одному локусу этого гена (rs653219) статистически значимые различия по частоте генотипов и аллелей между больными и контрольной группой установлены только в этнической группе татар. В то же время, по пяти из шести локусов *MAPT*-региона (rs2942168, rs393152, rs1724425, rs1981997 и rs12373139) ассоциации полиморфных вариантов с БП выявлены только в этнической группе татар и лишь по локусу rs11012 – только в этнической группе русских. В этнической группе башкир ни по одному из полиморфных локусов, представленных в данном исследовании, ассоциация с БП не установлена. В итоге, по данным GWAS – репликативного исследования, для жителей Республики Башкортостан маркерами риска развития БП можно считать следующие полиморфные варианты: для этнической группы русских – аллель *G локуса rs356219 ($p=0,006$; OR=1,58), аллель *G локуса rs356165 ($p=0,003$; OR=1,64), генотип *T/C локуса rs2737020 ($p=0,02$; OR=1,6) гена *SNCA*; аллель *A ($p=0,007$; OR=2,12) и генотип *G/A ($p=0,02$; OR=2,09) локуса rs11012 *MAPT*-региона; для этнической группы татар – аллель *T ($p=0,04$; OR=1,40) и генотип *C/T ($p=0,002$; OR=1,73) гена *SNCA*; аллель *C ($p=0,02$; OR=1,60) и генотип *C/C ($p=0,01$; OR=1,75) локуса rs2942168, аллель *A ($p=0,001$; OR=1,92) и генотип *A/A ($p=0,001$; OR=2,06)

локуса rs393152, аллель *C ($p=0,04$; OR=1,3) и генотип *C/C ($p=0,01$; OR=1,57) локуса rs1724425, аллель *C ($p=0,01$; OR=1,72) и генотип *C/C ($p=0,009$; OR=1,84) локуса rs1981997 и генотип *C/C ($p=0,02$; OR=1,70) локуса rs12373139 *MAPT*- региона.

Как уже было сказано, согласно результатам GWAS, проанализированные нами полиморфные ДНК-локусы показали наибольшие значения степени ассоциации с БП, но по данным ряда репликативных исследований, проведенных в отдельных популяциях мира, были получены противоречивые результаты. Среди этих данных большой интерес привлекают результаты анализа полиморфизма локусов rs356219 и rs356165, локализованных в 3'-области гена *SNCA*, и локуса rs2737020 в 4-м интроне гена, сцепленного с микросателлитным локусом Rep1(D4S3481), локализованным на 10 kb выше сайта трансляции гена, влияющим на транскрипционную активность и экспрессию гена *SNCA*, для которого также установлена ассоциация с БП в отдельных европейских популяциях (с аллелем 263 п.н.) (Maraganore et al., 2006). Ассоциация полиморфных вариантов локуса rs356165 с БП показана для популяций Японии, Германии, Ирландии и Норвегии (Mueller et al., 2005; Ross et al., 2007; Myhre et al., 2008), а также установлена в результате метаанализа (Nalls et al., 2011), но, в то же время, она не подтверждена для бельгийской популяции (Pals et al., 2004) и популяции Китая (Hu et al., 2010). В ирландской популяции наряду с локусами rs356219 и rs356165, достоверно значимая ассоциация с БП была выявлена и для локуса rs2737020, но при этом установлены протективные в отношении развития заболевания полиморфные варианты гена (Ross et al., 2007). Для полиморфного локуса rs6532194 гена *SNCA*, согласно данным метаанализа, ассоциация с БП установлена в популяциях Азии (Lill et al., 2012). Полученные нами результаты, подтверждающие ассоциации определенных полиморфных вариантов гена *SNCA* в этнических группах русских и татар, в целом, соответствуют аналогичным данным, полученным для большинства европейских популяций.

Для полиморфных локусов хромосомного региона 17q21.31, содержащего ген *MAPT*, большинство установленных на сегодняшний день ассоциаций с БП относится, в основном, к европейским популяциям. Так, уже в ходе отдельных полногеномных исследований, проведенных, в частности, на когорте японских больных, полиморфные варианты этого хромосомного региона не были идентифицированы как маркеры риска развития БП (Satake et al., 2009). Согласно результатам нашего исследования, полиморфные варианты *MAPT*-региона оказались ассоциированными с БП преимущественно в этнической группе татар, при этом маркерами риска развития заболевания выступили те же аллельные варианты, которые были выявлены и при полногеномных анализах ассоциации с БП. Противоречивый результат был обнаружен для полиморфного локуса rs11012, для которого в этнической группе русских с риском развития БП ассоциированным оказался аллель *A, в то время как, по данным GWAS, этот аллель является протективным для развития заболевания среди европейцев в целом (Pankratz et al., 2009).

Таким образом, проведенная репликация данных полногеномных анализов ассоциации с БП в трех этнических группах населения РБ, каждая из которых характеризуется своеобразием генофонда, выявила наиболее значимые результаты ассоциации с БП в этнических группах русских и татар, в генофонде которых су-

ществленную долю составляет европеоидный компонент. В популяции башкир, в генофонде которых значительную долю представляет монголоидный компонент, ни с одним из исследованных локусов ассоциация с БП не подтверждена.

В целом, маркеры риска развития БП в трех этнических группах населения РБ, выявленные на основе анализа генов-кандидатов ядерного генома и репликации GWAS, представлены в табл. 2. Обобщая полученные результаты, можно заключить, что наследственную предрасположенность к БП обуславливает целый комплекс генетических факторов, которыми могут являться как более функционально значимые изменения структуры генов, участвующих в процессах функционирования нейронов мозга – мутации, – приводящие к возникновению моногенных форм БП, так и менее опасные нарушения – полиморфные варианты генов, встречающиеся с определенной частотой как среди больных БП, так и среди здоровых индивидуумов. Исследования ассоциации полиморфных вариантов генов-кандидатов, вовлеченных в известные звенья патогенеза БП, достаточно информативны и позволяют определять роль исследуемых функциональных систем для БП в целом и выявлять конкретные маркеры риска и антириска развития заболевания. Проведенные полногеномные исследования ассоциации с болезнью Паркинсона позволили выявить целый ряд полиморфных вариантов генома человека, многие из которых

Таблица 2

Маркеры риска развития болезни Паркинсона в трех этнических группах населения Республики Башкортостан

Этническая группа	Ген, локус, полиморфный вариант	p	OR	95%CI
русские	<i>KCNJ6</i> AluYb8NBC36*1	0,03	1,95	1,1–3,6
	<i>KCNJ6</i> AluYb8NBC36*1/I	0,007	2,73	1,3–5,7
	<i>SNCA</i> rs356219*G	0,006	1,58	1,14–2,18
	<i>SNCA</i> rs356165*G	0,003	1,64	1,18–2,26
	<i>SNCA</i> rs2737020*Т/С	0,02	1,67	1,07–2,58
	<i>MAPT</i> -регион rs11012*А	0,007	2,12	1,24–3,65
татары	<i>KCNJ6</i> AluYb8NBC36*1	0,0005	3,36	1,9–5,9
	<i>KCNJ6</i> AluYb8NBC36*1/I	0,0005	5,4	2,7–10,6
	<i>COMT</i> rs4680*G	0,000005	1,73	1,34–2,2
	<i>COMT</i> rs4680*G/G	0,00001	2,25	1,6–3,2
	<i>TPH1</i> rs1800532*С	0,02	1,34	1,06–1,7
	<i>TPH1</i> rs1800532*С/С	0,003	1,7	1,16–2,4
	<i>5-HTT</i> Stin2*12	0,04	1,35	1,0–1,8
	<i>SNCA</i> rs653219*Т	0,04	1,4	1,01–1,8
	<i>MAPT</i> -регион rs2942168*С	0,02	1,6	1,08–2,4
	<i>MAPT</i> -регион rs2942168*С/С	0,01	1,75	1,14–2,7
	<i>MAPT</i> -регион rs393152*А	0,001	1,92	1,30–2,8
	<i>MAPT</i> -регион rs393152*А/А	0,001	2,06	1,35–3,2
	<i>MAPT</i> -регион rs1724425*С	0,04	1,3	1,01–1,7
	<i>MAPT</i> -регион rs1724425*С/С	0,01	1,8	1,2–2,9
<i>IMP5</i> rs12373139*С/С	0,02	1,7	1,09–2,6	
башкиры	<i>KCNJ6</i> AluYb8NBC36*1	0,03	3,17	1,1–9,9
	<i>KCNJ6</i> AluYb8NBC36*1/I	0,006	5,42	1,5–20,1
	<i>DRD3</i> rs6280*С	0,02	1,85	1,09–3,14

оказались локализованными в уже известных генах, имеющих отношение к БП, а многие – в хромосомных локусах, включающих гены, ранее не привлекавшие внимания исследователей при изучении генетических основ данного заболевания. Выявляемые ассоциированные с БП полиморфные варианты генов-кандидатов и независимых хромосомных локусов могут являться как непосредственными участниками патогенеза БП, так и быть случайно сцепленными с какими-либо другими, неизвестными, мутациями в генах и представлять собой лишь маркеры риска развития заболевания. Существующая популяционная гетерогенность характера полиморфизма многих полиморфных ДНК-локусов обуславливает различия и в характере их ассоциаций с многофакторной патологией, в том числе и с БП. Поэтому этническая однородность сравниваемых выборок больных и контроля при анализе ассоциаций является крайне важной. Выявленные этноспецифические генетические маркеры БП могут быть использованы для раннего определения риска развития заболевания у жителей соответствующих регионов с целью его профилактики. Полученные на сегодняшний день результаты ассоциативных генетических исследований с БП являются основой для продолжения более углубленного исследования роли различных генов в патогенезе БП, их взаимодействия между собой, а также в совокупности с различными факторами окружающей среды, что, в целом, направлено на разработку новых методов лечения и профилактики этого тяжелого нейродегенеративного заболевания.

Литература

- Гилязова И.Р., Хидиятова И.М., Ахметова В.Л. и др. Исследование ассоциации полиморфных вариантов ряда генов метаболизма дофамина с идиопатической болезнью Паркинсона в Республике Башкортостан // Медицинская генетика, 2008. № 1. С. 39-49.
- Голубев В.Л., Левин Я.И., Вейн А.М. Болезнь Паркинсона и синдром паркинсонизма. М.: Медпресс, 2000. 416 с.
- Сломинский П.А., Милосердова О.В., Хуснутдинова Э.К., Лимборская С.А. Анализ делеционных мутаций в гене паркина у больных идиопатической формой болезни Паркинсона // Генетика. 2003. № 2. С. 223-228.
- Хидиятова И.М., Ахмадеева Г.Н., Гилязова И.Р. и др. Исследование влияния полиморфизма гена *СOMT* на характер клинического течения болезни Паркинсона // Неврологический журнал. 2013. № 3. С.22-27.
- Хидиятова И.М., Гилязова И.Р., Байтимеров А.Р. и др. Поиск мутаций в генах *PARK1* и *PARK2* у пациентов со спорадической и наследственными формами болезни Паркинсона из Башкортостана // Медицинская генетика. 2004. № 6. С. 280-284.
- Bekris L.M., Mata I.F., Zabetian C.P. The Genetics of Parkinson Disease // J. Geriatr Psychiatry. Neurol. 2010. Vol. 23. P. 228-242.
- Bonifati V, Rizzu P, van Baren M.J. et al. Mutations in the DJ-1 gene associated with autosomal recessive early-onset parkinsonism // Science. 2003. Vol. 299. P. 256-259.
- Di Fonzo A., Wu-Chou Y.H., Lu C.S. et al. A common missense variant in the LRRK2 gene, Gly2385Arg, associated with Parkinson's disease risk in Taiwan // Neurogenetics. 2006. Vol. 7. P. 133e8.
- Edwards T.L., Scott W.K., Almonte C. et al. Genome-wide association study confirms SNPs in SNCA and the MAPT region as common risk factors for Parkinson disease // Ann. Hum. Genet. 2010. Vol. 74. P. 97-109.
- Gasser T. Genetics of Parkinson's disease // Ann. Neurol. 1998. Vol. 44. P. 53-57.

- Gilyazova I., Khidiyatova I., Akhmetova V. et al. Alu-insertion Yb8NBC36 of KCNJ6 gene is a risk factor for Parkinson's disease development // *Balkan Journal of Medical Genetics*. 2006. Vol. 9. P. 33-37.
- Hardy J., Cai H., Cookson M.R., Gwinn-Hardy K., Singleton A. Genetics of Parkinson's disease and parkinsonism // *Ann. Neurol*. 2006. Vol. 60, № 4. P. 389-398.
- Healy D.G., Bou-Sleiman P.M., Lees A.J. et al. Tau gene and Parkinson's disease: a case-control study and meta-analysis. // *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*. 2004. Vol. 75. № 7. P. 962-965.
- Hicks A.A., Petursson H., Jonsson T. et al. A susceptibility gene for late-onset idiopathic Parkinson's disease // *Ann. Neurol*. 2002. Vol. 52. № 5. P. 549-550.
- Hu F.-Y., Hu W.-B., Liu L. et al. Lack of replication of a previously reported association between polymorphism in the 3' UTR of the alpha-synuclein gene and Parkinson's disease in Chinese subjects // *Neurosci. Lett*. 2010. Vol. 479. P. 31-33.
- Imai Y., Soda M., Hattori N. et al. An unfolded putative transmembrane polypeptide, which can lead to endoplasmic reticulum stress, is a substrate of parkin // *Cell*. 2001. Vol. 105. P. 891-902.
- Khusnutdinova E., Gilyazova I., Ruiz-Pesini E., Derbeneva O., Khusainova R., Khidiyatova I., Magzhanov R. and Wallace D. A Mitochondrial Etiology of Neurodegenerative Diseases: Evidence from Parkinson's Disease // *Ann. NY Acad. Sci*. 2008. Vol. 3. № 11. P. 447-467.
- Kitada T., Asakawa S., Hattori N. et al. Mutation in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism // *Nature*. 1998. Vol. 392. P. 605-608.
- Klein C., Pramstaller P., Kis B. et al. Parkin deletions in a family with adult-onset, tremor-dominant parkinsonism: expanding the phenotype // *Ann. Neurol*. 2000. Vol. 48. P. 65-71.
- Lambert J.C., Heath S., Even G. et al. Genome-wide association study identifies variants at CLV and CR1 associated with Alzheimer's disease // *Nat. Genet*. 2009. Vol. 41. P. 1094-1099.
- Lautier C., Goldwurm S., D'urr A. et al. Mutations in the *GIGYF2 (TNRC15)* gene at the PARK11 locus in familial Parkinson disease // *Am. J. Hum. Gen*. 2008. Vol. 82. № 4. P. 822-833.
- Leroy E., Boyer R., Auburger G. et al. The ubiquitin pathway in Parkinson's disease // *Nature*. 1998. Vol. 395. P. 451-452.
- Lill Ch., Roehr J., McQueen M. et al. Comprehensive research synopsis and systematic meta-analyses in Parkinson's disease genetics: the PDGene database // *PLoS Genetics*. 2012. Vol. 8. № 3. P. e1002548.
- Lücking C., Durr A., Bonifati V. et al. Association between early-onset Parkinson's disease and mutations in the parkin gene. French Parkinson's disease Genetics Study Group // *N. Engl. J. Med*. 2000. Vol. 342. P. 1560-1567.
- Maraganore D.M., Farrer M.J., Hardy J.A. et al. Case-control study of the ubiquitin carboxy-terminal hydrolase L1 gene in Parkinson's disease // *Neurology*. 2006. Vol. 53. P. 1858-1860.
- Mueller J.C., Fuchs J., Hofer A. et al. Multiple regions of alpha-synuclein are associated with Parkinson's disease // *Ann. Neurol*. 2005. Vol. 57. P. 535-541.
- Myhre R., Toft M., Kachergus J., Hulihan M.M. et al. Multiple alpha-synuclein gene polymorphisms are associated with Parkinson's disease in a Norwegian population // *Acta. Neurol. Scand*. 2008. Vol. 118. № 5. P. 320-327.
- Nalls M.A., Plagnol V., Hernandez D.G. et al. Imputation of sequence variants for identification of genetic risks for Parkinson's disease: a meta-analysis of genome-wide association studies // *Lancet*. 2011. Vol. 377. P. 641-649.
- Paisan-Rutz C., Jain S., Evans E.W. et al. Cloning of the gene containing mutations that cause PARK8-linked Parkinson's disease // *Neuron*. 2004. Vol. 44. № 4. P. 595-600.
- Paisan-Ruiz C., Guevara R., Federoff M. et al. Early-onset L-dopa-responsive Parkinsonism with pyramidal signs due to *ATP13A2*, *PLA2G6*, *FBXO7* and *Spatacsin* mutations // *Movement Disorders*. 2010. Vol. 25. № 12. P. 1791-1800.
- Pals P., Lincoln S., Manning J. et al. Alpha-synuclein promoter confers susceptibility to Parkinson's disease // *Ann. Neurol*. 2004. Vol. 56. P. 591-595.
- Pankratz N., Nichols W., Uniacke S., Significant linkage of Parkinson's disease to chromosome 2q36-37 // *Am. J. Hum. Genet*. 2003. Vol. 72. P. 1053-1057.
- Pankratz N., Wilk J.B., Latourelle J.C. et al. Genomewide association study for susceptibility genes contributing to familial Parkinson disease // *Hum. Genet*. 2009. Vol. 124. P.593-605.

- Polymeropoulos M., Lavedan C., Leroy E. et al.* Mutation in the α -synuclein gene identified in families with Parkinson's disease // *Sci.* 1997. Vol. 276. P. 2045-2047.
- Ramirez A., Heimbach A., Grundemann J. et al.* Hereditary parkinsonism with dementia is caused by mutations in *ATP13A2*, encoding a lysosomal type 5 P-type ATPase // *Nature Genetics.* 2006. Vol. 38. № 10. P. 1184-1191.
- Ritchie M.D., Hahn L.W., Roodi N. et al.* Multifactor-dimensionality reduction reveals high-order interactions among estrogen-metabolism genes in sporadic breast cancer // *Am. J. Hum. Genet.* 2001. Vol. 69. № 1. P. 138-147.
- Ross O.A., Gosal D., Stone J.T. et al.* Familial genes in sporadic disease: common variants of alpha-synuclein gene associate with Parkinson's disease // *Mech. Ageing. Dev.* 2007. Vol. 128. P. 378-382.
- Satake W., Nakabayashi Y., Mizuta I. et al.* Genome-wide association study identifies common variants at four loci as genetic risk factors for Parkinson's disease // *Nat. Genet.* 2009. Vol. 41. P. 1303-1307.
- Scott W.K., Nance M.A., Watts R.L. et al.* Complete genomic screen in Parkinson disease: evidence for multiple genes // *JAMA.* 2001. Vol. 286. № 18. P. 2239-2244.
- Shojaee S., Sina F., Banihosseini S. S. et al.* Genome-wide linkage analysis of a Parkinsonian-pyramidal syndrome pedigree by 500 K SNP arrays // *Am. J. Hum. Gen.* 2008. Vol. 82. № 6. P. 1375-1384.
- Simon-Sanchez J., Schulte C., Bras J.M. et al.* Genome-wide association study reveals genetic risk underlying Parkinson's disease // *Nat. Genet.* 2009. Vol. 41. P. 1308-1312.
- Singleton A.B., Farrer M., Jonson J. et al.* α -synuclein locus triplication causes Parkinson's disease // *Science.* 2003. Vol. 302. № 5646. P. 841.
- Strauss K., Martins L., Plun-Favreau H. et al.* Loss of function mutations in the gene encoding Omi/HtrA2 in Parkinson's disease // *Human Molecular Genetics.* 2005. Vol. 14. № 15. P. 2099-2111.
- Tan E., Zhao Y., Tan L., et al.* Analysis of LRRK2 Gly2385Arg genetic variant in non-Chinese Asians // *Movement Disorders.* 2007. Vol. 22. P. 1816e8.
- Tobin J. E., Latourelle J. C., Lew M. F. et al.* Haplotypes and gene expression implicate the MAPT region for Parkinson disease: the GenePD Study // *Neurology.* 2008. Vol. 71. P. 28-34.
- Valente E., Salvi S., Ialongo T. et al.* PINK1 mutations are associated with sporadic early-onset parkinsonism // *Ann. Neurol.* 2004. Vol. 56. № 3. P. 336-341.
- Van der Walt J., Nicodemus K., Martin E. et al.* Mitochondrial polymorphisms significantly reduce the risk of Parkinson disease // *Am. J. Hum. Gen.* 2003. Vol. 72. P. 804-811.
- Wallace D.* A mitochondrial paradigm of metabolic and degenerative diseases, aging, and cancer: a dawn for evolutionary medicine // *Ann. Rev. Genet.* 2005. Vol. 39. P. 359-407.
- Zabetian C.P., Hutter C.M., Factor S.A. et al.* Association analysis of MAPT H1 haplotype and subhaplotypes in Parkinson's disease // *Ann. Neurol.* 2007. Vol. 62. № 2. P. 137-144.
- Zhang J., Song Y., Chen H., Fan D.* The tau gene haplotype h1 confers a susceptibility to Parkinson's disease // *Eur. Neurol.* 2005. Vol. 53. P. 15-21.
- Zimprich A., Biskup S., Leitner P. et al.* Mutations in LRRK2 cause autosomal-dominant parkinsonism with pleomorphic pathology // *Neuron.* 2004. Vol. 44. № 4. P. 601-607.

Молекулярные механизмы патогенеза болезни Паркинсона и перспективы превентивной терапии

Ю.Ф. Пастухов, И.В. Екимова, А.Ю. Чеснокова

Содержание

I. МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ПАТОГЕНЕЗА БОЛЕЗНИ ПАРКИНСОНА

1. Новые данные о роли α -синуклеина в патогенезе болезни Паркинсона
 - 1.1. Структура и физиологические функции α -синуклеина
 - 1.2. Секретция α -синуклеина и пути распространения синуклеиновой патологии
 - 1.3. Роль α -синуклеина в нейровоспалении, нейротоксичности и клеточной гибели
 - 1.4. Конформационные свойства α -синуклеина
 - 1.5. Альфа-синуклеин и современная классификация доклинических и клинических стадий болезни Паркинсона
2. Современные представления о роли убиквитин-протеасомной системы в патогенезе болезни Паркинсона
 - 2.1. Снижение функции убиквитин-протеасомной системы – ключевой механизм болезни Паркинсона
 - 2.2. Основные принципы моделирования стадий болезни Паркинсона на основе дисфункции протеасом nigrostriatной системы
 - 2.3. Экспериментальное моделирование стадий болезни Паркинсона у крыс на основе пролонгированной дисфункции протеасом nigrostriatной системы

II. ОБОСНОВАНИЕ ПРЕВЕНТИВНОЙ ТЕРАПИИ

3. Поиск доклинических немоторных маркеров паркинсонизма при изучении характеристик сна
 - 3.1. Потенциальные немоторные маркеры паркинсонизма у человека
 - 3.2. Относительная специфичность парасомнии RBD как раннего маркера паркинсонизма
 - 3.3. Нейроанатомическая последовательность α -синуклеиновой патологии и синдром RBD
 - 3.4. Изменения парадоксального сна на доклинической и клинической стадии у животных и при болезни Паркинсона у человека
4. Перспективы разработки превентивного лечения болезни Паркинсона на основе мобилизации системы молекулярных шаперонов
 - 4.1. О нейропротективных свойствах шаперонной системы белков теплового шока
 - 4.2. Вовлечение основного шаперона HSP70 в патогенез болезни Паркинсона
 - 4.3. Защитные эффекты шаперона Hsp70 в моделях болезни Паркинсона
 - 4.4. Терапевтический потенциал индукторов белков теплового шока и обоснование превентивной терапии болезни Паркинсона
 - 4.5. О перспективе ослабления процесса нейродегенерации в модели клинической стадии

Сокращения: БП – болезнь Паркинсона; ДА – дофамин; IL-1 β – интерлейкин 1 β ; IL-2 – интерлейкин 2; IL-6 – интерлейкин 6; iRBD – «идиопатический» RBD; RBD – парадоксальный сон без мышечной атонии; TNF- α – фактор некроза опухоли альфа.

I. МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ПАТОГЕНЕЗА БОЛЕЗНИ ПАРКИНСОНА

1. Новые данные о роли α -синуклеина в патогенезе болезни Паркинсона

Белки – основа жизненных процессов. Неправильная пространственная укладка белков является наиболее серьезной угрозой для функционирования и выживания клеток (Selkoe, 2003; Haass, Selkoe, 2007; Jones et al., 2014). Известно, что не более 70% из вновь синтезированных белков имеют правильную трехмерную структуру, необходимую для реализации их биологической активности (Schubert et al., 2000). Процессы старения, различные стрессы и повреждения, связанные с патологией, существенно увеличивают количество аномальных белков, опасных для клетки. В последние годы важное значение в патогенезе болезни Паркинсона (БП) отводится нарушению конформации белка α -синуклеина, ведущему к фатальному накоплению его токсичных олигомеров в клетках, в том числе в дофамин DA-ергических нейронах компактной части черной субстанции и дегенерации нейронов; подобный механизм играет существенную роль в патогенезе спорадической и наследственной форм БП (Uversky, 2007; Пастухов, Чеснокова, 2010; Ebrahimi-Fakhari et al., 2012).

1.1. Строение и физиологические функции α -синуклеина

Интерес к свойствам небольшого растворимого белка α -синуклеина резко возрос после того, как была установлена взаимосвязь между нарушением его функции и развитием ряда нейродегенеративных заболеваний, включая БП. Многолетний патологический процесс при БП характеризуется прогрессирующей потерей DA-ергических нейронов в компактной части черной субстанции и ряде других структур мозга и образованием сферических эозинфильных цитоплазматических включений (телец Леви) в соматических нервных клетках, а также веретено- или нитеподобных ветвящихся нейритов Леви и нейроаксональных сфероидов в отростках нейронов; эти включения являются морфологическим субстратом нейродегенерации (Del Tredici, Braak, 2004). **Накопление телец и нейритов Леви в нервной ткани** рассматривается в качестве критического диагностического фактора БП (Eriksen et al., 2005).

Главным компонентом телец и нейритов Леви являются агрегации неправильно свернутого и токсичного для клетки высококонсервативного белка α -синуклеина с молекулярной массой 19 кДа (140 аминокислот), который локализуется в основном в аксонах и их пресинаптических терминалях (Shults, 2006). Ген α -синуклеина (SNCA) расположен на длинном плече четвертой хромосомы и состоит из семи экзонов, пять из которых транскрибируются. Агрегации α -синуклеина характерны для целой группы заболеваний, которые рассматриваются как синуклеинопатии (табл.)

Заболевания, сопровождающиеся агрегацией α -синуклеина, по (Spillantini et al., 1998)

α -синуклеинопатии
Болезнь Паркинсона Спорадические формы Наследственные формы Деменция с тельцами Леви Мультисистемная атрофия Синдром Ши-Драгера Стриатонигральная дегенерация Оливопонтоцеребеллярная дистрофия (болезнь Дежерина-Тома) Болезнь Галлервордена-Шпатца Другие заболевания, при которых возможны синуклеиноиммунореактивные поражения Болезнь Альцгеймера Болезнь Пика Амиотрофический латеральный склероз Травматические поражения мозга

Альфа-синуклеин широко распространен в мозге (Jakes et al., 1994; Iwai et al., 1995). В полном транскрипте, α -синуклеине-140, выделяют три области (рис. 1). N-концевой участок (основания 1–65) включает сайты по крайней мере двух ауто-сомно-доминантных наследственных мутаций, вызывающих БП, – замена аланина на треонин в позиции 53 (A53T) и замена аланина на пролин в позиции 30 (A30P); он содержит шесть неполных повторов 11-аминокислотных остатков с высококонсервативным гексамерным мотивом (KTKEGV). Предполагается, что N-концевой участок способен образовывать структуру из двух α -спиралей, соединенных коротким прямолинейным участком, и типичную для липид-связывающих доменов аполипопротеинов класса A2. Было показано, что липидное окружение стимулирует сворачивание α -синуклеина, а также ускоряет его агрегацию (Lee et al., 2002). Центральный гидрофобный участок (основания 66–95) включает NAC-последовательность (non-amyloid component), склонную к агрегации. Впервые NAC-пептид был выделен из амилоидных бляшек коры головного мозга пациентов, страдавших болезнью Альцгеймера (Ueda et al., 1993). И лишь затем было обнаружено, что α -синуклеин является основным компонентом телец Леви при БП. С-концевой участок (основания 96–140) отрицательно заряжен за счет кислых аминокислот. В этом регионе локализованы несколько сайтов фосфорилирования (Tyr-125, -133 и -136 и Ser-129), а также домен, отвечающий за шаперонную активность α -синуклеина (основания 125–140) (Recchia et al., 2004).

Функции этого распространенного белка, количество которого в растворимой цитозольной мозговой фракции составляет не менее 1% от всего белка, остаются недостаточно выясненными. Однако его локализация в пресинаптических терминалях (Iwai et al., 1995; Jakes et al., 1994), ассоциация с дистальным резервным пулом синаптических везикул (Zhang et al., 2008) и нарушение синаптической передачи при нокаутировании животных по α -синуклеину или при избыточной экспрессии этого белка позволяют считать, что α -синуклеин играет определенную роль в регу-

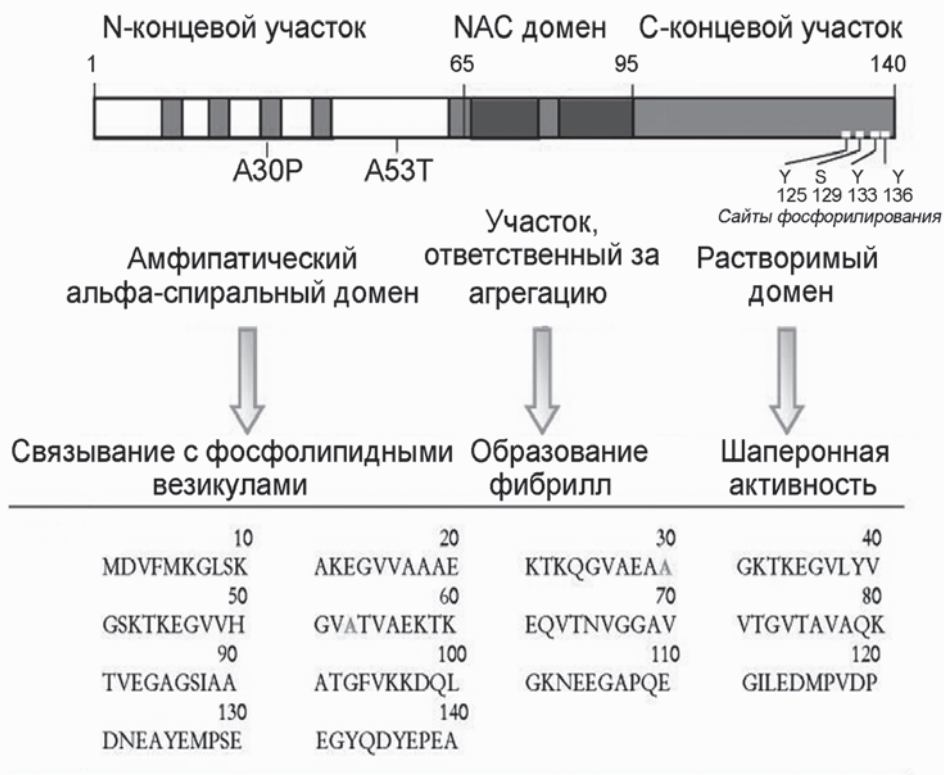


Рис. 1. Аминокислотная последовательность и домены α -синуклеина человека, по (Recchia et al., 2004)

ляции высвобождения нейромедиаторов, синаптической функции и пластичности (Lashuel et al., 2012).

Анализ мышей-нокаутов по гену α -синуклеина показал, что у них заметно сокращается время, необходимое для восстановления способности к выбросу ДА в стриатуме после повторной электрической стимуляции, падает уровень ДА в стриатуме и наблюдается снижение локомоторного ответа на введение амфетамина (в результате уменьшения выброса ДА в синаптическую щель и инвертирования действия дофаминового транспортера на локомоторную активность) (Abeliovich et al., 2000). У мышей-нокаутов по гену *Sncα* обнаружены нарушения гиппокампальных синаптических реакций в ответ на длительную высокочастотную стимуляцию, способную истощить готовые к выбросу и резервные пулы синаптических везикул, а также нарушения процесса пополнения готовых к выбросу пулов из резервных депо. Эти результаты могут означать, что α -синуклеин контролирует пополнение синаптических везикул и их перемещение из резервного пула к области высвобождения синаптических везикул (Cabin et al., 2002; Abeliovich et al., 2000). Кроме того, показано, что истощение α -синуклеина с помощью антисмысловых олигонуклео-

тидов вызывает уменьшение резервного пула синаптических везикул в первичной культуре нейронов гиппокампа (Murphy et al., 2000).

У трансгенных мышей с гиперэкспрессией человеческого α -синуклеина определены нарушения экзоцитоза синаптических везикул и уменьшение высвобождения нейромедиатора (Nemani et al., 2010). Подобные эффекты наблюдались при гиперэкспрессии α -синуклеина в генетических моделях БП на грызунах (Gaugler et al., 2012; Lundblad et al., 2012) и на клеточной линии PC12 (Larsen et al., 2006). Гиперэкспрессия α -синуклеина вызывает снижение количества готовых к высвобождению везикул (Gaugler et al., 2012), рециркуляции синаптических пузырьков после эндоцитоза, размера синаптического пула рециркулирующих везикул (Nemani et al., 2010), обратного захвата ДА в ДА-ергических терминалях (Lundblad et al., 2012).

Возможная роль α -синуклеина в регуляции синаптического гомеостаза не связана исключительно с его непосредственным взаимодействием с синаптическими пузырьками. Показано, что α -синуклеин может действовать как белок-шаперон по отношению к пресинаптическому белковому комплексу SNARE, непосредственно вовлеченному в процесс высвобождения нейромедиаторов, включая ДА (Burte et al., 2010). Совокупность данных свидетельствует, что α -синуклеин играет важную роль в перемещении синаптических везикул и регуляции везикулярного экзоцитоза и, возможно, контролирует ряд белков, связанных с синаптическим гомеостазом.

Тот факт, что нокауты по тому или иному синуклеину (α , β и γ) жизнеспособны, позволяет считать, что синуклеины не являются ключевыми участниками в механизмах высвобождения нейромедиаторов, но, возможно, вносят свой вклад в долгосрочную регуляцию и поддержание функций нервных терминалей (Chandra et al., 2004).

1.2. Секреция α -синуклеина и пути распространения синуклеиновой патологии

Отсутствие секреторной сигнальной пептидной последовательности в молекуле α -синуклеина привело к предположению, что он является исключительно внутриклеточным белком, и его патологическая функция долго рассматривалась в контексте внутриклеточного окружения. Однако это представление изменилось, когда было обнаружено присутствие α -синуклеина в биологических жидкостях, таких как цереброспинальная жидкость и плазма крови как у лиц с БП, так и у здоровых людей (El-Agnaf et al., 2003; Tokuda et al., 2006). **Сделан акцент на изучении механизма высвобождения и возможные функции внеклеточного α -синуклеина.**

Показано, что α -синуклеин секретируется в питательную среду из клеточных линий с гиперэкспрессией (El-Agnaf et al., 2003; Lee et al., 2005). Определена секреция мономерных и агрегированных форм эндогенного α -синуклеина из эмбриональных нейронов коры мозга крысы (Lee et al., 2005; Danzer et al., 2011).

При гиперэкспрессии в клетках нейробластомы человека SH-SY5Y α -синуклеин локализуется в больших плотных везикулах в ядре клетки и эта внутривезикулярная фракция более склонна к агрегации по сравнению с цитозольным α -синуклеином

(Lee et al., 2005). Обнаружено что ДА увеличивает уровень секреции α -синуклеина и вызывает накопление его в везикулах (Lee et al., 2011). **Предполагается, что высвобождение α -синуклеина усиливается в условиях клеточного стресса, способствующего накоплению неправильно уложенных и поврежденных белков (Jang et al., 2010).**

В последние годы повысился интерес к внеклеточному α -синуклеину в связи с его потенциальной ролью в инициации и развитии синуклеинопатий. Основанием послужили работы, описывающие пошаговое, постадийное распространение патологии телец Леви при БП (Braak et al., 2003, 2004) и присутствие α -синуклеин-положительных включений наподобие телец Леви после давно проведенной мезенцефалической трансплантации пациентам с БП, свидетельствующие о распространении α -синуклеиновой патологии от клеток хозяина в трансплантированные клетки (Li et al., 2008; Kordower et al., 2008). Эксперименты, проведенные *in vitro*, подтвердили возможность межнейрональной передачи α -синуклеина (Desplats et al., 2009; Hansen et al., 2011) (рис. 2). Такая передача α -синуклеина наблюдалась и в экспериментах *in vivo*, проведенных на трансгенных мышах, экспрессирующих α -синуклеин. Процесс передачи α -синуклеина связан, по-видимому, с захватом α -синуклеина нейронами-реципиентами посредством эндоцитоза (Hansen et al., 2011).

Эти результаты позволяют предполагать, что α -синуклеин способен не только секретироваться клетками, но и передаваться от одних нейронов к другим; секреция α -синуклеина усиливается в условиях клеточного стресса.

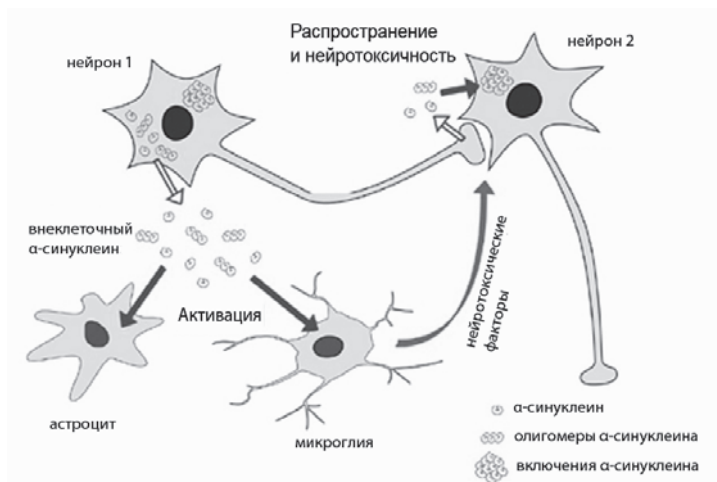


Рис. 2. Роль экзогенного α -синуклеина в нейровоспалении, нейротоксичности и распространении патологического процесса

Альфа-синуклеин может секретироваться из неповрежденных нейронов или высвобождаться из погибающих нейронов во внеклеточное пространство. Внеклеточный α -синуклеин способен активировать окружающие его астроциты и микроглию, вызывая провоспалительную активность глиальных клеток. При активации микроглия продуцирует провоспалительные цитокины, оксид азота и активные виды кислорода, токсичные для нейронов. Альфа-синуклеин способен, помимо этого, перемещаться от нейрона к нейрону, что приводит к распространению процесса его агрегации и, в конечном счете, к гибели нейронов-реципиентов, по (Marques, Outeiro, 2012)

1.3. Роль α -синуклеина в нейровоспалении, нейротоксичности и клеточной гибели

Феномены секреции и межклеточной передачи α -синуклеина сами по себе не являются достаточным объяснением распространения α -синуклеиновой патологии и прогрессии нейродегенерации, типичных для БП. Существуют дополнительные данные о том, что α -синуклеин, подобно прионам, может выступать в качестве агента, катализирующего агрегацию, и способен оказывать влияние на жизнеспособность нейронов-реципиентов (Marques, Outeiro, 2012). Экзогенные фибриллы α -синуклеина могут вызывать формирование внутриклеточных включений, подобных тельцам Леви, в культивируемых клетках (Luk et al., 2009). Получены также данные о формировании включений вследствие межклеточной передачи α -синуклеина как при совместной культивации клеток, так и в экспериментах *in vivo* при их трансплантации (Hansen et al., 2011; Desplats et al., 2009) (см. рис. 2). Важно подчеркнуть, что помимо стимуляции агрегации внеклеточный α -синуклеин, выделенный из нейронов, вызывает процесс апоптоза в нейронах-реципиентах (Desplats et al., 2009).

В ряде работ отмечен нейротоксический эффект внеклеточных и секретированных олигомерных форм α -синуклеина. Олигомеры рекомбинантного α -синуклеина захватываются нейронами в культуре и запускают клеточную гибель (Danzer et al., 2007, 2009); секретированные нейронами олигомеры оказывают токсическое действие на нейроны-реципиенты (Danzer et al., 2011). Добавление в культуральную среду веществ, препятствующих олигомеризации, защищает нейроны-реципиенты (Emmanouilidou et al., 2010). Следовательно, внеклеточный α -синуклеин участвует в распространении процесса нейродегенерации при БП.

Внеклеточный α -синуклеин способен запускать нейровоспалительные реакции в клетках глии. Показано, что воспалительный процесс в черной субстанции характеризуется секрецией провоспалительных и нейротоксических факторов, инициирующих дегенерацию нейронов (McGeer et al., 1988; Croisier et al., 2005). В цереброспинальной жидкости или сыворотке крови пациентов с БП обнаружены повышенные уровни провоспалительных цитокинов, таких как интерлейкин 1 β (IL1- β), интерлейкин 2 (IL-2), интерлейкин 6 (IL-6) или фактор некроза опухоли альфа (TNF- α) (Mogi et al., 1994).

В опытах *in vitro* установлено, что под влиянием α -синуклеина клетки микроглии увеличивают продукцию NO, TNF- α и IL1- β , толл-подобных рецепторов и активных форм кислорода, что приводит к усилению нейротоксичности и нейродегенерации DA-ергических нейронов (Beraud et al., 2011; Couch et al., 2011; Zhang et al., 2005); описана прямая активация воспалительной реакции в микроглиальной клеточной линии внеклеточным α -синуклеином, полученным из нейронов (Alvarez-Erviti et al., 2011).

Введение человеческого α -синуклеина дикого типа в черную субстанцию мышей вызывает экспрессию провоспалительных цитокинов и маркеров воспаления в эндотелии и активацию микроглии; при наличии внеклеточного α -синуклеина мик-

роглия становится более восприимчивой к системным провоспалительным сигналам (Couch et al., 2011).

Воздействия α -синуклеина на микроглию сопровождаются также реакцией со стороны астроцитов. Передача α -синуклеина от нейронов к астроцитам показана в опытах с использованием клеточных культур и *in vivo* в мозге трансгенных мышей, экспрессирующих человеческий α -синуклеин. Она приводит к накоплению α -синуклеина внутри астроцитов и вызывает в них воспалительную реакцию (Lee et al., 2010).

Приведенные данные свидетельствуют об участии внеклеточного α -синуклеина в модуляции глиальной функции и нейровоспалении и фокусируют внимание исследователей на выяснении механизмов, за счет которых происходит межклеточная передача α -синуклеина.

1.4. Конформационные свойства α -синуклеина

Ключевой вопрос, касающийся молекулярных основ патогенеза БП и других синуклеинопатий, – какая из широкого перечня стадий агрегации α -синуклеина является наиболее токсичной для клеток. Этот перечень возможных конформаций α -синуклеина включает: а) развернутое состояние (при физиологических условиях *in vivo*), б) глобулярную форму (при высокой температуре, в присутствии ионов металлов, солей, некоторых гербицидов, пестицидов и при других условиях), в) α -спиральную мембрано-связанную форму (при взаимодействии α -синуклеина с синтетическими везикулами, содержащими кислые фосфолипиды), г) состояние в виде α -спиралей и β -слоев (при добавлении спиртов), д) димеры (при пролонгированной инкубации при высокой температуре), е) олигомеры, ж) крупные нерастворимые включения двух типов: аморфные агрегаты и фибриллы (Uversky, 2007; Пастухов, Чеснокова, 2010). Конечным этапом кластеризации α -синуклеина является образование телец Леви. Показано, что инкубация сферических олигомеров α -синуклеина с молекулярным весом 2,5–4,2 нм с мембранами, выделенными из мозга, приводит к формированию пороподобных кольцевых протофибрилл; предполагается, что именно эта стадия α -синуклеиновой агрегации приводит к гибели клетки (Ding et al., 2002). Тельца Леви, видимо, выполняют защитную функцию в клетке, аккумулируя токсичные для нейронов белки и предотвращая их распространение. В пользу последнего предположения свидетельствует тот факт, что при мутации белка паркина развивается аутосомно-рецессивный ювенильный паркинсонизм, не сопровождающийся образованием телец Леви, но приводящий к накоплению растворимых олигомерных форм α -синуклеина и к гибели клеток (Hardy et al., 2003).

Ранее полагали, что молекула α -синуклеина обладает необычными конформационными свойствами, представляя собой нативно неуложенный белок, который обладает слабоупорядоченной или неупорядоченной структурой при физиологических условиях *in vivo*, т.е. у него отсутствует четко заданная пространственная структура (Uversky, 2007; Пастухов, Чеснокова, 2010).

Работы последних лет (Bartels et al., 2011; Trexler, Rhoades, 2012; Westphal, Chandra, 2012) показали, что эндогенный внутриклеточный α -синуклеин существует преимущественно в виде α -спирального уложенного тетрамера с молекулярной массой ~58 кДа. Тетрамеры α -синуклеина не образуют агрегатов, однако в случае нарушения процесса формирования тетрамеров свободные спиральные мономеры белка начинают слипаться друг с другом, образуя амилоидные волокна, которые впоследствии формируют тельца Леви в нервных клетках. Пока последовательность образования амилоидных волокон не ясна, возможно, их формируют мономеры с изначально нарушенной структурой, не способные к объединению в тетрамеры, либо функциональные тетрамеры в клетке по какой-то причине разрушаются, и высвободившиеся мономеры начинают слипаться (Dettmer et al., 2013). В любом случае разработка метода стабилизации тетрамеров α -синуклеина может стать эффективным инструментом замедления нейродегенеративного процесса, а быть может, и предотвращения развития БП.

1.5. Альфа-синуклеин и современная классификация доклинических и клинических стадий болезни Паркинсона

Основной недостаток известной классификации (Hoehn, Yahr, 1967) состоит в том, что продолжительный (до 10–30 лет) и наиболее важный для лечения период болезни, который предшествует моторным симптомам, в ней не представлен. Постепенно накапливались данные о распределении в мозге агрегаций α -синуклеина в виде телец и нейритов Леви, которые служат основанием для выделения последовательных стадий БП. При этом отмечено очень важное обстоятельство – локализация агрегаций α -синуклеина может быть связана с особенностями архитектуры нервных клеток. Типы нервных клеток, подверженные такой опасности, имеют длинные и тонкие аксоны, лишённые миелина или мало миелинизированные (Braak, Del Tredici, 2004). В то же время, нервные клетки с длинными и короткими аксонами, обособленными миелиновым футляром толстого калибра, оказываются защищенными от образования конгломератов α -синуклеина и сохраняют свою морфологическую и функциональную целостность в течение всего периода развития БП. Это означает, что нейрональные повреждения в мозге, возникающие в процессе БП, совсем не случайны, а подчиняются определенным закономерностям.

Рассматривая внутриклеточные включения белка α -синуклеина в качестве основного индикатора стадий БП (в сочетании с анализом ряда патологических, анатомических и клинических данных), сотрудники Института клинической нейроанатомии (Фракфурт-на-Майне, Германия) разработали новую классификацию стадий нейродегенеративного процесса, описывающую не только клинические, но и доклинические, или премоторные стадии БП (Braak, Del Tredici, 2005; Braak et al., 2003, 2004, 2006, 2007; Del Tredici, Braak, 2004; Hawkes et al., 2007). Согласно гипотезе (Braak et al., 2003, 2004), тельца Леви с включенными в них агрегатами неправильно свернутого белка α -синуклеина развиваются последовательно, начинаясь с предрасположенных к ним определенных групп нейронов, и продвигают-

ся в топографически предсказуемой последовательности в другие области серого вещества, уязвимые для дегенерации. Показатели процесса нейродегенерации в динамике 6-и стадий БП (рис. 3) ранее изложены в обзоре (Пастухов, Чеснокова, 2010). Кратко резюмировать данные франкфуртской группы, положенные в основу новой классификации, можно следующим образом.

1. БП относят к заболеваниям, именуемым как «синуклеинопатии», в основе которых лежит образование внутриклеточных включений белка α -синуклеина в виде телец и нейритов Леви.

2. В патологию Леви при БП вовлечены предрасположенные к поражению типы нервных клеток, которые имеют длинные и тонкие аксоны, лишённые миелина или мало миелинизированные.

3. На доклинических, премоторных стадиях (стадии 1 и 2), когда классические для БП моторные симптомы отсутствуют, патология Леви ограничивается серым веществом в двух областях – продолговатом мозге и покрышке варолиева моста, а также в обонятельной луковице и переднем обонятельном ядре.

4. На поздней доклинической и ранней клинической стадиях (стадии 3 и 4), когда появляются первые моторные симптомы, фокусом сначала незначительной, а затем все более существенной патологии Леви становятся черная субстанция и ядра серого вещества в среднем и переднем мозге.

5. На поздних клинических стадиях (стадии 5 и 6) процесс захватывает области новой коры и болезнь проявляется в полном клиническом объеме; типичной чертой этих стадий являются когнитивные нарушения и деменция.

Необходимо отметить, что ряд положений новой классификации остаются дискуссионными и требуют уточнений. Образование телец и нейритов Леви обнаружено

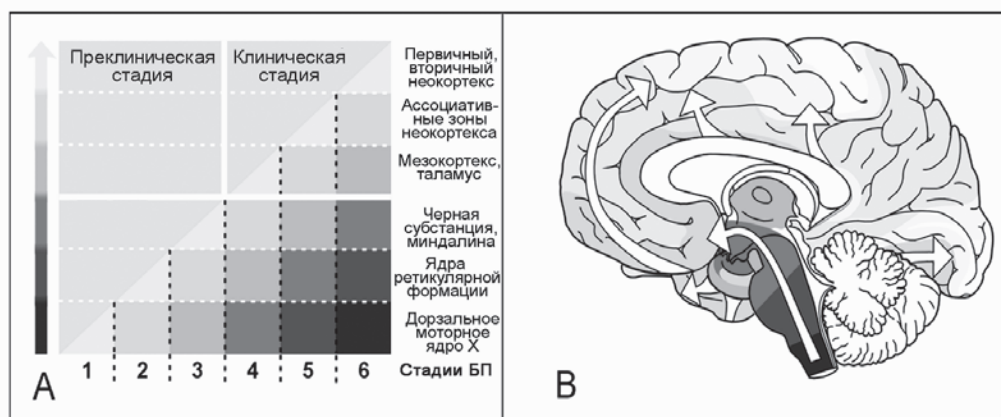


Рис. 3. Преклинические и клинические стадии БП

А – преклинические стадии характеризуются появлением телец/нейритов Леви в мозге. В клинических стадиях происходит дальнейшая прогрессия нейропатологических изменений. Интенсивность окрашивания (от светло-серого до черного) квадратов под диагональной линией показывает нарастание тяжести поражения в чувствительных областях мозга (справа). В – на рисунке стрелками изображено распространение патологического процесса. Оттенки серого соответствуют рисунку А, по (Braak et al., 2004)

при различных заболеваниях, рассматриваемых как синуклеинопатии (см. табл. 1), а также при прогрессирующем надъядерном параличе и болезнях Пика и Альцгеймера (Jellinger, 2003a; Shults, 2006; Uversky, 2007). Например, при иммуногистохимическом исследовании мозга 260 пожилых людей выявлено наличие телец Леви не только при БП и деменции с тельцами Леви, но и примерно в 50% случаев диагноза болезни Альцгеймера и у 30% пожилых людей без нейропсихиатрических нарушений (контроль); данные сочетались с клиническим обследованием и были подтверждены аутопсией (Jellinger, 2004). Патология Леви встречается при болезни Альцгеймера, не сопровождающейся симптомами паркинсонизма (Jellinger, 2003b).

Трудно дать убедительное объяснение приведенных выше удивительных данных об одновременном начале образования агрегаций Леви в двух, отдаленных друг от друга, областях – в продолговатом мозге/покрышке варолиева моста и обонятельной луковице/переднем обонятельном ядре. Авторы новой классификации выстраивают между этими областями красивую нейронную сеть из маломиелинизированных аксонов, но «строительного материала» недостаточно. Чрезвычайно ответственным является положение гипотезы об отсутствии патологии Леви в черной субстанции на доклинических стадиях 1 и 2.

Ряд авторов обнаружили отклонения от прогнозируемого гипотезой франкфуртской группы каудально-рострального направления α -синуклеиновой патологии и полагают, что они могут быть связаны с генетической предрасположенностью или сопутствующими заболеваниями (Kalaitzakis et al., 2008; Parkkinen et al., 2008). Эти данные позволяют предполагать, что путь, описанный в работах (Braak et al., 2003, 2004, 2007), не является единственным путем распространения в мозге α -синуклеиновой патологии. Объяснением этих несоответствий может стать предположение о распространении патологии не только в ретроградном, но и антероградном направлении. Кроме того в работе (Halliday et al., 2008) было отмечено, что пациенты с началом БП в более раннем возрасте и с длительным течением имели патологию, соответствующую франкфуртской модели, а пациенты с более поздним наступлением БП и коротким течением болезни – не соответствующую ей.

Следовательно, основные сомнения и уточнения касаются каудально-рострального направления нейродегенеративного процесса и той последовательности включения в него различных областей мозга, которую предопределяет гипотеза о стадиях БП (Braak et al., 2003). Роль накопления агрегаций α -синуклеина в патогенезе БП признается большинством исследователей.

2. Современные представления о роли убиквитин-протеасомной системы в патогенезе болезни Паркинсона

Убиквитин-протеасомная система осуществляет чрезвычайно важную функцию, которую еще недавно недооценивали, – постоянную деградацию большинства клеточных белков (Ebrahimi-Fakhari et al., 2012 и др.). Протеасома – (от англ. *protease* – протеиназа и лат. *soma* – тело) – белковый комплекс, содержащийся в цитоплазме и ядре эукариотических клеток, 26S-протеасома образуется в резуль-

тате связывания 2 регуляторных 19S-частиц с 20S-протеасомой. Большинство белков направляются в 26S-протеасому после прикрепления к ним полиубиквитиновой цепочки, фермент убиквитин-лигаза контролирует специфичность процесса деградации белков. За открытие «каскадного» механизма расщепления белков в протеасоме трем исследователям (**A. Hershko, F. Ciechanover, I. Rose**) в 2004 г. присуждена Нобелевская премия по химии. Протеасомная система осуществляет деградацию большинства внутриклеточных белков, включая ключевые регуляторные белки (циклины, фосфатазы, киназы, факторы транскрипции и трансляции и др.), и вовлечена в регуляцию клеточного цикла, транскрипции и трансляции, передачи сигналов, образования синапсов, синаптической пластичности, реакции клеток на различные стрессовые воздействия и множества других жизненно важных процессов (Сорокин и др., 2009; Segref, Norpe, 2009).

2.1. Снижение функции убиквитин-протеасомной системы – ключевой механизм болезни Паркинсона

В последние годы обращается внимание на неправильную укладку белков как на наиболее серьезную угрозу для функционирования и выживания клеток и основную причину развития нейродегенеративных заболеваний (Haass, Selkoe, 2007; Пастухов, Чеснокова, 2010; Neef et al., 2011 и др.). **Протеасомная система препятствует** неправильной укладке белков, обеспечивая сохранение здоровой популяции клеток за счет деградации аномальных белков в цитоплазме, ядре и эндоплазматической сети.

Ослабление работы протеасомной системы, ответственной за своевременную деградацию большинства белков (в первую очередь, мутантных, поврежденных и состарившихся), приводит к нарушению укладки белков и накоплению в нейронах токсичных олигомеров белка α -синуклеина. Связанная с этим механизмом дегенерация клеток в различных структурах мозга, в том числе ДА-ергических нейронов черной субстанции и их аксонов в стриатуме, играет существенную роль при старении и в патогенезе спорадической и наследственной форм БП (Пастухов, Чеснокова, 2010; Cook, Petrucelli, 2009; Ebrahimi-Fakhari, 2012; McNaught et al., 2010; Uversky, 2007).

2.2. Основные принципы моделирования стадий болезни Паркинсона на основе дисфункции протеасом нигростриатной системы

Одна из причин «неизлечимости» БП – поздняя постановка диагноза – через 10–30 лет от начала болезни, когда погибают более половины ДА-ергических нейронов черной субстанции и их аксонов в стриатуме и проявляются моторные симптомы. Важнейшей задачей является разработка адекватных моделей БП у животных, особенно моделей доклинической стадии, которые направлены на вмешательство в ключевые механизмы патогенеза, воспроизводят стадии нейродегенера-

тивного процесса и позволяют ускорить поиск ранних симптомов БП и выяснение компенсаторных и нейропротективных механизмов, необходимых для обоснования стратегии превентивной терапии (Угрюмов, 2010а,б; Ugumov et al., 2011; Пастухов, 2013).

В настоящее время широко известны модели БП у животных с применением нейротоксинов (6-гидроксидофамина, ротенона, параквата, манеба) (Betarbet et al., 2006; McNaught et al., 2010 и др.). **К сожалению, в большинстве моделей воспроизводятся симптомы «неизличимой» клинической стадии БП с глубокой деградацией nigrostriатной системы.** Адекватные модели доклинической стадии паркинсонизма созданы на мышах линии C57BL/6 на основе пролонгированного действия специфического токсина ДА-ергических нейронов МФТП (1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридина) (Хаиндрава и др., 2010; Хакимова и др., 2011; Ugumov et al., 2011 и др.). Детально изучены характеристики компенсаторных процессов, указывающие на активацию резервов нейропластичности nigrostriатной ДА-ергической системы, разработаны методы диагностики доклинической стадии на основе химической провокации моторных симптомов, получен ряд других важных фактов. Разработка моделей доклинической стадии БП на основе дисфункции протеасомной системы не проводилась. В ряде работ (Fornai et al., 2003; Ahn, Jeon, 2006; Niu et al., 2009) изучались лишь показатели модели моторной, или клинической стадии, не поддающейся излечению. В обзоре, специально посвященном описанию моделей БП у животных (Tieu, 2011), модели на основе угнетения протеасомной активности вообще не представлены.

При создании моделей паркинсонизма у крыс Вистар на основе дисфункции протеасом нами использован специфический ингибитор ферментативной активности протеасом лактацистин (Пастухов и др., 2009, 2010а, 2011). Лактацистин синтезируется почвенными микроорганизмами (*Streptomyces lactacystinaeus* и другими) и рассматривается как природный нейротоксин; предполагается, что в течение многих лет он может поступать с пищей и водой и накапливаться в организме человека (McNaught et al., 2004). При сопоставлении различных методических схем определены оптимальные дозы и временные режимы применения ингибитора. Микроинъекции лактацистина и контрольного раствора выполнялись билатерально в компактную часть черной субстанции через заранее имплантированные проводящие канюли.

Разработке режима пролонгирования мы уделили особое внимание: оно достигалось за счет а) повторного двустороннего введения лактацистина в черную субстанцию в дозе 0,4 мкг (в модели доклинической стадии) и в дозе 4 мкг (в модели клинической стадии) с интервалом 7 суток и путем продления его действия после второго введения до 14 суток (до 21–28 дней от первой микроинъекции нейротоксина) (Пастухов и др., 2009; Пастухов, 2013). Это в некоторой мере приближает животную модель к длительным срокам развития болезни у человека, уменьшает острые проявления токсических эффектов нейротоксина и дает возможность судить о динамике процесса нейродегенерации, состоянии компенсаторных и нейропротективных резервов и возможности их активации как мишеней для поиска лекарственных средств, способных предотвратить или остановить развитие нейро-

дегенерации (Угрюмов, 2010б; Ugrumov, 2011; Пастухов и др., 2010а, 2011; Пастухов, 2013).

Выбор черной субстанции в качестве основной мишени при создании модели паркинсонизма имеет несколько веских причин. Во-первых, nigrostriатная DA-ергическая система, включающая нейроны черной субстанции, их терминалы в стриатуме, является ключевым звеном центральной регуляции моторного поведения и его нарушений при БП (Voeve, 2011; Braak et al., 2004 и др.). Дегенерация DA-ергических нейронов черной субстанции протекает достаточно длительно в течение 3-ей стадии (у человека это может продолжаться многие годы). Моторные симптомы появляются при потере около половины или более нейронов черной субстанции и их терминалей в стриатуме (Bernheimer et al., 1973; Угрюмов, 2010а), что дает возможность на такой микромодели точнее идентифицировать стадии до и после появления моторных симптомов. Во-вторых, черная субстанция отличается от других структур мозга высокой уязвимостью нейронов при старении и действии нейротоксинов, что обусловлено исходно низкой активностью в ней ферментов протеасом (Zeng et al., 2005). В-третьих, подобное отличие черной субстанции от других структур мозга подтверждено при изучении секционного материала, полученного *post mortem* у пациентов с БП. Установлено более выраженное снижение в черной субстанции основных ферментов протеасом (в среднем на 50%), α -субъединиц протеасом, ответственных за их сборку и функционирование (на 40%), и экспрессии протеасомных активаторов PA700 и PA28 (в среднем на 33%) (Furukawa et al., 2002; McNaught et al., 2002, 2010). Важно, что значительное уменьшение химотрипсин- и трипсиноподобной активностей протеасом отмечено в черной субстанции у пациентов с БП по сравнению с черной субстанцией лиц соответствующего возраста из контрольной группы. В то же время, отсутствие дефицита протеасомной активности или даже ее увеличение были зафиксированы в других отделах головного мозга (Cook, Petrucelli, 2009; Ebrahimi-Fakhari et al., 2012; McNaught et al., 2010).

Таким образом, в основу создания наших моделей БП у крыс положен путь специфического пролонгированного ослабления функции протеасом, ведущий к нарушению укладки белка α -синуклеина и дегенерации DA-ергических нейронов черной субстанции, наиболее уязвимых к этим процессам, характеризующим старение и БП у человека.

2.3. Экспериментальное моделирование стадий болезни Паркинсона у крыс на основе пролонгированной дисфункции протеасом nigrostriатной системы

При умеренном снижении протеасомной активности на модели доклинической стадии БП у крыс не обнаружено каких либо изменений в уровне двигательной, исследовательской и эмоциональной активности в тестах «открытое поле» и «приподнятый крестообразный лабиринт», а также тонких моторных дисфункций, оцениваемых по наиболее чувствительным тестам – «суок», «длина шага» и моторика передних конечностей, рта и языка. При умеренном угнетении функции протеасом

отмечаются потеря менее трети ДА-ергических нейронов компактной части черной субстанции и увеличение уровня ключевого фермента синтеза ДА тирозингидроксилазы в этих нейронах на 10%, а также отсутствие изменений в уровне этого фермента в волокнах дорзальной части стриатума (Пастухов и др., 2010а). Методом иммуноблоттинга обнаружены сходные изменения уровня тирозингидроксилазы в ткани черной субстанции и стриатума. Наиболее вероятным объяснением повышенного уровня тирозингидроксилазы в черной субстанции может быть активация механизмов мозга, направленных на компенсацию функциональной недостаточности nigrostriатной системы. Кроме того, выявлено увеличение средней длительности эпизодов и общего времени парадоксального сна и сохранение нейропротективных резервов nigrostriатной системы (Пастухов и др., 2011). Следовательно, на основе пролонгированной дисфункции протеасомной системы разработана модель доклинической стадии БП у крыс, которая не сопровождается дегенерацией большого числа ДА-ергических нейронов компактной части черной субстанции и нарушениями моторного поведения, но приводит к изменениям временных характеристик парадоксального сна как показателя немоторного поведения (Пастухов и др., 2010а).

С целью изучения стадийности процесса дегенерации в nigrostriатной системе и его последствий разработаны модели клинической стадии БП у крыс Вистар (Пастухов, 2013). Показано, что глубокое снижение протеасомной функции, пролонгированное до 21 дня от начала микроинъекций лактацистина, характеризуется: 1) потерей 55–60% ДА-ергических нейронов компактной части черной субстанции и почти 70% их терминалей в стриатуме; 2) появлением первых признаков моторной дисфункции; 3) кратковременным повышением уровня тирозингидроксилазы вследствие уменьшения ее аксонного транспорта. Сравнение данных показывает, что модель умеренного снижения протеасомной функции в ДА-ергической nigrostriатной системе воспроизводит признаки доклинической, а модель глубокого снижения – клинической стадии БП. Совокупность этих признаков, включая изменения характеристик сна и уровня шаперона Hsp70 (Пастухов и др., 2010а, 2011), позволяет высказать предположение об ускорении процесса дегенерации ДА-ергических нейронов и крайнем напряжении компенсаторных и нейропротективных механизмов (Пастухов, 2013).

Это предположение находит подтверждение при дополнительном пролонгировании протеасомной дисфункции (до 28 дня от начала микроинъекций лактацистина): в течение такого короткого срока потеря ДА-ергических нейронов компактной части черной субстанции увеличивается до 65–70%, их терминалей в стриатуме – до 75%, а повышение уровня тирозингидроксилазы переходит в снижение. Эти трагические изменения, а также более значительное падение уровня шаперона Hsp70, обладающего стресс-защитными свойствами, отражают, очевидно, истощение компенсаторных и нейропротективных резервов nigrostriатной ДА-ергической системы и необратимость ее деградации, приближения нейродегенеративного процесса к точке «невозврата» (Пастухов, 2013).

Создание моделей пролонгированной дисфункции протеасом ДА-ергической системы у крыс, отражающих последовательные этапы развития нейродегенеративного процесса при БП, даст возможность оценивать динамику компенсаторных

и нейропротективных резервов, которые могут служить мишенью для поиска лекарственных средств, предотвращающих переход из доклинической в клиническую стадию БП.

II. ОБОСНОВАНИЕ ПРЕВЕНТИВНОЙ ТЕРАПИИ

3. Поиск доклинических немоторных маркеров паркинсонизма при изучении характеристик сна

В связи с тем, что одной из основных причин «неизлечимости» БП является поздняя постановка диагноза, важнейшей задачей является определение надежного комплекса ранних немоторных маркеров паркинсонизма, достаточных для выделения группы «риска» и разработки превентивного лечения (Гусев и др., 2010; Иллариошкин, 2011; Угрюмов, 2010а,б; Stiasny-Kolster et al., 2005 и др.). При подозрении на БП основное внимание обращается на показатели нарушений моторной функции, часть из них (тремор покоя, ригидность и/или брадикинезия) рассматриваются в качестве обязательной «визитной карточки» БП. В течение почти полувека для постановки диагноза БП используются различные варианты классификации (Hoehn, Yahr, 1967), состоящей в основном из 5–6 стадий моторных нарушений, характерных для клинической фазы БП. Однако помимо моторных симптомов, связанных с поражением дофаминергических систем, в клинической картине БП присутствуют немоторные проявления, которые включают вегетативные, психические, диссомнические, сенсорные и другие нарушения (Гусев и др., 2010; Литвиненко, 2006; Crevits, 2003; Gao et al., 2007; Magerkurth et al., 2005; O'Sullivan, 2008; Schestatsky et al., 2006).

3.1. Потенциальные немоторные маркеры паркинсонизма у человека

В клинических исследованиях в качестве главных потенциальных маркеров премоторных стадий БП рассматриваются гипо- и аносмия, дизавтономные признаки и расстройства сна, которые иногда могут возникать за 5–15 лет до моторных проявлений (Braak et al., 2003; Voeve et al., 2007; Iranzo, 2011).

Нарушения обоняния (повышение порога обоняния и реже – ухудшение способности различать и узнавать запахи) обнаружены у 90% пациентов с клиническим диагнозом БП, что даже выше процента проявления моторной триады/тетрады (70%). До 51% больных с БП страдают аносмией, 35% – тяжелой и 14% умеренной гипосмией (Stiasny-Kolster et al., 2005). Ряд авторов предполагают, что ухудшение обонятельной функции происходит задолго до развития БП (на 1-й доклинической стадии) (Hawkes et al., 2007). Накопление α -синуклеина и образование телец Леви в подслизистом слое кишечника, в периферических нейронах (слюнные железы, стенки сосудов, внутренние органы) и ретроградный транспорт патогенного фактора из нейронов мейснерова и ауэрбаховаго сплетения в моторное ядро блуждаю-

щего нерва могут быть основой для проявления вегетативных симптомов (Braak et al., 2004, 2006; Hawkes et al., 2007).

Почти все пациенты с БП страдают от снижения частоты и затруднения дефекации (Magerkurth et al., 2005); пациенты, склонные к запорам (менее одной дефекации в день), имеют в 3–4 раза повышенный риск развития БП. Запоры связаны со сниженной сократительной активностью толстого кишечника и на 10–12 лет предшествуют диагнозу БП (Abbott et al., 2001). **Запоры могут быть обусловлены поражением дорзального ядра блуждающего нерва на стадии 1** (Wolters, Braak, 2006). Через 16 лет после обнаружения у 32616 мужчин эректильной дисфункции у 200 из них развилась БП. Мужчины с нарушенной половой функцией имеют в 3,8 раза повышенный риск развития БП (Gao et al., 2007). **Другие вегетативные симптомы** – ортостатическая гипотензия, гипергидроз лица, рук, туловища, нарушение симпатической иннервации сердца, восприятия холода и тепла, ночная гипотермия, болевые ощущения («замороженное плечо»), а также анемия, дисфункция митохондрий в тромбоцитах и лимфоцитах, симптомы депрессии, нарушение цветного зрения сохраняют пока статус потенциальных доклинических маркеров (Hawkes et al., 2007; Гусев и др., 2010; Угрюмов, 2010а,б; Иллариошкин, 2011).

Противоречивыми остаются сведения о сроках появления аффективных расстройств – депрессии и тревожности. Имеются сообщения об их развитии как за 20 лет до клинического диагноза БП, так и после его постановки, хотя чаще это происходит за 3–5 лет до появления моторных феноменов (Burn, 2002; O'Sullivan, 2008). Некоторые из приведенных проявлений приобретают доминирующее клиническое значение, оказывая негативное влияние на «качество жизни» пациентов, приводя к их инвалидизации и сокращая продолжительность жизни. В клинических стадиях наиболее разрушительными следствиями БП для пациентов являются депрессии, тревожные состояния, деменция и психозы. Полноценный ночной сон мог бы служить «наградой» за мучения и уменьшать эти нарушения.

Нарушения сна и бодрствования у пациентов с БП. К сожалению, почти все пациенты с БП имеют самые различные расстройства сна: более частые пробуждения, приводящие к фрагментации сна и изменениям его структуры, синдром беспокойных ног, синдромы инсомнии и гиперсомнии, или повышенной дневной сонливости и синдром парасомнии «rapid eye movement (REM) sleep behavior disorder» (RBD) (парадоксальный сон без мышечной атонии) (Голубев, 2006; Голубев и др., 1999; Литвиненко и др., 2011; Пастухов, 2013; Comella, 2007; Larsen, 2003; Postuma et al., 2009 и др.). Классические моторные симптомы (тремор покоя, дискинезии, напряженность и скованность мышц, повышение мышечного тонуса или интенсивной физической активности в эпизодах парадоксального сна без мышечной атонии) являются факторами инсомнии, фрагментации сна и, видимо, синдрома повышенной дневной сонливости. Синдром инсомнии и другие ночные нарушения сна характерны для 60–98% пациентов с БП. Синдром беспокойных ног встречается у 20–25% пациентов с БП, что чаще, чем у здоровых людей (Abbott et al., 2001).

Частота синдрома повышенной дневной сонливости у пациентов с БП колеблется от 15,5% (Tandberg et al., 1999) до 50% (Ondo et al., 2001; Shpirer et al., 2006) и может достигать 84,5% (Литвиненко и др., 2011). В последней работе отмечено,

что этот синдром может сопровождаться когнитивными нарушениями, галлюцинациями, увеличением времени пробуждений и фрагментацией сна, снижением его эффективности, а также парасомнией RBD (у 80% пациентов). Противоречия в полученных данных касаются не только распространенности повышенной дневной сонливости, но и ее обусловленности различными факторами. Ряд авторов полагают, что синдром зависит от возраста, стадии болезни, скорости ее развития, наличия когнитивных отклонений (Ondo et al., 2001; Tandberg et al., 1999 и др.), в других работах влияние этих факторов отрицается (Shpirer et al., 2006 и др.).

Повышенная дневная сонливость – сложный феномен, который может проявляться или в виде длительного и непрерывного состояния дремоты, или в виде внезапных «сонных атак», напоминающих нарколепсию. Эти атаки особенно опасны и могут привести к травматизму, когда человек управляет транспортным средством или работает оператором. Кроме того, повышенная дневная сонливость может сочетаться с синдромом обструктивного сонного апноэ, нарколепсией и нейродегенеративными заболеваниями, включая БП (Iranzo, 2011). **Пока не ясно, может ли синдром быть предвестником развития БП.** В одной из работ с этой целью в течение 7 лет проводилась трехразовая неврологическая оценка большой группы (3078 человек). Повышенная дневная сонливость была выявлена у 244 человек, а развитие БП отмечено у 34 субъектов из них. Высказано предположение, что при развитии повышенной дневной сонливости риск появления БП возрастает в 2–3 раза (Abbott et al., 2005). К сожалению, в эту группу были включены только пожилые мужчины (старше 70 лет). Необходимы дальнейшие наблюдения.

В настоящее время сложилось представление, что только парасомния RBD может претендовать «на звание» раннего маркера паркинсонизма у части пациентов с БП.

3.2. Относительная специфичность парасомнии RBD как раннего маркера паркинсонизма

Парасомния RBD как предшественник паркинсонизма: клинические данные. В последние 15–20 лет все больше внимания уделяется таким нарушениям сна у пациентов с БП, которые предшествуют развитию паркинсонизма (Гусев и др., 2010; Voeve, 2011; Postuma et al., 2009; Schenck et al., 1996). **Чаще других в качестве раннего маркера рассматривается парасомния RBD. Термин RBD впервые был предложен в 1986 г. (Schenck et al., 1986).** Клиническая картина RBD – это демонстрация двигательного и эмоционального компонентов сновидений. Драматическое, часто буйное и искаженное поведение, ассоциированное с кошмарными сновидениями и включающее сноговорение, смех, крики, резкие удары руками и ногами, падение с кровати обычно приводится в жалобах-отчетах пациентов с заболеванием RBD. В течение ряда лет сновидения становятся более яркими, более насыщенными интенсивными движениями. Поведение пациентов во время сна напоминает езду в машине по ухабистой дороге, а их агрессия при сновидениях, размахивания руками, удары ногами, драки с преследователями часто приводят к синякам и повреждению

ям у партнеров по постели (Olson et al., 2000 и др.). Картина нарушений поведения в эпизодах ПС очень яркая, но более надежно RBD определяется при полисомнографическом обследовании.

Выделяют «идиопатический» RBD (iRBD), являющийся самостоятельным заболеванием и составляющий около 60% всех случаев парасомнии RBD, и «вторичный», или «симптоматический», сочетающийся с другим неврологическим заболеванием, например с нарколепсией или БП (Boeve et al., 2007; Luppi et al., 2011). Замечено, что с течением времени у части пациентов с iRBD могут развиваться БП или деменция с тельцами Леви (Fantini et al., 2003; Iranzo et al., 2009). Накопление числа субклинических отклонений и случаев, когда симптомы RBD предшествовали симптомам БП и других болезней, привели к гипотезе об RBD как раннем маркере паркинсонизма.

Первые данные о том, что RBD может претендовать на роль раннего маркера БП, были получены в 1996 г. В группе из 29 мужчин в возрасте от 50 лет и старше с синдромом iRBD в среднем через 3,7 лет после первого наблюдения почти у 40% пациентов обнаружено развитие паркинсонизма (Schenck et al., 1996). При дальнейшем обследовании (через 7 лет) число пациентов, у которых возникли симптомы паркинсонизма, возросло до 65% от исходного состава той же группы. В группе из 23 человек с iRBD у 57% через 11 лет было подтверждено развитие признаков БП (Tippmann-Peikert et al., 2006). В другой группе симптомы iRBD предшествовали развитию паркинсонизма или деменции у 67% членов группы (Boeve et al., 2007). У 44 пациентов с парасомнией iRBD, среди которых преобладали пожилые мужчины (89%, средний возраст составлял 74 года), у 20 из них (у 45%) через 11,5 лет после появления первых признаков iRBD определены симптомы БП или других неврологических расстройств (Iranzo et al., 2009). **Проведенные в Канаде тщательные наблюдения больших групп пациентов с iRBD, дополненные компьютерным моделированием, показали, что риск развития БП с течением времени после диагностирования iRBD возрастает, составляя около 18% через 5 лет, 40–41% через 10 лет и 52–53% через 12 лет (Postuma et al., 2009). Приведенные данные поддерживают гипотезу об RBD как раннем маркере БП у части пациентов: от 15–20 до 50% пациентов с iRBD, особенно мужчины пожилого возраста, подвержены риску развития паркинсонизма (Гусев и др., 2010; Boeve et al., 2007; Boeve, 2011; Iranzo, 2011; Postuma et al., 2009; Trotti, 2010).**

Вместе с тем, было замечено, что поведение, близкое по клинической картине к iRBD, может наблюдаться при обструктивном апноэ во время сна, при снохождении и кошмарах у взрослых, при посттравматических заболеваниях, у пациентов с нарколепсией, при отмене алкоголя и синдроме наркотической абстиненции, при использовании различных антидепрессантов (Iranzo, 2011; Trotti, 2010).

Данные, ограничивающие применение RBD при диагностике доклинической стадии. Сообщения последних 10–15 лет привели к пониманию того, что iRBD является компаньоном не только БП, но и всех синуклеинопатий: БП, болезни с тельцами Леви, БП с деменцией, деменции с тельцами Леви, мультисистемной атрофии и других (Gagnon et al., 2006; Stiasny-Kolster et al., 2005; Trotti, 2010). Частота встречаемости RBD у пациентов с БП зависит от использованных методов

диагностики (Boeve, 2011). Пациенты с БП и RBD, как правило, пожилые люди, в основном мужчины, страдают повышенной дневной сонливостью, обычно имеют диагноз ортостатической гипотензии; ригидно-дрожательная форма БП у таких пациентов наблюдается реже, чем у пациентов без RBD; когнитивные нарушения встречаются в 6,5 раз чаще у пациентов с БП и RBD, чем при БП без RBD (Postuma et al., 2009). Сочетание деменции с тельцами Леви с предшествующим диагнозом iRBD является наиболее частой формой деменции: клинические симптомы при такой форме обнаруживаются у 60–90% больных (Boeve, 2011). Мультисистемная атрофия – нейродегенеративное заболевание, видимо, наиболее тесно связанное с синдромом iRBD, но в отличие от всех форм RBD и сочетаний RBD с БП или с деменцией с тельцами Леви преобладание мужчин среди пациентов для этой двойной патологии не характерно (Olson et al., 2000). Клинические симптомы iRBD при этом заболевании идентифицируются у 70–100% пациентов, а полисомнографические признаки – у 90–100% пациентов (Vetrugno et al., 2004). Парасомния iRBD может на несколько лет или более длительно предшествовать появлению моторных и когнитивных признаков при этих синуклеинопатиях. Клинические наблюдения, начатые в январе 1990 г. и закончившиеся в декабре 2006 г., показали, что БП и другие синуклеинопатии развиваются в среднем у 97% пациентов с предварительным диагнозом iRBD (Boeve et al., 2007). В обзоре (Iranzo et al., 2009) сопоставлены суммарные данные о частоте развития трех синуклеинопатий, ассоциированных с iRBD: БП (46–58%), деменции с тельцами Леви (50–80%) и мультисистемной атрофии (90–100%). RBD редко наблюдается при таупатиях и других нейродегенеративных заболеваниях (Boeve et al., 2007; Stiasny-Kolster et al., 2005); отмечено сочетание RBD с прогрессирующим супрануклеарным параличом, при котором симптомы паркинсонизма связаны скорее с тау-патологией, а не синуклеинопатией. У пожилых людей при очаговых поражениях в результате ишемического инсульта, которые распространяются на структуры в стволе мозга, участвующие в контроле ПС, также могут наблюдаться RBD (Iranzo et al., 2009).

Таким образом, iRBD сочетается с широким спектром нейродегенеративных заболеваний, но наиболее часто с тремя синуклеинопатиями – мультисистемной атрофией, деменцией с тельцами Леви и БП. Они имеют общую природу, связанную с α -синуклеиновыми отложениями, которые обнаруживаются и при аутопсии у пациентов с iRBD. Продолжительность периода от появления синдрома iRBD до развития признаков паркинсонизма или деменции в большинстве случаев составляет минимально от 4 до 12 лет, что предоставляет возможность терапевтического вмешательства для приостановки или предотвращения развития моторных и когнитивных симптомов (Boeve et al., 2007). Однако следует учитывать относительную специфичность iRBD как раннего маркера паркинсонизма по сравнению с деменцией с тельцами Леви и мультисистемной атрофией.

В литературе имеются другие сведения, ограничивающие действие гипотезы об iRBD как раннем маркере паркинсонизма: 1) наличие RBD у пациентов с БП не связано с тяжестью заболевания, использованием ДА-ергических лекарств или наступлением деменции (Wetter et al., 2000; De Cock et al., 2007); 2) симптомы iRBD-могут не только предшествовать клиническим стадиям БП, но и возникать одно-

временно или позднее (Olson et al., 2000); 3) iRBD ассоциировано с повышенным риском возникновения галлюцинаций и встречается в 3 раза чаще у пациентов с БП, у которых возникают галлюцинации (Pacchetti et al., 2005).

3.3. Нейроанатомическая последовательность α -синуклеиновой патологии и синдром RBD

Выраженная ассоциация клинических симптомов паркинсонизма и синдрома iRBD позволяет предположить, что существует нейроанатомическая взаимосвязь между этими двумя заболеваниями. Наиболее частая встречаемость RBD при синуклеинопатиях указывает на избирательную уязвимость нейрональных структур ствола мозга.

Классические представления о вовлечении структур ствола мозга в патофизиологию RBD у человека базируются преимущественно на их изучении у кошек и крыс (Boeve et al., 2007; Boeve, 2011; Luppi et al., 2011). Предполагается, что структуры и нервные сети у человека, связанные с парадоксальным сном, соответствуют моделям у животных. В 2002–2003 гг. было идентифицировано маленькое по размерам сублатеродорсальное ядро (*sublaterodorsal nucleus*) у крыс, которое является аналогом области под голубым пятном (*subcoeruleus*) или вентральное голубого пятна (*peri-locus coeruleus*) у кошек и главной структурой, ответственной за парадоксальный сон (Boissard et al., 2003). Глутаматергические нейроны сублатеродорсального ядра или аналогичного ядра у кошек имеют проекции к глицин/ГАМК-ергическим интернейронам вентральных рогов спинного мозга; последние угнетают моторные нейроны, продуцирующие мышечную атонию во время парадоксального сна. Доказательства ключевой роли нейронов сублатеродорсального ядра в инициации парадоксального сна, формировании iRBD или ассоциации его с синуклеопатиями представляются достаточно убедительными. Электролитические и нейрохимические повреждения этого ядра устраняют атонию тонических мышц и повышают активность фазических мышц, что проявляется в виде подергиваний конечностей и двигательной демонстрации страха, оборонительного поведения или агрессии. Высказана гипотеза, что это обусловлено поражением только одной из субпопуляций глутаматергических нейронов сублатеродорсального ядра, запускающих парадоксальный сон; она отвечает за индукцию мышечной атонии через нисходящие проекции к премоторным ГАМК/глицинергическим нейронам вентрального ретикулярного гигантоклеточного ядра (Luppi et al., 2011).

Согласно современной классификации БП (Braak et al., 2003, 2004), выделяются 6 стадий нейродегенеративного процесса, в основе которых лежит образование в структурах мозга внутриклеточных включений белка α -синуклеина в виде телец и нейритов Леви: 3 доклинические, или премоторные, и 3 клинические (см. рис. 3) (Пастухов, Чеснокова, 2010). На стадии 2 поражаются гигантоклеточное ядро ретикулярной формации продолговатого мозга, области вентральное голубого пятна и сублатеродорсальное ядро. Критическим условием проявления синдрома iRBD является достаточная дегенерация сублатеродорсального ядра. Для стадии 3 харак-

терна дегенерация ядер ножек моста, черной субстанции и базальных ядер Мейнерта. Паркинсонизм и типичные для него моторные симптомы выявляются при достаточной дегенерации черной субстанции, а когнитивные нарушения – при дегенерации ядер Мейнерта. На стадиях 4–6 поражения охватывают структуры лимбической системы и новой коры. Именно такая последовательность распространения в мозге α -синуклеиновой патологии может быть использована для объяснения, почему **iRBD предшествует паркинсонизму, когнитивным нарушениям (конец стадии 3 и стадия 4) и деменции (стадии 4–6)** у многих пациентов с синуклеинопатиями (Гусев и др., 2010; Пастухов, Чеснокова, 2010; Voeve, 2011; Voeve et al., 2007; Braak et al., 2004 и др.).

3.4. Изменения парадоксального сна на доклинической и клинической стадии у животных и при болезни Паркинсона у человека

Выше мы привели ряд фактов, ослабляющих гипотезу об **iRBD как раннем немоторном маркере БП** и ограничивающих его применение при диагностике доклинических стадий. Признается необходимость дальнейшего поиска ранних маркеров БП, в том числе полисомнографических, доступных для широкого применения в клинике. Ускорения поиска таких маркеров можно достичь при создании моделей доклинической стадии у животных. При умеренном угнетении функции протеасом в разработанной нами модели доклинической стадии БП у крыс при отсутствии моторной дисфункции выявлены изменения архитектуры сна – увеличение общего времени парадоксального сна на 40% во время неактивной фазы суток (Пастухов и др., 2010a). Это увеличение обусловлено возрастанием средней длительности его эпизодов, что указывает на активацию механизмов поддержания парадоксального сна; число эпизодов не изменяется. Анализ спектральных характеристик ЭЭГ свидетельствует о повышении пропорции поверхностного парадоксального сна. Следовательно, модель доклинической стадии паркинсонизма у крыс, созданная на основе пролонгированной дисфункции протеасомной системы, не сопровождается дегенерацией большого числа ДА-ергических нейронов черной субстанции и нарушениями моторного поведения, но приводит к изменениям временных характеристик парадоксального сна как показателя немоторного поведения. Отмеченные в доклинической стадии увеличение уровня тирозингидроксилазы (на 10%) и содержания Hsp70 (на 47%) в большинстве выживших нейронов компактной части черной субстанции ставят вопрос, не является ли увеличение общего времени парадоксального сна ранним немоторным маркером повышенного уровня доступных для мобилизации компенсаторных и нейропротективных резервов ДА-ергической nigrostriatной системы в доклинической стадии, когда еще не проявляются нарушения моторного поведения?

Мы предположили, что ответу на этот вопрос может помочь изучение тех же показателей на модели клинической стадии: если он маркер доклинической стадии, то при истощении нейропротективных резервов ДА-ергической nigrostri-

атной системы в клинической стадии его признаки могут не проявиться. Показано, что глубокое снижение протеасомной функции характеризуется увеличением представленности поверхностного медленного сна и парадоксального сна в модели при пролонгировании до 21 дня и отчетливой тенденцией к уменьшению продолжительности парадоксального сна в модели при пролонгировании до 28 дня (Пастухов, 2013). Изменения сна в первой модели клинической стадии, сочетающиеся с появлением первых симптомов моторной дисфункции и снижением уровня Hsp70i, могут быть признаком ускорения процесса дегенерации ДА-ергических нейронов и крайнего напряжения компенсаторных и нейропротективных механизмов, а уменьшение парадоксального сна во второй модели клинической стадии, соответствующее падению уровня тирозингидроксилазы и содержания шаперона Hsp70i в нейронах компактной части черной субстанции, может отражать, по-видимому, истощение компенсаторных и нейропротективных механизмов. Высказано предположение об изменениях временных показателей парадоксального сна и спектральных характеристик ЭЭГ в эпизодах парадоксального сна и медленного сна, выявленных в моделях пролонгированных доклинической и клинических стадий БП как признаках, отражающих состояние компенсаторных и нейропротективных резервов nigrostriатной ДА-ергической системы на разных этапах развития БП (Пастухов и др., 2010а; Пастухов, 2013).

К сожалению, данные о влиянии лактацистина и других ингибиторов протеасомной системы на показатели сна и бодрствования в литературе отсутствуют. Увеличение парадоксального сна было найдено через 2–3 недели после введения 6-гидроксидофамина крысам в цистерну мозга (Hartmann et al., 1971) или в стриатум (Decker et al., 2000) и после внутрибрюшинного введения МФТП мышам (Laloux et al., 2008; Monaca et al., 2004). МФТП вызывал увеличение парадоксального сна, близкое по величине к действию лактацистина у крыс при дегенерации около трети нейронов черной субстанции. Однако авторы не располагают данными о точной локализации действия МФТП и полагают, что изменения парадоксального сна обусловлены его влиянием не только на ДА-ергические нейроны nigrostriатной системы, но и другие медиаторные системы. Кроме того, авторы не связывают эффекты МФТП с моделью доклинической стадии.

Показано, что у пациентов на клинической стадии БП (когда дегенерируют более половины нейронов черной субстанции и компенсаторные резервы nigrostriатной системы могут истощаться) по сравнению со здоровыми добровольцами обнаружено уменьшение общего времени всего ночного сна (на 18%) и пропорции парадоксального сна (в 2 раза) (Shpirer et al., 2006). В наших опытах при глубоком угнетении функции протеасом после локального введения лактацистина в черную субстанцию у крыс выявлена только тенденция к уменьшению парадоксального сна, несмотря на глубокое снижение показателей компенсаторных процессов и уровня шаперона Hsp70i. Такое значительное сокращение времени парадоксального сна у пациентов с БП может быть обусловлено вовлечением в процесс дегенерации более широкого круга структур, участвующих в его регуляции. В работе (Luppi et al., 2011) сообщается, что сокращение общего времени парадоксального сна об-

наруживается только после обширного поражения сублатеродорзального ядра, которое включает субпопуляцию нейронов с восходящими проекциями.

А.А. Буриков и О.А. Андриенко (Пастухов и др., 2009) показали, что у пациентов с БП в сравнении со здоровыми добровольцами происходит уменьшение не только ночного, но и дневного парадоксального сна. Анализ дневного сна – более легкая и более дешевая процедура по сравнению с анализом ночного сна. Полученные данные позволяют рекомендовать изучение дневного сна как более дешевой и более доступной для клиник процедуры по сравнению с регистрацией ночного сна; она не требует помещения пациента в стационар и более адекватна при широких профилактических обследованиях населения.

4. Перспективы разработки превентивного лечения болезни Паркинсона на основе мобилизации системы молекулярных шаперонов

Согласно современному представлению, разработка фармакологической стратегии лечения БП должна быть направлена не столько на облегчение симптомов, сколько на предотвращение лежащего в основе патогенеза БП накопления белков с неправильной укладкой (см. раздел 1), ведущего к гибели нейронов (Neef et al., 2011; Jones et al., 2014 и др.). В процессе эволюции возникли две основные молекулярные системы, препятствующие неправильной укладке белков и нейрональной дисфункции – убиквитин-протеасомная и шаперонная системы. Ослабление работы протеасомной системы сопровождается нарушением укладки белка α -синуклина, что может привести к фатальному накоплению его токсичных олигомеров и гибели клеток (Uversky, 2007; Пастухов, Чеснокова, 2010; Ebrahimi-Fakhari et al., 2012). Разработанные нами модели протеасомной дисфункции направлены на экспериментальное моделирование последовательных стадий процесса нейродегенерации (см. раздел 2), имитирующего основные этапы развития БП (Пастухов и др., 2010; Пастухов, 2013).

Шапероны семейства HSP70 отвечают за корректность синтеза и восстановление «качества» белков с нарушенной укладкой, а также помогают транспортировать аномальные белки в протеасому для «сжигания». Этот механизм работает, видимо, на всех ступенях эволюции, начиная с момента появления в прокариотах первых «белок-синтезирующих машин». Постепенно накапливаются данные о том, что шапероны HSP70 могут быть первой линией защиты при нарушении укладки белков и развитии нейродегенерации (Ebrahimi-Fakhari, 2011).

4.1. О нейропротективных свойствах шаперонной системы белков теплового шока

Функционирование убиквитин-протеасомной системы тесно связано с шаперонной системой. Шапероны семейства HSP70, обладая широчайшим спектром активностей, вовлекаются не только в процессы пространственной укладки вновь

синтезированных белков и восстановление «качества» нарушенных клеточных белков (Bukau et al., 2006; Hartl, Hayer-Hartl, 2002, 2013), но и участвуют в сборке и функционировании протеасом (Imai et al., 2003), облегчая их функцию по деградации белков (Wickner et al., 1999). Показано, что при недостатке шаперонов протеасомная функция ослабевает, а при повышении их содержания – восстанавливается (Ding, Keller, 2001). Это открывает перспективу выяснения нейропротективных свойств шаперонов при протеасомной дисфункции, типичной для патогенеза конформационных заболеваний. Кроме того, исследование взаимоотношений между убиквитин-протеасомной и шаперонной системами может проложить путь к пониманию молекулярных механизмов белковой агрегации и деградации.

К настоящему моменту накопилось достаточно фактов, что главный стресс-индуцибельный белок Hsp70 способен проявлять защитные эффекты не только на клеточном уровне, но и на организменном (Маргулис, Гужова, 2009; Пастухов и др., 2010б). Стресс-индуцибельный Hsp70 – первый белок, получивший название шаперон. Под шаперонной активностью понимается способность узнавать и складывать вновь синтезированные полипептидные цепи в активные молекулы белков, восстанавливать нарушенную структуру белков и транспортировать их в клеточные органеллы (Morimoto et al., 1997; Маргулис, Гужова, 2000). Шаперонная активность Hsp70 является ключевым аспектом в защите против повреждающих факторов, вызывающих неправильную укладку белков (Dedmon et al., 2005). Увеличение содержания Hsp70 в различных тканях, в том числе в нейронах и синаптических элементах структур мозга, приводит к повышению устойчивости организмов ко многим видам стресса, ишемии, токсическим воздействиям; нейропротективные свойства Hsp70 обнаружены в моделях эпилепсии, тревожных состояний, сепсиса, язвенной болезни, инфекционных и злокачественных заболеваний (Маргулис, Гужова, 2009; Пастухов, Екимова, 2005; Пастухов и др., 2010б; Ekimova et al., 2010; Turturici et al., 2011).

4.2. Вовлечение основного шаперона HSP70 в патогенез болезни Паркинсона

Функционирование шаперонов HSP70 в клетке связано: (1) с исправлением поврежденных белков, для которых требуется белок-укладывающая машина, называемая шаперонами (Hightower, 1991; Hartl, 1996) и (2) с деградацией денатурированных и аномальных белков, с которыми HSP70 связываются (Benn, Woolf, 2004; Meriin, Sherman, 2005). Дисфункция HSP70 может приводить к нарушению конформации белков и их агрегации, что может вносить вклад в патогенез БП и других конформационных заболеваний (Meriin, Sherman, 2005; Kim et al., 2013). Одним из прямых свидетельств, подтверждающих вовлечение молекулярных шаперонов в патогенез БП, явились результаты исследований тканей головного мозга (postmortem) у пациентов с БП, которые указывали не только на присутствие шаперонов семейства HSP70 в тельцах Леви (Auluck et al., 2002), но и на их ко-локализацию с агрегатами α -синуклиана (Leverenz et al., 2007). В 2002 г. высказаны

гипотезы (Auluck et al., 2002): (1) индуцибельный Hsp70 участвует в механизмах, ослабляющих токсичность олигомеров α -синуклеина; (2) перемещение шаперонов из цитозоля в агрегаты может привести к их истощению и последующей дегенерации клеток. Эти гипотезы были дополнены в последующих исследованиях. Было показано, что Hsp70 способен ингибировать образование фибрилл α -синуклеина за счет избирательного связывания с префибриллами, что приводит к ослаблению токсических свойств агрегатов α -синуклеина (Dedmon et al., 2005). Другие авторы обнаружили, что шаперон Hsp70 участвует как в поддержании нормальной конфигурации α -синуклеина, так и в деградации агрегатов синуклеина, которые представлены в мозге у пациентов с деменцией с тельцами Леви (Klucken et al., 2004; McLean et al., 2004). Не менее важными фактами, подтверждающими вовлечение шаперонов в развитие БП, явились также данные о низком содержании шаперонов семейства HSP70 в секционном материале черной субстанции (*postmortem*) у пациентов с БП (Jin et al., 2006; Alvarez-Erviti et al., 2010). Вскоре выяснилось, что это может быть связано с тем, что токсичные олигомеры синуклеина, взаимодействуя с J-домен-шаперонами, способны ингибировать систему шаперонов Hsp70/Hsp40 (Hinault et al., 2010). Считается, что риск развития БП значительно возрастает у людей, имеющих полиморфизм в 5' промоторном регионе гена Hsp70-1 (Wu et al., 2004). К группе риска относятся также пожилые люди. Показано, что с возрастом в нервных клетках ослабевает активность системы белков теплового шока, уменьшается синтез шаперонов Hsp70 и вместе с ним снижается контроль качества клеточных белков (Morimoto, 2008; Hindle, 2010). Это ведет к нарушению конформации белков и аномальному их отложению в ткани мозга. Таким образом, перечисленные данные указывают на вовлечение шаперонов семейства HSP70 в патогенез БП и ориентируют на новую молекулярную стратегию превентивного лечения БП, направленную на сохранение клеточного белкового гомеостаза и правильного белкового фолдинга с помощью шаперонов HSP70.

4.3. Защитные эффекты шаперона Hsp70 в моделях болезни Паркинсона

За последние 10 лет накопилось достаточно данных, подтверждающих нейропротективные эффекты шаперонов в моделях БП. Методами трансфекции гена Hsp70 или его трансдукции вирусными векторами показано, что увеличение экспрессии шаперонов семейства HSP70 уменьшает гибель DA-ергических нейронов в α -синуклеиновой модели БП у дрозофил и крыс (Auluck et al., 2002; Gorbatyuk et al., 2012) и МФТП-модели у мышей (Dong et al., 2005), повышает уровень DA и тирозингидроксилазы в стриатуме (Dong et al., 2005) и предотвращает нарушения в моторном поведении у мышей в токсической модели БП (Jung et al., 2008). Эксперименты с использованием теплового шока для мобилизации Hsp70 и других шаперонов показали сходный защитный эффект; тепловое прекондиционирование предотвращает синуклеин-индуцированную гибель клеток в дрожжевой модели БП (Flower et al., 2005) и уменьшает дегенерацию нейронов в черной субстанции

в лактацистиновой модели БП у крыс (Ahn, Jeon, 2006), а также ослабляет токсические эффекты ротенона в кортико-стриатных слайсах мозга крысы (Tantucci et al., 2009) и МФТП в клеточных моделях БП (Quigney et al., 2003; Fan et al., 2006). Уникальный защитный эффект шаперона Hsp70 в нейротоксических моделях БП связан, прежде всего, с его многофункциональным действием на белковые молекулы, которое направлено на предотвращение неправильной укладки белков и их агрегации. На рис. 4 представлен шаперонный механизм защитного действия молекулярной системы Hsp70. В совокупности приведенные результаты выдвигают на первый план возможность использования Hsp70 для превентивной терапии БП. Однако необходимо отметить, что применение у пациентов с БП и другими нейродегенеративными заболеваниями вирусных векторов для введения гена Hsp70 в «больные» нейроны не представляется возможным в связи с непредсказуемыми побочными эффектами, включая неожиданные иммунные реакции (Mingozzi, High, 2011). В то же время, использование физических факторов (тепловой и холодной стресс, гипоксия, магнитное поле и др.) для индукции шаперонов всерьез не рассматривается клиницистами в качестве перспективных терапевтических средств для лечения БП у пожилых людей, поскольку стресс и физические воздействия не вызывают у них такого отчетливого повышения экспрессии шаперонов, как у молодых. Поэтому необходим поиск новых эффективных терапевтических подходов к лечению этих разрушительных конформационных заболеваний. В последние 20 лет основной акцент ставится на препаратах, способных мобилизовать шаперонный механизм Hsp70 в нейронах головного мозга.



Рис. 4. Многофункциональное действие шаперона Hsp70 на молекулы α -синуклеина в моделях болезни Паркинсона

4.4. Терапевтический потенциал индукторов белков теплового шока и обоснование превентивной терапии болезни Паркинсона

В настоящее время в качестве потенциальных средств для терапии БП и других конформационных заболеваний рассматриваются препараты, действие которых состоит в индукции Hsp70. Особое внимание уделяется так называемым химическим шаперонам, т.е. малым молекулам, хорошо проникающим через гематоэнцефалический барьер. К ним относится, например, растительный препарат селастрол, который повышает более чем в 10 раз(!) активность фактора теплового шока 1 HSF1, что приводит к значительному увеличению уровня Hsp70 в клетках (Westerheide et al., 2004, Westerheide, Morimoto, 2005). Системное введение селастрола до и после обработки мышей нейротоксином МФТП сопровождается двукратным повышением уровня Hsp70 в черной субстанции по сравнению с контрольной величиной, а также на 40% ослабляет МФТП-индуцированную гибель DA-ергических нейронов (Cleren et al., 2005). Мощный нейропротективный эффект селастрола обнаружен также в модели БП у дрозофилы (Faust et al., 2009). Кроме селастрола проверку на Hsp70-индуцирующую активность и защитные свойства проходит ряд препаратов природного и синтетического происхождения: куркумин, вальпроевая кислота, геранилгеранилацетон, гелданамицин, аринокломол (Ebrahimi-Fakhari et al., 2011).

Среди перечисленных препаратов особое внимание заслуживают гелданамицин и аринокломол, обладающие высоким нейропротективным потенциалом. Гелданамицин входит в группу ансамициновых антибиотиков и является природным индуктором экспрессии шаперона Hsp70. **Hsp70-индуцирующая активность этого соединения основана на способности гелданамицина связываться с АТФ сайтом на молекуле Hsp90 и блокировать взаимодействие Hsp90 с HSF1.** Это приводит к активации HSF1 и увеличению синтеза Hsp70 (Auluck et al., 2005). **Важно отметить, что гелданамицин повышает экспрессию Hsp70 преимущественно в стрессированных клетках, в том числе пораженных нейротоксином «больных» нейронах, и не влияет на шаперонную активность здоровых клеток.** В 2002–2005 гг. опубликован ряд работ, демонстрирующих защитный эффект гелданамицина на DA-ергические нейроны в α -синуклеиновой модели БП в культуре клеток и у дрозофилы (McLean et al., 2004; Auluck et al., 2005), а также в модели МФТП у мышей (Shen et al., 2005). Кроме БП гелданамицин показывает терапевтический эффект в моделях болезней Хантингтона, Альцгеймера и бокового амиотрофического склероза (Ebrahimi-Fakhari et al., 2011). На мышинной модели последнего заболевания найден терапевтический эффект ко-индуктора шаперонов аринокломола (Kalmar et al., 2008, 2014). Этот препарат находится сейчас на 2-й стадии клинических испытаний у пациентов с боковым амиотрофическим склерозом и рассматривается рядом клиницистов как потенциальное средство для превентивной терапии нейродегенеративных заболеваний (Kalmar et al., 2014). Однако защитный эффект этого соединения еще не апробирован в моделях БП и других конформационных патологий. Следует отметить, что все описанные выше индукторы шаперона Hsp70 наряду со своими достоинствами обладают недостатками. Так, селастрол и гелданамицин имеют нежелательные побочные токсические эффекты; кроме того, гелданамицин слабо проходит гематоэнцефалический барьер и плохо растворяется в водных растворителях (Supko et al., 1995;

Kalmar et al., 2009, 2014). Поэтому поиск безопасных индукторов шаперонов для превентивного лечения нейродегенеративных заболеваний активно продолжается.

В связи с этим в рамках Программы Президиума РАН «Фундаментальные науки – медицине» мы начали анализ нейропротективных эффектов нового индуктора белков теплового шока нетоксичного низкомолекулярного хиноидного соединения U-133, вызывающего в микромолярных концентрациях увеличение содержания Hsp70 и его шаперонной активности в различных клеточных культурах (Еременко и др. 2010; Лазарев и др., 2011). Это соединение получено из библиотеки низкомолекулярных веществ Тихоокеанского института биоорганической химии ДВО РАН. Основу препарата U-133 составляет эхинохром, основной пигмент морских ежей. Эхинохром проявляет разнообразную биологическую активность, в частности антиоксидантную. Препарат, взятый для исследований, представляет собой ацетилированный трис-О-глюкозид эхинохрома. Основная задача наших исследований состояла в том, чтобы выяснить, способен ли препарат U-133 ослабить развитие нейродегенеративного процесса в нигростриатной системе и предупредить переход его из доклинической в клиническую стадию БП. Используя описанную выше лактацистиновую модель пролонгированной клинической стадии БП у крыс (Пастухов, 2013), нам удалось обнаружить, что системное введение U-133 в фармакологических дозах в 2,7 раза уменьшает потерю ДА-ергических нейронов в компактной части черной субстанции (рис. 5) и в 3,7 раза – число терминалей в стриатуме*. Кроме того, препарат U-133 нормализует моторное поведение и предупреждает характерное для клинической стадии БП уменьшение уровня тирозингидроксилазы и везикулярного транспортера моноаминов. Важно отметить, что по сравнению с клинической стадией БП соединение U-133 не только предотвращает снижение уровня Hsp70 в нейронах черной субстанции, но и повышает его в 2,8 раза, при этом уровень Hsp70 в нейронах оказывается более высоким, чем в доклинической стадии БП. По совокупности показателей U-133 предотвращает переход нейродегенеративного процесса из доклинической стадии, в которой сохраняется возможность активации нейропротективных и компенсаторных резервов нигростриатной системы (Пастухов и др., 2010а,б, 2011), в клиническую стадию БП (для которой характерно истощение этих резервов и приближение нейродегенеративного процесса к «точке невозврата» (Пастухов, 2013). Таким образом, мы показали, что отечественный препарат U-133 демонстрирует терапевтический потенциал в модели БП у крыс и есть надежда, что индукторы шаперонов займут достойное место в превентивной терапии нейродегенеративных заболеваний.

4.5. О перспективе ослабления процесса нейродегенерации в модели клинической стадии

Выше мы рассмотрели данные, которые могут служить основанием для разработки новой фармакологической стратегии превентивного лечения БП в тех слу-

* Авторы выражают признательность сотруднику ТИБОХ ДВО РАН С.Г. Полонику за предоставление препарата U-133 и студентке СПбГУ В.В. Коржовой за участие в проведении экспериментов.

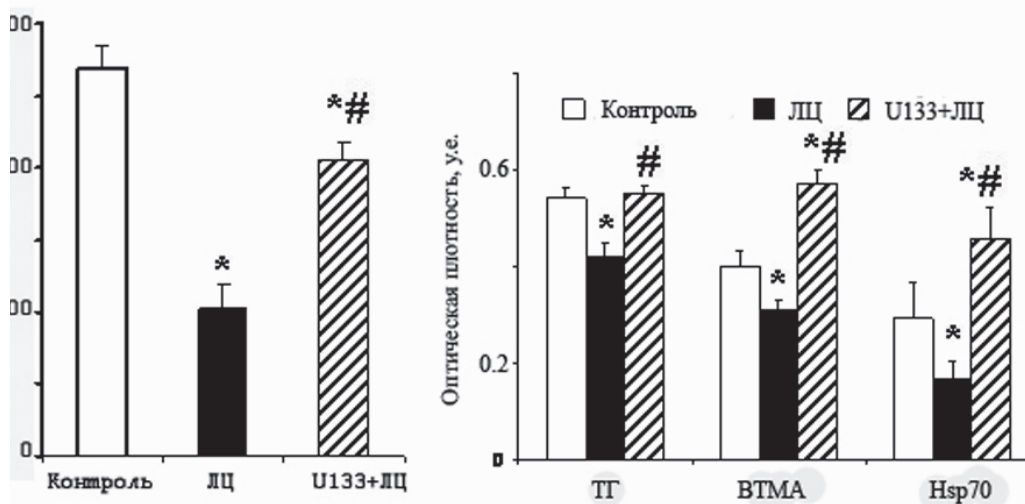
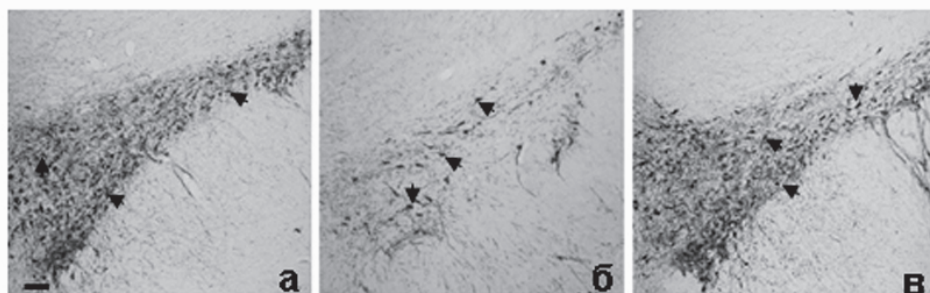


Рис. 5. Защитные эффекты хиноидного соединения в модели клинической стадии болезни Паркинсона у крыс

На верхней панели рисунка представлены микрофотографии компактной части черной субстанции (кЧС) с иммунореактивными к тирозингидроксилазе (ТГ) нейронами в контрольных условиях (а), при введении в кЧС лактацистина (ЛЦ) (б) и при внутрибрюшинном введении U133 в модели БП (в). Масштаб – 50 мкм.

На нижней панели рисунка показано увеличение числа выживших ДА-ергических нейронов в кЧС и иммунореактивности ТГ, везикулярного транспортера моноаминов 2 (BTMA) и белка Hsp70 в нейронах кЧС после превентивных инъекций U133 в модели клинической стадии болезни Паркинсона у крыс.

ЛЦ – микроинъекции лактацистина в компактную часть черной субстанции; U133+ ЛЦ – внутрибрюшинное введение U133 до микроинъекций лактацистина.

* – достоверность отличия от контроля при $p < 0,05$, # – достоверность терапевтического эффекта препарата U133 в модели клинической стадии БП при $p < 0,05$.

чаях, когда известен надежный комплекс ранних немоторных маркеров, достаточный для постановки диагноза в доклинической стадии. Поскольку во всех мировых клинических учреждениях врачи все еще опасаются ставить диагноз БП, до тех пор пока не проявятся хотя бы 2–3 типичных признака нарушений моторного поведения, мы сделали попытку продвинуться несколько дальше превентивного способа

терапии и ослабить или остановить процесс гибели ДА-ергических нейронов в периоде нарастания процесса нейродегенерации в динамике клинической стадии БП.

Ранее мы обратили особое внимание на то, что при умеренном ослаблении функции протеасом ДА-ергической nigростриатной системы в доклинической стадии БП у крыс выживают в основном нейроны с высоким содержанием индуцибельного шаперона Hsp70 (Пастухов и др., 2011). Нами высказана гипотеза о зависимости повышенной устойчивости ДА-ергических нейронов к нейротоксическим факторам от содержания в них Hsp70. Проверка этой рабочей гипотезы необходима для обоснования лечения на основе препаратов шаперонов, способных улучшать ситуацию с неправильной укладкой белков, лежащей в основе патогенеза БП. Защитные эффекты экзогенного Hsp70, выявленные в моделях стресса и различных заболеваний (Пастухов и др., 2010б), при БП не изучены. Задача нашего исследования – выяснить, способно ли интраназальное введение рекомбинантного Hsp70 человека уменьшить проявления моторной дисфункции и ослабить процесс нейродегенерации при его нарастании в динамике клинической стадии БП у крыс.

В исследовании использована созданная нами модель пролонгированной клинической стадии БП у крыс. Рекомбинантный индуцибельный Hsp70 человека (полный протокол получения и очистки Hsp70 описан ранее (Ekimova et al., 2010)) вводили в каждую ноздрю крысы через 4 часа после каждой микроинъекции лактацистина (т.е. примерно на 7–10 часов позднее нейротоксина с учетом времени проникновения Hsp70 в мозг и его интернализации ДА-ергическими нейронами

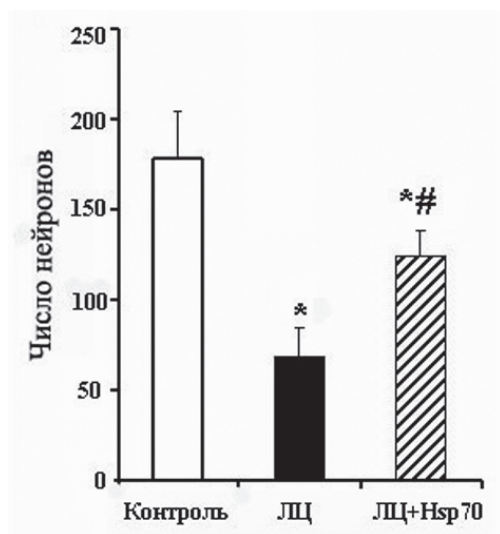


Рис. 6. Увеличение числа выживших ДА-ергических нейронов в компактной части черной субстанции после интраназального введения рекомбинантного Hsp70 человека в модели клинической стадии болезни Паркинсона у крыс

ЛЦ – микроинъекции лактацистина в компактную часть черной субстанции; ЛЦ+ Hsp70 – интраназальное введение Hsp70 после микроинъекций лактацистина.

* – достоверность отличия от контроля при $p < 0,05$, # – достоверность терапевтического эффекта Hsp70 в модели клинической стадии БП при $p < 0,05$.

компактной части черной субстанции) и через неделю после последней микроинъекции лактастистина; все эффекты оценивали в тот же срок, что и в контрольных группах, – через 21 день после первой микроинъекции нейротоксина.

Впервые установлено, что интраназальное введение Hsp70 уменьшает в 2 раза ($p < 0,01$) потерю ДА-ергических нейронов компактной части черной субстанции (рис. 6) и в 2,4 раза ($p < 0,05$) – их терминалей в стриатуме, что соответствует значениям показателей в модели доклинической стадии. Hsp70 **восстанавливает до контрольных значений** показатели моторного поведения (Пастухов и др., 2014).

Ослабление нейродегенерации и нормализация моторной функции выявлены при доставке в мозг экзогенного Hsp70 с существенным опозданием по сравнению с введением нейротоксина, когда нейроны уже вступают на путь апоптоза вследствие дисфункции протеасом. Сопоставление с ранее полученными данными (Пастухов, 2013; Пастухов и др., 2011) позволяет предположить, что уменьшение гибели ДА-ергических нейронов происходит за счет увеличения содержания Hsp70 в **тех нейронах**, в которых оно было частично или полностью утрачено. Пока остается не ясным, что вызывает препарат Hsp70 – полную остановку или лишь замедление процесса нейродегенерации. В любом случае временная отсрочка проявления симптомов клинической стадии признается перспективной стратегией современного лечения БП (Угрюмов, 2010а,б; Jones et al., 2014; Neef et al., 2011; Ugrumov et al., 2011).

Полученные данные могут служить основанием для разработки методологии повышения устойчивости ДА-ергических нейронов и терапевтической стратегии замедления или остановки процесса нейродегенерации в клинической стадии БП, направленной на устранение главной причины патогенеза БП – накопления в нейронах неправильно уложенных белков.

Литература

- Голубев В.Л. Лечение болезни Паркинсона: решенные и нерешенные вопросы // Избранные лекции по неврологии. М.: Эйдос Медиа, 2006. С. 395-421.
- Голубев В.Л., Левин Я.И., Вейн А.М. Болезнь Паркинсона и синдром паркинсонизма. М.: МЕДпресс, 1999. 416 с.
- Гусев Е.И., Гехт А.Б., Попов Г.Р. и др. Болезнь Паркинсона. Клиника, диагностика и лечение. Нейродегенеративные заболевания: фундаментальные и прикладные аспекты. Ред. М.В. Угрюмов. М.: Наука, 2010. С. 52-86.
- Еременко Е.М., Антимонова О.И., Шекалова О.Г. и др. Новые соединения, повышающие экспрессию шаперона Hsp70, и их биологическая активность // Цитология. 2010. Т. 53. № 3. С. 235-242.
- Иллариошкин С.Н. Течение болезни Паркинсона и подходы к ранней диагностике // Болезнь Паркинсона и расстройства движений. Руководство для врачей. По материалам II Национального конгресса по болезни Паркинсона и расстройствам движения. Ред. С.Н. Иллариошкин, О.С. Левина. М.: Sandoz, 2011. С. 41-47.
- Лазарев В.Ф., Онохин К.В., Антимонова О.И. и др. Кинетика изменения шаперонной активности белков Hsp70 и Hdj1 в клетках миелоидной лейкемии человека U-937 после теплового или лекарственного преко кондиционирования // Биохимия. Т. 76. № 5. С. 724-730.
- Литвиненко И.В. Болезнь Паркинсона. М.: Миклош, 2006. 216 с.
- Литвиненко И.В., Красаков И.В., Тихомирова О.В. Нарушения сна при болезни Паркинсона: патофизиологические механизмы, клинические варианты и направления коррекции // Болезнь Паркинсона и расстройства движений. Руководство для врачей. По материалам II Национального конгресса по болезни Паркинсона и расстройствам движения. Ред. С.Н. Иллариошкин, О.С. Левина. М.: Sandoz, 2011. С. 11-18.

- ресса по болезни Паркинсона и расстройствам движения. Ред. С.Н. Иллариошкин, О.С. Левин. М.: Sandoz, 2011. С. 93-97.
- Маргулис Б.А., Гужова И.В.* Белки стресса в эукариотической клетке // Цитология. 2000. Т. 42. С. 323-342.
- Маргулис Б.А., Гужова И.В.* Двойная роль шаперонов в ответе клетки и всего организма на стресс // Цитология. 2009. Т. 51. № 3. С. 219-228.
- Пастухов Ю.Ф.* Изменения характеристик парадоксального сна – ранний признак болезни Паркинсона // ЖВНД. 2013. Т. 63. № 1. С. 75-85.
- Пастухов Ю.Ф., Екимова И.В.* Молекулярные, клеточные и системные механизмы протективной функции белка теплового шока 70 кДа // Нейронауки. 2005. Т. 2. № 2. С. 3-25.
- Пастухов Ю.Ф., Чеснокова А.Ю.* Альфа-синуклеин в патогенезе болезни Паркинсона и других нейродегенеративных заболеваний // Нейродегенеративные заболевания: фундаментальные и прикладные аспекты. Ред. М.В. Угрюмов. М.: Наука, 2010. С. 189-200.
- Пастухов Ю.Ф., Екимова И.В., Чеснокова А.Ю. и др.* Экспериментальное и клиническое исследование немоторных симптомов паркинсонизма в пролонгированной модели преклинической стадии у животных и в различные сроки болезни Паркинсона у человека // Фундаментальные науки – медицине. Тез. докл. на конф. и семинарах по научным направлениям Программы в 2009 г. М.: Слово, 2009. С. 189-191.
- Пастухов Ю.Ф., Чеснокова А.Ю., Якимчук А.А. и др.* Изменения сна при дегенерации нейронов черной субстанции, вызванной ингибитором протеасомы лактацистином // Рос. физиол. журнал. 2010а. Т. 96. № 12. С. 1190-1202.
- Пастухов Ю.Ф., Худик К.А., Екимова И.В.* Шапероны в регуляции и восстановлении физиологических функций // Рос. физиол. журнал. 2010б. Т. 96. № 7. С. 708-725.
- Пастухов Ю.Ф., Екимова И.В., Гужова И.В. и др.* Содержание шаперона Hsp70 в дофаминергических нейронах черной субстанции возрастает при протеасомной дисфункции // Рос. физиол. журнал. 2011. Т. 97. № 7. С. 649-660.
- Пастухов Ю.Ф., Плаксина Д.В., Лапина и др.* Экзогенный белок Hsp70 останавливает процесс нейродегенерации в модели клинической стадии болезни Паркинсона // Докл. РАН. 2014. Т. 457. № 6. С. 120-125.
- Сорокин А.В., Ким Е.Р., Овчинников Л.П.* Протеасомная система деградации и процессинга белков // Успехи биологической химии. 2009. Т. 49. С. 3-76.
- Угрюмов М.В.* Новые представления о патогенезе, диагностике и лечении нейродегенеративных заболеваний // Вестн. РАМН. 2010а. Т. 8. С. 6-19.
- Угрюмов М.В.* Традиционные и новые представления о патогенезе, диагностике и лечении нейродегенеративных заболеваний // Нейродегенеративные заболевания: фундаментальные и прикладные аспекты. Ред. М.В. Угрюмов. М.: Наука, 2010б. С. 8-35.
- Хайндрава В.Г., Козина Е.А., Кучеряну В.Г. и др.* Моделирование преклинической и ранней клинической стадий болезни Паркинсона // Журнал невр. и псих. 2010. Т. 7. С. 41-47.
- Хакимова Г.Р., Козина Е.А., Сапронова А.Я. и др.* Выделение дофамина в черной субстанции и в стриатуме на досимптомной и ранней симптомной стадиях паркинсонизма у мышей // Нейрохимия. 2011. Т. 28. № 1. С.42-48.
- Abbott R.D., Petrovitch H., White L.R. et al.* Frequency of bowel movements and the future risk of Parkinson's disease // Neurology. 2001. Vol. 57. № 3. P. 456-462.
- Abbott R.D., Ross G.W., White L.R. et al.* Excessive daytime sleepiness and subsequent development of Parkinson disease // Neurology. 2005. Vol. 65. № 9. P. 1442-1446.
- Abeliovich A., Schmitz Y., Farinas I. et al.* Mice lacking alpha-synuclein display functional deficits in the nigrostriatal dopamine system // J. Neuron. 2000. Vol. 25. P. 239-252.
- Ahn T.B., Jeon B.S.* Protective role of heat shock and heat shock protein 70 in lactacystin-induced cell death both in the rat substantia nigra and PC12 cells // Brain Res. 2006. Vol. 1087. P. 159-167.
- Alvarez-Erviti L., Seow Y., Schapira A.H. et al.* Lysosomal dysfunction increases exosome-mediated alpha-synuclein release and transmission // J. Neurobiol. Dis. 2011. Vol. 42. P. 360-367.
- Alvarez-Erviti L., Rodriguez-Oroz M.C., Cooper J.M. et al.* Chaperone-mediated autophagy markers in Parkinson disease brains // Arch. Neuro. 2010. Vol. 67. P. 1464-1472.

- Auluck P., Chan H., Trojanowski J. et al.* Chaperone suppression of alpha-synuclein toxicity in a *Drosophila* model for Parkinson's disease // *Science*. 2002. Vol. 295. P. 865-868.
- Auluck P., Meulener M., Bonini N.* Mechanisms of suppression of alpha-synuclein neurotoxicity by geldanamycin in *Drosophila* // *J. Biol. Chem.* 2005. Vol. 280. P. 2873-2878.
- Bartels T., Choi J.G., Selkoe D.J.* Alpha-Synuclein occurs physiologically as a helically folded tetramer that resists aggregation // *J. Nature*. 2011. Vol. 477. P. 107-110.
- Benn S.C., Woolf C.J.* Adult neuron survival strategies—slamming on the brakes // *Nat. Rev. Neurosci.* 2004. Vol. 5. № 9. P. 686-700.
- Beraud D., Twomey M., Bloom B. et al.* α -Synuclein alters toll-like receptor expression // *J. Front. Neurosci.* 2011. Vol. 5. Article 80. P. 1-11.
- Bernheimer H., Birkmayer W., Hornykiewicz O. et al.* Brain dopamine and the syndromes of Parkinson and Huntington. Clinical, morphological and neurochemical correlations // *J. Neurol. Sci.* 1973. Vol. 20. P. 415-455.
- Betarbet R., Canet-Aviles R.M., Sherer T.B. et al.* Intersecting pathways to neurodegeneration in Parkinson's disease: effects of the pesticide rotenone on DJ-1, alpha-synuclein, and the ubiquitin-proteasome system // *Neurobiol. Dis.* 2006. Vol. 22. № 2. P. 404-420.
- Boeve B.F.* REM Sleep behavior disorder: Updated review of the core features, the RBD-neurodegenerative disease association, evolving concepts, controversies, and future directions // *Ann. NY. Acad. Sci.* 2011. Vol. 1184. P. 15-54.
- Boeve B.F., Silber M.H., Saper C. et al.* Pathophysiology of REM sleep behaviour disorder and relevance to neurodegenerative disease // *Brain*. 2007. Vol. 130. Pt. 11. P. 2770-2788.
- Boissard E., Fort P., Gervasoni D. et al.* Localization of the GABAergic and non-GABAergic neurons projecting to the sublaterodorsal nucleus and potentially gating paradoxical sleep onset // *Eur. J. Neurosci.* 2003. Vol. 18. P. 1627-1639.
- Braak H., Del Tredici K.* Poor and protracted myelination as a contributory factor to neurodegenerative disorders // *Neurobiol. Aging*. 2004. Vol. 25. P. 19-23.
- Braak H., Del Tredici K.* Preclinical and clinical stages of intracerebral inclusion body pathology in idiopathic Parkinson's disease // *Parkinson's Disease: Progress in Research*. 2005. P. 1-49.
- Braak H., Del Tredici K., Rüb U. et al.* Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease // *Neurobiol. Aging*. 2003. Vol. 24. P. 197-211.
- Braak H., Ghebremedhin E., Rub U. et al.* Stages in the development of Parkinson's disease related pathology // *Cell. Tissue Res.* 2004. Vol. 318. P. 121-134.
- Braak H., Muller C.M., Rub U. et al.* Pathology associated with sporadic Parkinson's disease – where does it end? // *J. Neural. Transm. Suppl.* 2006. Vol. 70. P. 89-97.
- Braak H., Sastre M., Bohl J.R.E. et al.* Parkinson's disease: Lesions in dorsal horn layer I, involvement of parasympathetic and sympathetic pre and postganglionic neurons // *J. Neuropathol.* 2007. Vol. 113. P. 421-429.
- Bukau B., Weissman J., Horwich A.* Molecular chaperones and protein quality control // *Cell*. 2006. Vol. 125. № 3. P. 443-451.
- Burn D.J.* Depression in Parkinson's disease // *Eur. J. Neurol.* 2002. Suppl. 3. P. 44-54.
- Burre J., Sharma M., Tsetsenis T. et al.* α -synuclein promotes SNARE-complex assembly in vivo and in vitro // *J. Science*. 2010. Vol. 329. P. 1663-1667.
- Cabin D.E., Shimazu K., Murphy D. et al.* Synaptic vesicle depletion correlates with attenuated synaptic responses to prolonged repetitive stimulation in mice lacking α -synuclein // *J. Neurosci.* 2002. Vol. 22. P. 8797-8807.
- Chandra S., Fornai F., Kwon H.B. et al.* Double-knockout mice for α - and β -synucleins: effect on synaptic functions // *J. Proc. Natl. Acad. Sci.* 2004. Vol. 101. № 41. P. 14966-14971.
- Cleren C., Calingasan N.Y., Chen J. et al.* Celastrol protects against MPTP- and 3-nitropropionic acid-induced neurotoxicity // *J. Neurochem.* 2005. Vol. 94. P. 995-1004.
- Comella C.L.* Sleep disorders in Parkinson's disease: an overview // *Mov. Disord.* 2007. Vol. 17. P. S367-S373.
- Cook C., Petrucelli L.* A critical evaluation of the ubiquitin-proteasome system in Parkinson's disease // *Biochim. Biophys. Acta.* 2009. Vol. 1792. № 7. P. 664-675.
- Couch Y., Alvarez-Erviti L., Sison N.R. et al.* The acute inflammatory response to intranigral alpha-synuclein

- differs significantly from intranigral lipopolysaccharide and is exacerbated by peripheral inflammation // *J. Inflamm.* 2011. Vol. 8. P. 166.
- Crevits L.* Abnormal psychophysical visual perception in Parkinson's disease patients // *Acta. Neurol. Belg.* 2003. Vol. 103. № 2. P. 83-87.
- Croisier E., Moran L.B., Dexter D.T. et al.* Microglial inflammation in the Parkinsonian substantia nigra: relationship to alpha-synuclein deposition // *J. Neuroinflammation.* 2005. Vol. 2. P. 14.
- Danzer K.M., Haasen D., Karow A.R. et al.* Different species of alpha-synuclein oligomers induce calcium influx and seeding // *J. Neurosci.* 2007. Vol. 27. P. 9220-9232.
- Danzer K.M., Krebs S.K., Wolff M. et al.* Seeding induced by alpha-synuclein oligomers provides evidence for spreading of alpha-synuclein pathology // *J. Neurochem.* 2009. Vol. 111. P. 192-203.
- Danzer K.M., Ruf W.P., Putcha P. et al.* Heat-shock protein 70 modulates toxic extracellular alpha-synuclein oligomers and rescues trans-synaptic toxicity // *FASEB J.* 2011. Vol. 25. P. 326-336.
- De Cock V., Vidailhet M., Leu S. et al.* Restoration of normal motor control in Parkinson's disease during REM sleep // *Brain.* 2007. Vol. 130. Pt. 2. P. 450-456.
- Decker M., Keating G., Freeman A. et al.* Parkinsonian-like sleep-wake architecture in rats with bilateral striatal 6-OHDA lesions // *Soc. Neurosci. Abstr.* 2000. Vol. 26. P. 1514-1519.
- Dedmon M.M., Christodoulou J., Wilson M.R. et al.* Heat shock protein 70 inhibits alpha-synuclein fibril formation via preferential binding to prefibrillar species // *J. Biol. Chem.* 2005. Vol. 280. № 15. P. 14733-1440.
- Del Tredici K., Braak H.* Idiopathic Parkinson's disease: Staging an α -synucleinopathy with a predictable pathoanatomy // *Molecular Mechanisms in Parkinson's Disease.* Eds. P. Kahle, C. Haass. Georgetown: Landes Bioscience, 2004. P. 1-32.
- Desplats P., Lee H.J., Bae E.J. et al.* Inclusion formation and neuronal cell death through neuron-to-neuron transmission of alpha-synuclein // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2009. Vol. 106. P. 13010-13015.
- Dettmer U., Newman A.J., Luth E.S. et al.* In vivo crosslinking reveals principally oligomeric forms of α -synuclein and β -synuclein in neurons and non-neural cells // *J. Biol. Chem.* 2013. Vol. 288. P. 6371-6385.
- Ding Q., Keller J.N.* Proteasome inhibition in oxidative stress neurotoxicity: implications for heat shock proteins // *J. Neurochem.* 2001. Vol. 77. № 4. P. 1010-1017.
- Ding T.T., Lee S.J., Rochet J.C. et al.* Annular alpha-synuclein protofibrils are produced when spherical protofibrils are incubated in solution or bound to brain-derived membranes // *Biochemistry.* 2002. Vol. 41. P. 10209-10217.
- Dong Z., Wolfer D., Lipp, H. et al.* Hsp70 Gene Transfer by adeno-associated virus inhibits MPTP-induced nigrostriatal degeneration in the mouse model of Parkinson disease // *Mol. Ther.* 2005. Vol. 11. P. 80-88.
- Ebrahimi-Fakhari D., Wahlster L., McLean P.J.* Molecular chaperones in Parkinson's disease--present and future // *J. Parkinsons Dis.* 2011. Vol. 1. № 4. P. 299-320.
- Ebrahimi-Fakhari D., Wahlster L., McLean P.J.* Protein degradation pathways in Parkinson's disease: curse or blessing // *Acta. Neuropathol.* 2012. Vol. 124. P. 153-172.
- Ekimova I.V., Nizinskya L.E., Romanova I.V. et al.* Exogenous protein Hsp70 can penetrate into the brain structures and attenuate the severity of chemically-induced seizures // *J. Neurochem.* 2010. Vol. 115. № 4. P. 1035-1044.
- El-Agnaf O.M., Salem S.A., Paleologou K.E. et al.* Alpha-synuclein implicated in Parkinson's disease is present in extracellular biological fluids, including human plasma // *FASEB J.* 2003. Vol. 17. P. 1945-1947.
- Emmanouilidou E., Melachroinou K., Roumeliotis T. et al.* Cell-produced alpha-synuclein is secreted in a calcium-dependent manner by exosomes and impacts neuronal survival // *J. Neurosci.* 2010. Vol. 30. P. 6838-6851.
- Eriksen J.L., Wszolek Z., Petrucelli L.* Molecular pathogenesis of Parkinson disease // *Arch. Neurol.* 2005. Vol. 62. № 3. P. 353-357.
- Fan G.H., Zhou H.Y., Yang H. et al.* Heat shock proteins reduce alpha-synuclein aggregation induced by MPP+ in SK-N-SH cells // *FEBS Lett.* 2006. Vol. 580. P. 3091-3098.
- Fantini M.L., Gagnon J.F., Filipini D. et al.* The effects of pramipexole in REM sleep behavior disorder // *Neurology.* 2003. Vol. 61. № 10. P. 1418-1420.
- Faust K., Gehrke S., Yang Y. et al.* Neuroprotective effects of compounds with antioxidant and anti-

- inflammatory properties in a Drosophila model of Parkinson's disease // *BMC Neuros.* 2009. Vol. 10. P. 109.
- Flower T.R., Chesnokova L.S., Froelich C.A. et al.* Heat shock prevents alpha-synuclein-induced apoptosis in a yeast model of Parkinson's disease // *J. Mol. Biol.* 2005. Vol. 351. P. 1081-1100.
- Fornai F., Lenzi P., Gesi M. et al.* Fine structure and biochemical mechanisms underlying nigrostriatal inclusions and cell death after proteasome inhibition // *J. Neurosci.* 2003. Vol. 23. P. 8955-8966.
- Furukawa Y., Vigouroux S., Wong H. et al.* Brain proteasomal function in sporadic Parkinson's disease and related disorders // *Ann. Neurol.* 2002. Vol. 51. № 6. P. 779-782.
- Gagnon J.-F., Postuma R., Mazza S. et al.* Rapid-eyemovement sleep behaviour disorder and neurodegenerative diseases // *Lancet Neurol.* 2006. Vol. 5. P. 424-432.
- Gao X., Chen H., Schwarzschild M.A. et al.* Erectile function and risk of Parkinson's disease // *Am. J. Epidemiol.* 2007. Vol. 166. № 12. P. 1446-1450.
- Gaugler M.N., Genc O., Bobela W. et al.* Nigrostriatal overabundance of α -synuclein leads to decreased vesicle density and deficits in dopamine release that correlate with reduced motor activity // *Acta. Neuropathol.* 2012. Vol. 123. P. 653-669.
- Gorbatyuk M., Shabashvili A., Chen., et al.* Glucose regulated protein 78 diminishes alpha-synuclein neurotoxicity in a rat model of Parkinson disease // *Mol. Ther.* 2012. Vol. 20. P. 1327-1337.
- Haass C., Selkoe D.J.* Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid β -peptide // *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 2007. Vol. 8. P. 101-112.
- Halliday G., Hely M., Reid W., Morris J.* The progression of pathology in longitudinally followed patients with Parkinson's disease // *Acta. Neuropathol.* 2008. Vol. 1. P. 409-415.
- Hansen C., Angot E., Bergstrom A.L. et al.* **Alpha-Synuclein propagates from mouse brain to grafted dopaminergic neurons and seeds aggregation in cultured human cells** // *J. Clin. Invest.* 2011. Vol. 121. P. 715-725.
- Hardy J., Cookson M.R., Singleton A.* Genes and parkinsonism // *Lancet Neurol.* 2003. Vol. 2. P. 221-228.
- Hartl F.* Molecular chaperones in cellular protein folding // *Nature.* 1996. Vol. 381. P. 571-579.
- Hartl F., Hayer-Hartl M.* Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein // *Science.* 2002. Vol. 295. P. 1852-1858.
- Hartl F., Hayer-Hartl M.* The first chaperonin // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2013. Vol. 14. № 10. P. 611.
- Hartmann E., Chung R., Draskoczy P. et al.* 6-hydroxydopamine: effects on sleep in the rat // *Nature.* 1971. Vol. 233. P. 425-427.
- Hawkes C.H., Del Tredici K., Braak H.* Parkinson's disease: a dual-hit hypothesis // *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 2007. Vol. 33. № 6. P. 599-614.
- Hightower L.E.* Heat shock, stress proteins, chaperones, and proteotoxicity // *Cell.* 1991. Vol. 66. № 2. P. 191-197.
- Hinault M.P., Cuendet A.F., Mattoo R.U. et al.* Stable alpha-synuclein oligomers strongly inhibit chaperone activity of the Hsp70 system by weak interactions with J-domain co-chaperones // *J. Biol. Chem.* 2010. Vol. 285. P. 38173-38182.
- Hindle J.V.* Ageing, neurodegeneration and Parkinson's disease // *Age Ageing.* 2010. Vol.39. № 2. P. 156-161. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9120427>
- Hoehn M.M., Yahr M.D.* Parkinsonism: onset, progression and mortality // *Neurology.* 1967. Vol. 17. № 5. P. 427-442.
- Imai J., Yashiroda H., Maruya M. et al.* Proteasomes and molecular chaperones: cellular machinery responsible for folding and destruction of unfolded proteins // *Cell Cycle.* 2003. Vol. 2. № 6. P. 585-590.
- Iranzo A.* Sleep-wake changes in the premotor stage of Parkinson's disease // *J. Neurol. Sci.* 2011. Vol. 310. P. 283-285.
- Iranzo A., Santamaria L., Tolosa E.* The clinical and pathophysiological relevance of REM sleep behavior disorder in neurodegenerative diseases // *Sleep Med. Rev.* 2009. Vol. 13. P. 385-401.
- Iwai A., Masliah E., Yoshimoto M. et al.* The precursor protein of nonA β component of Alzheimer's disease amyloid is a presynaptic protein of the central nervous system // *Neuron.* 1995. Vol. 14. P. 467-475.
- Jakes R., Spillantini M.G., Goedert M.* Identification of two distinct synucleins from human brain // *FEBS Lett.* 1994. Vol. 345. P. 27-32.
- Jang A., Lee H.J., Suk J.E. et al.* Non-classical exocytosis of alpha-synuclein is sensitive to folding states and promoted under stress conditions // *J. Neurochem.* 2010. Vol. 113. P. 1263-1274.

- Jellinger K.A. Neuropathological spectrum of synucleinopathies // *Mov. Disord.* 2003a. Vol. 6. P. 2-12.
- Jellinger K.A. Alpha-synuclein pathology in Parkinson's and Alzheimer's disease brain: incidence and topographic distribution a pilot study // *Acta Neuropathol.* 2003b. Vol. 106. № 3. P. 191-201.
- Jellinger K.A. Lewy body-related alpha-synucleinopathy in the aged human brain // *J. Neural. Transm.* 2004. Vol. 111. № 10-11. P. 1219-1235.
- Jin J., Hulette C., Wang Y. et al. Proteomic identification of a stress protein, mortalin/mthsp70/GRP75: Relevance to Parkinson disease // *Mol. Cell Proteomics.* 2006. Vol. 5. P. 1193-1204.
- Jones D.R., Moussaud S., McLean P. Targeting heat shock proteins to modulate α -synuclein toxicity // *Ther. Adv. Neuro. 1 Disord.* 2014. Vol. 7. № 1. P. 33-51.
- Jung A.E., Fitzsimons H.L., Bland R.J. et al. HSP70 and constitutively active HSF1 mediate protection against CDCrel-1-mediated toxicity // *Mol. Ther.* 2008. Vol. 16. P. 1048-1055.
- Kalaitzakis M.E., Graeber M.B., Gentleman S.M. et al. The dorsal motor nucleus of the vagus is not an obligatory trigger site of Parkinson's disease: a critical analysis of alpha-synuclein staging // *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 2008. Vol. 34. № 3. P. 284-295.
- Kalmar B., Greensmith L. Activation of the heat shock response in a primary cellular model of motoneuron neurodegeneration-evidence for neuroprotective and neurotoxic effects // *Cell Mol. Biol. Lett.* 2009. Vol. 14. № 2. P. 319-335.
- Kalmar B., Novoselov S., Gray A. et al. Late stage treatment with arimoclomol delays disease progression and prevents protein aggregation in the SOD1 mouse model of ALS // *J. Neurochem.* 2008. Vol. 107. № 2. P. 339-350.
- Kalmar B., Lu C.H., Greensmith L. The role of heat shock proteins in Amyotrophic Lateral Sclerosis: The therapeutic potential of Arimoclomol // *Pharmacol. Ther.* 2014. Vol. 141. № 1. P. 40-54.
- Kim Y.E., Hipp M.S., Bracher A. et al. Molecular chaperone functions in protein folding and proteostasis // *Annu Rev. Biochem.* 2013. Vol. 82. P. 323-355.
- Klucken J., Shin Y., Masliah E. et al. Hsp70 reduces alpha-synuclein aggregation and toxicity // *J. Biol. Chem.* 2004. Vol. 279. P. 25497-25502.
- Kordower J.H., Chu Y., Hauser R.A. et al. Lewy body-like pathology in long-term embryonic nigral transplants in Parkinson's disease // *Nat. Med.* 2008. Vol. 14. P. 504-506.
- Laloux C., Derambure P., Kreisler A. et al. MPTP-treated mice: long-lasting loss of nigral TH-ir neurons but not paradoxical sleep alterations // *Exp. Brain Res.* 2008. Vol. 186. P. 635-642.
- Larsen J.P. Sleep disorders in Parkinson's disease // *Adv. Neurol.* 2003. Vol. 91. P. 329-334.
- Larsen K.E., Schmitz Y., Troyer M.D. et al. α -synuclein overexpression in PC12 and chromaffin cells impairs catecholamine release by interfering with a late step in exocytosis // *J. Neurosci.* 2006. Vol. 26. P. 11915-11922.
- Lashuel H.A., Overk C.R., Masliah A. O. et al. The many faces of α -synuclein: from structure and toxicity to therapeutic target // *Nat. Rev. Neurosci.* Vol. 14. P. 38-48.
- Lee H.J., Choi C., Lee S.J. Membrane-bound alpha-synuclein has a high aggregation propensity and the ability to seed the aggregation of the cytosolic form // *J. Biol. Chem.* 2002. Vol. 277. P. 671-678.
- Lee H.J., Patel S., Lee S.J. Intravesicular localization and exocytosis of alpha-synuclein and its aggregates // *J. Neurosci.* 2005. Vol. 25. P. 6016-6024.
- Lee H.J., Suk J.E., Patrick C. et al. Direct transfer of alpha-synuclein from neuron to astroglia causes inflammatory responses in synucleinopathies // *J. Biol. Chem.* 2010. Vol. 285. P. 9262-9272.
- Lee H.J., Baek S.M., Ho D.H. et al. Dopamine promotes formation and secretion of non-fibrillar alpha-synuclein oligomers // *Exp. Mol. Med.* 2011. Vol. 43. P. 216-222.
- Leverenz J.B., Umar I., Wang Q. et al. Proteomic identification of novel proteins in cortical Lewy bodies // *Brain Pathol.* 2007. Vol. 17. P. 139-145.
- Li J.Y., Englund E., Holton J.L. et al. Lewy bodies in grafted neurons in subjects with Parkinson's disease suggest host-to-graft disease propagation // *Nat. Med.* 2008. Vol. 14. P. 501-503.
- Luk K.C., Song C., O'Brien P. et al. Exogenous alpha-synuclein fibrils seed the formation of Lewy body-like intracellular inclusions in cultured cells // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2009. Vol. 106. P. 20051-20056.
- Lundblad M., Decressac M., Mattsson B. et al. Impaired neurotransmission caused by overexpression of α -synuclein in nigral dopamine neurons // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2012. Vol. 109. P. 3213-3219.
- Luppi P.H., Clément O., Sapin E. et al. The neuronal network responsible for paradoxical sleep and its dysfunctions causing narcolepsy and rapid eye movement (REM) behavior disorder // *Sleep Med. Rev.* 2011. Vol. 15. P. 153-163.

- Magerkurth C., Schnitzer R., Braune S. Symptoms of autonomic failure in Parkinson's disease: prevalence and impact on daily life // *Clin. Auton. Res.* 2005. Vol. 15. P. 76-82.
- Marques O., Outeiro T.F. Alpha-synuclein: from secretion to dysfunction and death // *Cell Death Dis.* 2012. Vol. 3. P. e350.
- McGeer P.L., Itagaki S., Boyes B.E., McGeer E.G. Reactive microglia are positive for HLA-DR in the substantia nigra of Parkinson's and Alzheimer's disease brains // *Neurology.* 1988. Vol. 38. P. 1285-1291.
- McLean P., Klucken J., Shin Y. et al. Geldanamycin induces Hsp70 and prevents alpha-synuclein aggregation and toxicity in vitro // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2004. Vol. 321. P. 665-669.
- McLean P.J., Klucken J., Shin Y. et al. Geldanamycin induces Hsp70 and prevents alpha-synuclein aggregation and toxicity in vitro // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2004. Vol. 321 P. 665-669.
- McNaught K.S., Belizaire R., Jenner P. et al. Selective loss of 20S proteasome alpha-subunits in the substantia nigra pars compacta in Parkinson's disease // *Neurosci. Lett.* 2002. Vol. 326. № 3. P. 155-158.
- McNaught K.S., Jnobaptiste R., Jackson T. et al. The pattern of neuronal loss and survival may reflect differential expression of proteasome activators in Parkinson's disease // *Synapse.* 2010. Vol. 64. № 3. P. 241-250.
- McNaught K.S., Perl D.P., Brownell A.L. et al. Systemic exposure to proteasome inhibitors causes a progressive model of Parkinson's disease // *Ann. Neurol.* 2004. Vol. 56. № 1. P. 149-162.
- Meriin A.B., Sherman M.Y. Role of molecular chaperones in neurodegenerative disorders // *Int. J. Hyperthermia.* 2005. Vol. 21. № 5. P. 403-419.
- Mingozzi F., High K. Immune responses to AAV in clinical trials // *Curr. Gene Ther.* 2011. Vol. 11. P. 321-330.
- Mogi M., Harada M., Riederer P. et al. Tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) increases both in the brain and in the cerebrospinal fluid from Parkinsonian patients // *Neurosci. Lett.* 1994. Vol. 165. P. 208-210.
- Monaca C., Laloux C., Jacquesson J.-M. et al. Vigilance states in a parkinsonian model, the MPTP mouse // *Eur. J. Neurosci.* 2004. Vol. 20. P. 2474-2478.
- Morimoto R.I. Proteotoxic stress and inducible chaperone networks in neurodegenerative disease and aging // *Genes Dev.* 2008. Vol. 22. № 11. P. 1427-1438.
- Morimoto R.I., Kline M.P., Bimston D.N. et al. The heat-shock response: regulation and function of heat shock proteins and molecular chaperones // *Essays Biochem.* 1997. Vol. 32. P. 17-29.
- Murphy D.D., Rueter S.M., Trojanowski J.Q. et al. Synucleins are developmentally expressed, and α -synuclein regulates the size of the presynaptic vesicular pool in primary hippocampal neurons // *J. Neurosci.* 2000. Vol. 20. P. 3214-3220.
- Neef D.W., Jaeger A.M., Thiele D.J. Heat shock transcription factor 1 as a therapeutic target in neurodegenerative diseases // *Nat. Rev. Drug Discov.* 2011. Vol. 10. № 12. P. 930-944.
- Nemani V. M., Lu W., Berge V. et al. Increased expression of α -synuclein reduces neurotransmitter release by inhibiting synaptic vesicle reclustering after endocytosis // *Neuron.* 2010. Vol. 65. P. 66-79.
- Niu C., Me J., Pan Q., Fu X. Nigral degeneration with inclusion body formation and behavioral changes in rats after proteasomal inhibition // *Stereotact. Funct. Neurosurg.* 2009. Vol. 87. № 2. P. 69-81.
- Olson E., Boeve B., Silber M. Rapid eye movement sleep behavior disorder: demographic, clinical, and laboratory findings in 93 cases // *Brain.* 2000. Vol. 123. Pt. 2. P. 331-339.
- Ondo W.G., Dat Vuong K., Khan H. et al. Daytime sleepiness and other sleep disorders in Parkinson's disease // *Neurology.* 2001. Vol. 57. № 8. P. 1392-1396.
- O'Sullivan S.S., Williams D.R., Gallagher D.A. et al. Nonmotor symptoms as presenting complaints in Parkinson's disease: a clinicopathological study // *Mov. Disord.* 2008. Vol. 23. № 1. P. 101-106.
- Quigney D.J., Gorman A.M., Samali A.P. Heat shock protects PC12 cells against MPTP toxicity // *Brain Res.* 2003. Vol. 993. P. 133-139.
- Pacchetti C., Manni R., Zangaglia R. et al. Relationship between hallucinations, delusions, and rapid eye movement sleep behavior disorder in Parkinson's disease // *Mov. Disord.* 2005. Vol. 20. № 11. P. 1439-1448.
- Parkkinen L., Pirttila T., Alafuzoff I. Applicability of current staging categorization of α -synuclein pathology and their clinical relevance // *Acta Neuropathol.* 2008. Vol. 115. № 4. P. 399-407.
- Postuma R.B., Gagnon J.F., Vendette M. et al. Quantifying the risk of neurodegenerative disease in idiopathic REM sleep behavior disorder // *Neurology.* 2009. Vol. 72. № 15. P. 1296-1300.
- Recchia A., Debetto P., Negro A. et al. α -Synuclein and Parkinson's disease // *FASEB J.* 2004. Vol. 18. P. 617-626.

- Schenck C.H., Bundlie S.R., Ettinger M.G. et al.* Chronic behavioral disorders of human REM sleep: a new category of parasomnia // *Sleep*. 1986. Vol. 9. № 2. P. 293-308.
- Schenck C.H., Bundlie S.R., Mahowald M.W.* Delayed emergence of a parkinsonian disorder in 38% of 29 older men initially diagnosed with idiopathic rapid eye movement sleep behaviour disorder // *Neurology*. 1996. Vol. 46. № 2. P. 388-393.
- Schestatsky P., Valls-Solé J., Ehlers J.A. et al.* Hyperhidrosis in Parkinson's disease. // *Mov. Disord.* 2006. Vol. 21. № 10. P. 1744-1748.
- Schubert U., Anton L.C., Gibbs J. et al.* Rapid degradation of a large fraction of newly synthesized proteins by proteasomes // *Nature*. 2000. Vol. 404. P. 770-774.
- Selkoe D.J.* Folding proteins in fatal ways // *Nature*. 2003. Vol. 426. P. 900-904.
- Segref A., Hoppe T.* Think locally: control of ubiquitin-dependent protein degradation in neurons // *EMBO Rep.* 2009. Vol. 10. № 1. P. 44-50.
- Shen H.Y., He J.C., Wang Y. et al.* Geldanamycin induces heat shock protein 70 and protects against MPTP-induced dopaminergic neurotoxicity in mice // *J. Biol. Chem.* 2005. Vol. 280. P. 39962-39969.
- Shpirer I., Miniowitz A., Klein C. et al.* Excessive daytime sleepiness in patients with parkinson's disease: a polysomnography study // *Mov. Disord.* 2006. Vol. 21. № 9. P. 1432-1438.
- Shults C.W.* Lewy bodies // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 2006. Vol. 103. № 6. P. 1661-1668.
- Spillantini M.G., Crowther R.A., Jakes R. et al.* Filamentous alpha-synuclein inclusions link multiple system atrophy with Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies // *Neurosci. Lett.* 1998. Vol. 251. № 3. P. 205-208.
- Stiasny-Kolster K., Doerr Y., Moller J.C. et al.* Combination of idiopathic REM sleep behaviour and olfactory dysfunction as possible indicator for synucleinopathy demonstrated by dopamine transporter FP-CIT-SPECT // *Brain.* 2005. Vol. 128. Pt. 1. P. 126-137.
- Supko J.G., Hickman R.L., Grever M.R. et al.* Preclinical pharmacologic evaluation of geldanamycin as an antitumor agent // *Cancer Chemother. Pharmacol.* 1995. Vol. 36. P. 305-315.
- Tandberg E., Larsen J.P., Karlsen K.* Excessive daytime sleepiness and sleep benefit in Parkinson's disease: a community-based study // *Mov. Disord.* 1999. Vol. 14. № 6. P. 922-927.
- Tantucci M., Mariucci G., Taha E. et al.* Induction of heat shock protein 70 reduces the alteration of striatal electrical activity caused by mitochondrial impairment // *Neuroscience.* 2009. Vol. 163. P. 735-740.
- Tieu K.* A guide to neurotoxic animal models of Parkinson's disease // *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 2011. Vol. 1. № 1. P. a009316.
- Tippmann-Peikert M., Olson E., Boeve B. et al.* Idiopathic REM sleep behavior disorder – a follow-up of 39 patients // *Sleep.* 2006. Vol. 29. P. A272.
- Tokuda T., Salem S.A., Allsop D. et al.* Decreased alpha-synuclein in cerebrospinal fluid of aged individuals and subjects with Parkinson's disease // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2006. Vol. 349. P. 162-166.
- Trexler A.J., Rhoades E.* N-terminal acetylation is critical for forming α -helical oligomer of α -synuclein // *Protein Sci.* 2012. Vol. 21. P. 601-605.
- Trotti L. M.* REM Sleep behaviour disorder in older individuals: Epidemiology, pathophysiology, and management // *Drugs Aging.* 2010. Vol. 27. № 6. P. 457-470.
- Turturici G., Sconzo G., Geraci F.* Hsp70 and its molecular role in nervous system diseases // *Biochem. Res. Int.* 2011. Vol. 2011. P. 618127.
- Ueda K., Fukushima H., Masliah E. et al.* Molecular cloning of cDNA encoding an unrecognized component of amyloid in Alzheimer disease // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 1993. Vol. 90. P. 11282-11286.
- Ugrumov M.V., Khaindrava V.G., Kozina E.A. et al.* Modeling of presymptomatic and symptomatic stages of parkinsonism in mice // *Neuroscience.* 2011. Vol. 181. P. 175-188.
- Uversky V.N.* Neuropathology, biochemistry, and biophysics of α -synuclein aggregation // *J. Neurochem.* 2007. Vol. 103. № 1. P. 17-37.
- Vetrugno R., Provini F., Cortelli P. et al.* Sleep disorders in multiple system atrophy: a correlative video-polysomnographic study // *Sleep Med.* 2004. Vol. 5. № 1. P. 21-30.
- Westerheide S.D., Bosman J.D., Mbadugha B.N. et al.* Celastrols as inducers of the heat shock response and cytoprotection // *J. Biol. Chem.* 2004. Vol. 279. № 53. P. 56053-56060.
- Westerheide S.D., Morimoto R.I.* Heat shock response modulators as therapeutic tools for diseases of protein conformation // *J. Biol. Chem.* 2005. Vol. 280. № 39. P. 33097-33100.

- Westphal C.H., Chandra S.S.* Monomeric synucleins generate membrane curvature // *J. Biol. Chem.* 2012. Vol. 288. P. 1829-1840.
- Wetter T.C., Collado-Seidel V., Pollmächer T. et al.* Sleep and periodic leg movement patterns in drug-free patients with Parkinson's disease and multiple system atrophy // *Sleep.* 2000. Vol. 23. № 3. P. 361-367.
- Wickner S., Maurizi M.R., Gottesman S.* Posttranslational quality control: folding, refolding, and degrading proteins // *Science.* 1999. Vol. 286. P. 1888-1893.
- Wolters E. C. Braak H.* Parkinson's disease: premotor clinico-pathological correlations // *J. Neural. Transm. Suppl.* 2006. Vol. 70. P. 309-319.
- Wu Y.R., Wang C.K., Chen C.M. et al.* Analysis of heat-shock protein 70 gene polymorphisms and the risk of Parkinson's disease // *Hum. Genet.* 2004. Vol. 114. P. 236-241.
- Zhang L., Zhang C., Zhu Y. et al.* Semi-quantitative analysis of α -synuclein in subcellular pools of rat brain neurons: an immunogold electron microscopic study using a C terminal specific monoclonal antibody // *Brain Res.* 2008. Vol. 1244. P. 40-52.
- Zhang W., Wang T., Pei Z. et al.* Aggregated alpha-synuclein activates microglia: a process leading to disease progression in Parkinson's disease // *FASEB J.* 2005. Vol. 19. P. 533-542.
- Zeng B.-Y., Medhurst A.D., Jackson M. et al.* Proteasomal activity in brain differs between species and brain regions and changes with age // *Mech. Age. Dev.* 2005. Vol. 126. P. 760-766.

Экспериментальное моделирование болезни Паркинсона

А.А. Колачева, Е.А. Козина, Г.Р. Хакимова, В.Г. Кучеряну, В.С. Кудрин
Р.Р. Нигматуллина, А.С. Базян, Г.А. Григорьян, М.В. Угрюмов

Содержание

1. Введение. Болезнь Паркинсона – требования к экспериментальному моделированию
2. Нейротоксические модели клинической стадии болезни Паркинсона
 - 2.1. Модели на основе введения 6-гидроксидофамина
 - 2.2. Модели на основе введения 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридина
 - 2.2.1. Моделирование болезни Паркинсона на грызунах
 - 2.2.2. Моделирование болезни Паркинсона на обезьянах
 - 2.2.3. Недостатки моделей болезни Паркинсона на основе введения 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридина
 - 2.3. Модели на основе введения параквата
 - 2.4. Модели на основе введения ротенона
 - 2.5. Модели на основе введения холиномиметиков
3. Генетические модели
 - 3.1. Модели на основе модификации гена α -синуклеина
 - 3.2. Модели на основе модификации гена *LRRK2*
 - 3.3. Модели на основе модификации гена паркина
 - 3.4. Модели на основе модификации гена *DJ-1*
4. Нейроиммунологические модели
5. Нейровоспалительные модели
6. Постадийное моделирование болезни Паркинсона
 - 6.1. Моделирование болезни Паркинсона на доклинической и ранней клинической стадиях
 - 6.2. Состояние nigrostriatной дофаминергической системы на моделях доклинической и ранней клинической стадий болезни Паркинсона
 - 6.3. Характеристика дегенерации дофаминергических нейронов nigrostriatной системы во времени на модели ранней клинической стадии болезни Паркинсона
7. Немоторные проявления на различных стадиях болезни Паркинсона
 - 7.1. Нарушения функций мозга за пределами nigrostriatной системы
 - 7.2. Десимпатизации сердца
 - 7.2.1. Десимпатизация сердца на моделях поздней клинической стадии болезни Паркинсона
 - 7.2.2. Десимпатизация сердца на моделях доклинической и ранней клинической стадий болезни Паркинсона
 - 7.3. Изменение метаболизма в надпочечниках и содержания в крови катехоламинов
8. Заключение

Сокращения: 6-ГДА – 6-гидроксидофамин; БП – болезнь Паркинсона; ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография; ГВК – гомованилиновая кислота; ГПУВ – генератор патологически усиленного возбуждения; ДА – дофамин; ДАТ – мембранный транспортер дофамина; ДОФУК – дигидрофенилуксусная кислота; КОМТ – катехол-О-метилтрансфераза;

МАО – моноаминоксидаза; МФДП+ – N-метил-4-фенил-2,3-дигидропиридин-ион; МФП+ – 1-метил-4-фенилпиридиум ион; МФТП – 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридин; НА – норадреналин; ТГ – тирозингидроксилаза; ЧС – черная субстанция; ФНО – фактор некроза опухоли.

1. Введение. Болезнь Паркинсона – требования к экспериментальному моделированию

Болезнь Паркинсона (БП) – хроническое, прогрессирующее, системное заболевание, которое затрагивает более 1% населения старше 60 лет (Lees et al., 2009). В основе патогенеза БП лежит гибель дофаминергических (ДА-ергических) нейронов nigrostriatной системы мозга, тела которых находятся в черной субстанции (ЧС) среднего мозга, а их аксоны проецируются в стриатум. Гибель нейронов nigrostriatной системы приводит к дефициту ДА и, как следствие, к нарушению двигательной функции.

Установлено, что за много лет до появления моторных симптомов (тремор, ригидность, брадикинезия) наблюдаются неспецифические проявления, такие как нарушение обоняния, перистальтики желудочно-кишечного тракта, сна и др., возникает депрессия. Все это связано с дегенерацией соответствующих отделов как центральной, так и периферической нервной системы (Braak, Braak, 2000).

Причина и механизмы гибели ДА-ергических нейронов до сих пор не до конца ясны, но на аутопсийном материале обнаружены нейроны с разрывами ДНК, что может свидетельствовать как о некрозе, так и об апоптозе. В пользу апоптоза свидетельствуют данные о наличии в дегенерирующих ДА-ергических нейронах увеличенного содержания проапоптотических белков и экспрессии соответствующих генов. С другой стороны, нейродегенерация сопровождается или даже провоцируется воспалительным процессом, что должно сопровождаться некрозом (Ott et al., 2002). В дегенерирующих ДА-ергических нейронах обнаружены цитоплазматические включения – тельца Леви – агрегаты α -синуклеина с нейрофиламентами, убиквитином и другими белками (Baba et al., 1998; Arima et al., 1999; Ishizawa et al., 2003; Paris et al., 2009).

БП – единственное нейродегенеративное заболевание, для которого определен порог гибели ДА-ергических нейронов, как тел, так и их отростков, а также определен уровень дефицита ДА в стриатуме, превышение которого приводит к появлению моторных симптомов у больного, т.е. к переходу из доклинической в раннюю клиническую стадию. Так, этот порог составляет потерю 50–60% тел ДА-ергических нейронов в ЧС, 60–80% терминалей ДА-ергических аксонов в стриатуме. При этом содержание ДА в стриатуме снижается на 60–80% от исходного уровня, что и приводит к нарушению моторики. Дальнейшее развитие заболевания приводит к потере до 80% тел нейронов в ЧС на терминальной клинической стадии (Agid, 1991).

Для лечения БП используется в основном симптоматическая терапия с применением агонистов ДА различного механизма действия, в первую очередь L-ДОФА – предшественник ДА. Однако по мере развития заболевания для поддержания лечебного эффекта необходимо увеличивать дозу L-ДОФА, что приводит к уси-

лению его побочного общетоксического действия и к появлению так называемых медикаментозных дискинезий. На этой стадии, характеризующейся дегенерацией большей части ДА-ергических нейронов, уже практически невозможно остановить гибель сохранившихся нейронов, поэтому все попытки использования нейропротекторной терапии малоэффективны. Действительно, нейропротекторная терапия может быть эффективной только на начальном этапе нейродегенерации, т.е. на до-симптомной стадии, диагностика которой пока не разработана.

С другой стороны, известно, что БП, так же как другие хронические нейродегенеративные заболевания, длительное время протекает бессимптомно, что обусловлено развитием компенсаторных процессов в мозге (Угрюмов, 2007; Zigmond, 1997; Zigmond et al., 1990; Bezard, Gross, 1998; Ugrumov, 2008). Такие компенсаторные процессы принято делить на две группы: ранние и поздние. К ранним относят механизмы, которые направлены на поддержание внеклеточного содержания ДА на уровне нормы, например, за счет увеличения синтеза ДА или снижения его деградации. Поздние механизмы, которые включаются при снижении межклеточной концентрации ДА, направлены на максимально эффективное «использование» оставшегося ДА, т.е. на повышение чувствительности нейронов-мишеней к ДА путем увеличения на мембране количества молекул рецепторов. Познание молекулярных механизмов нейропластичности, а также хронологии активации и истощения этих процессов в мозге позволит идентифицировать новые мишени для потенциальных лекарственных веществ, в частности с нейропротекторными свойствами.

Для углубленного понимания молекулярных механизмов патогенеза БП, создания доклинической диагностики и разработки нейропротекторной терапии необходимо использование экспериментальных моделей *in vivo* постадийного развития БП, которые воспроизводили бы в идеале следующие характерные особенности этого заболевания: (1) увеличение с возрастом риска возникновения БП; (2) прогрессирующая дегенерация ДА-ергических nigростриатных нейронов, сопровождающаяся возникновением дефицита ДА в стриатуме; (3) нарушение моторного поведения в акинетико-ригидной, дрожательно-ригидной или акинетико-дрожательно-ригидной формах при достижении порогового уровня деградации nigростриатной ДА-ергической системы; (4) наличие в нервной ткани агрегатов α -синуклеина в виде телец Леви; (5) наличие воспалительного процесса в нервной ткани; (6) системный характер БП – распространение нейродегенеративного процесса по мозгу и на периферическую нервную систему; (7) немоторные проявления БП на периферии.

Учитывая то, что БП является патологией человека и не возникает у животных, принципиально невозможно создать абсолютно адекватные модели заболевания, которые бы воспроизводили все ключевые признаки. Действительно, существующие модели обычно воспроизводят одну или две особенности БП, и их можно разделить на две основные категории – нейротоксические и генетические. Оба подхода к моделированию БП имеют как преимущества, так и недостатки. Нейротоксические модели, полученные на основе введения в организм специфических для ДА-ергических нейронов токсинов (6-ГДА и МФТП), воспроизводят дегенерацию

Сравнительный анализ токсических и генетических моделей болезни Паркинсона

Модель	Объекты	Поведение	Нигростриатная система	Агрегация α -синуклеина	Применение модели
Токсическая	Грызуны, обезьяны, кошки	Моторные нарушения паркинсонического типа	Дозозависимая гибель дофаминергических нейронов	Противоречивые данные	Изучение механизмов нейродегенерации и нейропластичности, создание доклинической диагностики, поиск нейропротекторов
Генетическая	Грызуны, <i>Caenorhaditis elegans</i> , <i>Drosophila melanogaster</i> , <i>Zebra fish</i> , <i>in vitro</i>	Отсутствие моторных нарушений	Отсутствие или минимальная гибель дофаминергических нейронов	Есть на некоторых моделях	Изучение метаболизма патологических белков и их роли в гибели нейронов

нигростриатных нейронов, дефицит ДА в стриатуме и нарушения моторного поведения (МФТП), характерные для БП. Эти модели позволяют изучать механизмы гибели нейронов, а также нейропластичности мозга с дальнейшим поиском и анализом эффективности потенциальных нейропротекторов. Не все признаки БП можно воспроизвести на нейротоксических моделях, так, данные по агрегации α -синуклеина противоречивы (Shimoji et al., 2005; Fornai et al., 2005; Alvarez-Fischer et al., 2008; Gibrat et al., 2009) (табл. 1).

Для изучения роли α -синуклеина в норме и при БП, а также возможного предотвращения агрегирования данного белка и ряда других белков с помощью потенциальных лекарственных веществ используют генетические модели. Помимо мутации гена α -синуклеина у больных с идиопатической формой БП обнаружены мутации генов *DJ-1*, *parkin*, *tau*, *LRRK2*, *UCH-1*, **митохондриальных белков**, например *PINK-1*. Создание генетических моделей основано на изменении экспрессии ряда генов, которые контролируют синтез определенных белков, их функциональную активность и протеолиз, включая и «выключение» этих генов (knock-out). При этом на генетических моделях, как правило, не удастся воспроизвести специфические для БП нарушения моторного поведения (Dauer, Przedborski, 2003).

В данной главе дается анализ моделей БП, имитирующих в наибольшей степени патогенез БП.

2. Нейротоксические модели клинической стадии болезни Паркинсона

Разработка нейротоксических моделей БП на животных началась более 40 лет назад, причем в подавляющем числе работ используют схемы введения токсинов, которые приводят к гибели большей части ДА-ергических нейронов нигростриатной системы и к снижению содержания ДА в стриатуме ниже порогового уровня, при котором появляются нарушения моторного поведения. Фактически эти модели

воспроизводят терминальную стадию БП и сопровождаются высокой летальностью животных. Нейротоксические модели БП можно разделить на два класса – модели, созданные на основе неспецифических нейротоксинов (ротенон, паракват) и специфических нейротоксинов ДА-ергических нейронов (6-гидроксидофамина (6-ГДА) и 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридина/1-метил-4-фенилпиридиум иона (МФТП/МФП+)).

2.1. Модели на основе введения 6-гидроксидофамина

6-ГДА – структурный аналог ДА, что объясняет его избирательный захват в ДА-ергические и норадренергические нейроны с помощью соответственно мембранного транспортера ДА (ДАТ) и транспортера норадреналина (Luthman et al., 1989). В нейронах 6-ГДА накапливается в цитозоле, где при участии фермента деградации ДА моноаминоксидазы (МАО) метаболизируется в дигидрофенилуксусную кислоту (ДОФУК), либо окисляется с образованием перекиси водорода и/или 6-ГДА-хинона, что приводит к образованию активных форм кислорода и окислительному стрессу в нейроне с последующей его гибелью (рис. 1) (Cohen, Werner, 1994). В качестве доказательства развития окислительного стресса при действии

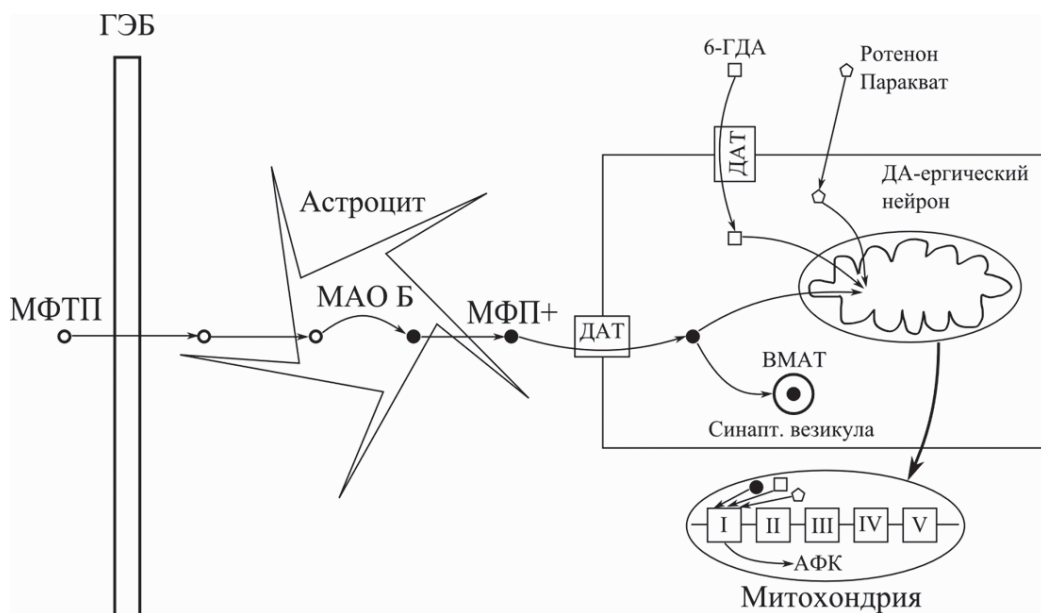


Рис. 1. Механизм действия нейротоксинов (6-ГДА, МФТП, ротенон и паракват) на ДА-ергические нейроны (Schober, 2004).

АФК – активные формы кислорода, VMAT – везикулярный транспортер моноаминов, ДА-ергический нейрон – дофаминергический нейрон, ДАТ – мембранный транспортер дофамина, 6-ГДА – 6-гидроксидофамин, ГЭБ – гематоэнцефалический барьер, MAO B – моноаминоксидаза B, МФП+ – 1-метил-4-фенилпиридиум ион, МФТП – 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридин, синапт. везикула – синаптическая везикула

6-ГДА было показано нейропротекторное действие антиоксидантов после введения этого токсина (Hou et al., 1997). Действие 6-ГДА можно ограничить только ДА-ергическими нейронами, используя ингибитор обратного захвата норадреналина или вводя нейротоксин в области мозга, где в основном локализованы ДА-ергические нейроны – тела или аксоны, такие как ЧС или стриатум.

Для моделирования БП с помощью 6-ГДА чаще всего используют грызунов, особенно крыс. 6-ГДА не проникает через гематоэнцефалический барьер, поэтому его стереотаксически вводят в мозг – в боковые желудочки мозга, в 3-й желудочек, в большую затылочную цистерну мозга или непосредственно в ткань мозга (Hökfelt, Ungerstedt, 1973; Cadete et al., 1989; Sauer, Oertel, 1994). Внутрижелудочковое и внутривентрикулярное введение нейротоксина вызывает обширные билатеральные повреждения катехоламинергических нейронов. При введении в боковые желудочки или 3-й желудочек 6-ГДА по мере транспортировки с ликвором диффундирует в 4-й желудочек и в перивентрикулярные отделы мозга – последовательно в стриатум, медиобазальный гипоталамус и в ЧС (Bosler, Calas, 1982). Согласно нашим данным, через две недели после введения 6-ГДА в 3-й желудочек мозга уровень ДА снижается в ЧС на 30%, а в стриатуме на 75% (Дильмухаметова и др., 2009). Эти различия объясняются более высоким содержанием мембранного транспортера ДА в нигростриатных нейронах, чем в тубероинфундибулярных нейронах (Freed et al., 1995; Behrouz et al., 2007). При внутрижелудочковом введении существует прямая зависимость между снижением содержания катехоламинов в ткани мозга от дозы 6-ГДА. Так, введение большой дозы токсина приводит к билатеральному снижению ДА до 95%, что сопровождается развитием у животных афагии (Ungerstedt, 1971; Zigmond, Stricker, 1973; Rowland, Stricker, 1982; Sakai, Gash, 1994). Введение меньшей дозы 6-ГДА приводит к незначительным нарушениям моторного поведения у крыс, которые, однако, можно усилить стрессированием животного (Stricker, Zigmond, 1974).

Широко распространено моделирование БП путем стереотаксического введения токсина непосредственно в ткань мозга крысам. Наиболее часто используют введение в ЧС, где локализуются тела ДА-ергических нейронов, в стриатум – место проекции аксонов, и в медиальный пучок переднего мозга, где проходят их аксоны. В отличие от внутрижелудочкового введения, инъекции в структуры мозга приводят к унилатеральной дегенерации нейронов. Это позволяет использовать контрлатеральную сторону мозга как контроль. Однако следует помнить, что в ряде работ были показаны изменения и в контрлатеральной стороне после введения 6-ГДА, что объясняется незначительным перекрестом аксонов ДА-ергических нейронов (Schallert et al., 1983; Warena, McKenzie, 1987; Robinson, Whishaw, 1988; Schwarting, Huston, 1996; Kozlowski et al., 2004), такой способ введения также позволяет избежать афагии у животных, но при этом развиваются асимметричные моторные нарушения у крыс (Schallert et al., 2000), такие как поворот головы и отклонение хвоста в направлении поврежденной стороны, появляются стереотипные вращательные движения в ипсилатеральном по отношению к повреждению направлении, так называемая «вертячка». Однако данные движения проявляются только после системного введения агонистов ДА или веществ, стимулирующих высвобождения ДА (например метамфетамина). Необходимо отметить, что такого

рода нарушения моторной функции не соответствуют характерным симптомам БП (Ungerstedt, Arbuthnott, 1970; Donnett, Bjorklund, 1999; Helfi et al., 1980). В ответ на введение агониста ДА-рецепторов возникает вращение в противоположную сторону (Kordower et al., 1986; Rodriguez et al., 2001). У некоторых животных, в том числе и крыс, возникает тоническая кривошея. Часто развивается атаксия. У обезьян развивается тортиколлис, выражающийся в повороте головы вокруг продольной оси туловища до 120–180°, возникают круговые движения в сторону повреждения. Необычные для паркинсонизма симптомы редуцируются при введении агониста ДА-рецепторов апоморфина, что свидетельствует об их связи со снижением активности ДА-ергической системы. Тем не менее, моторные симптомы нейроинтоксикации 6-ГДА значительно отличаются от симптомов паркинсонизма.

Введение 6-ГДА в стриатум вызывает медленную ретроградную дегенерацию ДА-ергических нейронов, по крайней мере, в течение одного месяца (Sauer, Oertel, 1994; Przedborski et al., 2000), что дает возможность поиска лекарственных веществ с нейропротекторными свойствами. Дегенерация терминалей аксонов начинается уже через 1 час после введения 6-ГДА, а пик дегенерации тел нейронов приходится на период с 7 по 10 день. В ранних работах получены косвенные доказательства дегенерации нейронов по пути апоптоза – уменьшение степени дегенерации нигростриатной системы с помощью ингибиторов каспазы 3 (Jonsson, 1983; Cutillas et al., 1999; He et al., 2000). Однако в последних публикациях не удалось обнаружить активации каспаз после унилатерального введения 6-ГДА (Ebert et al., 2007). Введение 6-ГДА в медиальный пучок переднего мозга приводит к гибели нейронов по пути апоптоза (He et al., 2000; Zuch et al., 2000), а введение в ЧС приводит к гибели по неапоптотическому пути (Jeon et al., 1995). Также введение 6-ГДА в медиальный пучок переднего мозга или в ЧС вызывает более быструю и массивную гибель ДА-ергических нейронов, нежели в стриатуме. Так, уже через 12 часов после введения 6-ГДА наблюдается гибель до 80% тел ДА-ергических нейронов с пиком через 72 часа (Faull, Laverty, 1969). Однако данный способ введения 6-ГДА приводит также и к гибели ДА-ергических нейронов в вентро-теgmentальной области мозга, что соответствует поздней клинической стадии БП (Hokfelt, Ungerstedt, 1973; Smith et al., 2003).

Небольшие дозы 6-ГДА при введении как в желудочки мозга, так и в структуры мозга, вызывают незначительную гибель тел ДА-ергических нейронов и допороговое снижение ДА в стриатуме, имитируя изменение нигростриатной ДА-ергической системы на доклинической стадии БП, однако только по этому показателю (Abercrombie et al., 1990; Bergstrom, Garris, 2003; Ossowska et al., 2005).

2.2. Модели на основе введения

1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридина

1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридин (МФТП) – предшественник специфического для ДА-ергических нейронов токсина МФП+. МФТП привлек внимание ученых при обнаружении специфических нарушений двигательных функций, характерных для БП, у людей, синтезирующих героин, а также у наркоманов

(Langston et al., 1983). Более того, клинические и эпидемиологические исследования доказали, что использование героина приводит к развитию тяжелого паркинсонического синдрома (Langston et al., 1999). Последующие экспериментальные исследования показали, что МФТП вызывает дегенерацию nigrostriатной DA-ергической системы у животных, подобную той, которая наблюдается у человека при БП (Langston et al., 1983; Snow et al., 2000). Подтверждением сходства патогенетических механизмов БП и МФТП-синдрома является возможность коррекции моторных симптомов при помощи агонистов DA (Langston, Ballard, 1984).

В отличие от 6-ГДА, МФТП легко проникает в мозг через гематоэнцефалический барьер, захватывается клетками глии, где с помощью фермента дегенерации DA – MAO B, метаболизируется в N-метил-4-фенил-2,3-дигидропиридин-ион (МФДП+), который окисляется до МФП+, токсина DA-ергических нейронов. МФП+, будучи структурным аналогом DA, проникает в DA-ергические нейроны с помощью DAT, где ингибирует первый комплекс дыхательной цепи митохондрий, что приводит к окислительному стрессу, снижению уровня АТФ в нейроне и в конечном итоге – к гибели DA-ергических нейронов – ключевому проявлению патогенеза БП (см. рис. 1) (Langston et al., 1983; Nicklas et al., 1985; Mizono et al., 1987; Gerlach, Riederer, 1996; Przedborski et al., 2000). Отсюда следует, что МФТП-индуцированная патология nigrostriатной DA-ергической системы является весьма адекватной экспериментальной моделью БП. Классическими объектами для моделирования БП с помощью МФТП являются мыши, крысы, кролики, кошки, минисвиньи и обезьяны (Кучеряну, Крыжановский, 2000; Arai et al., 1990; Schneider et al., 1994; Mikkelsen et al., 1999). Однократная инъекция МФТП у большинства видов грызунов не приводит к значительному накоплению нейротоксина, т.к. МФТП (протоксин) практически полностью выводится из мозга в первые сутки. Лишь у обезьян протоксин и МФП+ (активный токсин) в значительном количестве аккумулируются в мозге и сохраняются на протяжении 20 дней (Johannesse et al., 1985). Несмотря на то, что чувствительность к МФТП гораздо выше у обезьян, самым распространенным объектом для моделирования БП с помощью МФТП являются мыши.

2.2.1. Моделирование болезни Паркинсона на грызунах

Классическим объектом для моделирования БП с помощью МФТП являются мыши, чаще всего линии C57/BL6 (Sedelis et al., 2001; Tillerson et al., 2002). Нейротоксическое действие МФТП зависит от способа введения (Gerlach, Riederer 1996), пола (Freyaldenhoven et al., 1996) и вида мышей (Sonsalla, Heikkila, 1986; Sundström et al., 1987; Schwarting et al., 1999; Sedelis et al., 2001). В опытах на мышках показано, что МФТП повреждает преимущественно nigrostriатные пути, вызывая дегенерацию DA-ергических нейронов (Muthane et al., 1994) и снижение уровня DA в стриатуме (Tillerson et al., 2002). Это и приводит к двигательным расстройствам: акинезии, ригидности, гипомимии, тремору, феномену застывания (freezing phenomenon) (Langston et al., 1983, 1986, 1999; Bankiewicz et al., 1986; Kurosaki et al., 2004; Smeyne, Jackson-Lewis, 2005).

Было разработано несколько схем введений МФТП – острая, подострая и хроническая. Острая схема введения МФТП предполагает одно или несколько введений токсина в течение одного-двух дней. К самым распространенным можно отнести однократное введение МФТП в дозе 40–50 мг/кг; четырехкратное введение МФТП в дозе от 15–20 мг/кг с 2-часовым интервалом, двукратное введение в дозе 30–50 мг/кг с 16-часовым интервалом между инъекциями. Однократное введение большой дозы МФТП вызывает большую смертность животных, что существенно снижает ценность модели. Высокой летальности можно избежать при использовании двукратного или четырехкратного введения МФТП, но в меньшей разовой дозе (Linder et al., 1987). **При острой схеме введения погибает большая часть ДА-ергических нейронов**, так при однократном введении МФТП в дозе 50 мг/кг погибает до 60% нейронов в ЧС (Sundstrom et al., 1987a; Linder et al., 1987).

Подострые схемы введения МФТП предполагают введение МФТП в течение нескольких дней, например, в дозе 20–30 мг/кг в течение 5–10 дней. При этом содержание ДА хотя и снижается значительно по сравнению с контролем, но гибель ДА-ергических нейронов менее выражена, чем при остром введении токсина (Ricaurte et al., 1986; Schneider, Denaro, 1988). **Важным отличием острых и подострых моделей БП является механизм гибели ДА-ергических нейронов.** Предполагается, что при остром введении токсина гибель нейронов происходит путем некроза (Jackson-Lewis et al., 1995; Przedborski, Vila, 2003), в то время как при подострой схеме введения МФТП гибель нейронов происходит путем апоптоза (Tatton, Kish, 1997). Действительно, при подостром введении МФТП увеличивается экспрессия проапоптотического белка Вах и белков семейства Bcl-2, регулирующих как проапоптотические, так и антиапоптотические белки (Vila et al., 2001). Увеличение синтеза Вах совпадает с выделением цитохрома с из митохондрий и с активацией каспаз 9 и 3 (Viswanath et al., 2001). В это же время синтез антиапоптотического белка Bcl-2 снижается в ЧС (Vila et al., 2001), что и приводит к апоптозу нейронов. Доказательством этого является то, что мыши с нокаутом гена Вах и мыши с увеличенной экспрессией Bcl-2 резистентны к действию МФТП (Yang et al., 1998; Offen et al., 1998; Vila et al., 2001). Причины запуска разных механизмов гибели нейронов при различных схемах введения МФТП, который в любом случае вызывает окислительный стресс, до конца не ясны.

Работ, выполненных на основе хронического введения МФТП, крайне мало, а результаты носят фрагментарный и нередко противоречивый характер. Так, хронические схемы введения МФТП у мышей можно разделить на два типа: ежедневно вводятся небольшие дозы – 4 мг/кг в течение 20 дней (Bezard et al., 1997) или гораздо более значительные дозы – 25 мг/кг, каждые 3,5 дня в течение 5 недель (Lau et al., 1990; Petroske et al., 2001). Так, например, при ежедневном введении небольших доз МФТП (4 мг/кг) изучена только динамика дегенерации ДА-ергических нейронов в ЧС, в то время как отсутствует биохимический анализ изменения содержания катехоламинов в стриатуме и оценка нарушения моторных функций у мышей. Более того, существуют и противоречия с острыми моделями, которые пока трудно объяснить. Так, например, при ежедневном введении в течение 18 дней МФТП в дозе 4 мг/кг нейроны дегенерируют в течение двух дней инъекций, при

этом дальнейшее введение МФТП не вызывает последующей гибели ДА-ергических нейронов. В свою очередь, при однократном введении МФТП в дозе 8 мг/кг не было обнаружено потери нейронов в ЧС. Более того, данная доза нейротоксина не приводит к изменению содержания ДА в nigrostriatной системе (Ugrumov et al., 2011). Поэтому хронические модели БП на мышах требуют дальнейшего исследования, т.к. их значимость очевидна ввиду того, что БП является медленно прогрессирующим нейродегенеративным заболеванием, сопровождающимся включением компенсаторных процессов.

Деградация nigrostriatной ДА-ергической системы под влиянием МФТП, превышающая пороговый уровень (см. раздел 1), приводит к развитию акинетико-ригидного или дрожательно-ригидного синдрома, причем нарушение моторного поведения проявляется вскоре после введения МФТП (Bonuccelli, Fariello, 1989). По данным отдельных авторов, замедление движений возникает при снижении содержания ДА в стриатуме до 40%, что происходит через 3,5–7 часов после введения МФТП (Mitra et al., 1992). На ранней стадии деградации ДА-ергических нейронов моторную недостаточность можно обнаружить только с помощью провокационных тестов, например при использовании ингибитора рецепторов к ДА – галоперидола. Для количественной оценки моторного поведения используют следующие тесты: открытое поле, плавание в холодной воде, с шестом с шариком на конце по времени спуска вниз, строительство гнезда (Weihmuller et al., 1988, 1990; Takahashi et al., 1989; Sedelis et al., 2001). Скрытые расстройства двигательной функции также выявляются в тестах удержания на вращающемся цилиндре (Kelly et al., 1998). Совместное введение МФТП с амфетамином, вызывающее двигательную функцию типа лазания (карабканья), является информативным тестом на потерю пре- и постсинаптических ДА-рецепторов (Spooren et al., 1998). Наряду описанными нарушениями моторного поведения после введения МФТП в ряде случаев наблюдается дрожание всего тела (Bonuccelli, Fariello, 1989; Mitra et al., 1992; Chang et al., 1993; Muralikrishnan, Mohanakumar, 1998). Обычно оно возникает у старых мышей, хотя может быть и у молодых при применении высокой дозы МФТП (Georgiev, Kambourova, 1991). У грызунов под влиянием МФТП проявляются и другие нарушения моторного поведения, характерные для БП – ригидность и «горбатость», сохраняющиеся во время движения (Chang et al., 1993; Muralikrishnan, Mohanakumar 1998).

2.2.2. Моделирование болезни Паркинсона на обезьянах

МФТП как у людей, так и у обезьян вызывает необратимый и тяжелый синдром паркинсонизма со всеми основными признаками БП, включая нарушения моторики – тремор, ригидность, замедленность движений. Частота тремора покоя, характерная для БП – 4–7 Гц, была обнаружена только у африканских зеленых маргитшек (Tetrud et al., 1986), в то время как у остальных обезьян наблюдается только постуральный/кинетический тремор. Более того, у обезьян, как и у больных, было обнаружено нарушение когнитивных функций, включая внимание. Так, в работе

(Stern et al., 1990) подчеркивается, что, поскольку у людей с синдромом паркинсонизма, вызванным МФТП, проявляется симптоматика, характерная для БП, можно ожидать, что такие же проявления поведения можно вызвать и у обезьян при моделировании БП (Stern et al., 1990). Из семи случаев паркинсонизма у людей, вызванного МФТП, у пятерых развилась дискинезия в первый год после приема L-ДОФА, а в остальных случаях позднее (Langston, Ballard, 1984). Снижение эффективности препарата L-ДОФА и развитие дискинезии также является основной проблемой лечения пациентов при БП. С этой точки зрения, с помощью моделирования БП на обезьянах пытаются определить молекулярные механизмы, которые вызывают эти дискинезии, и возможные пути их коррекции (Blanchet et al., 2004). Так, на обезьянах, подвергшихся воздействию МФТП, агонисты D3-рецепторов снижают L-ДОФА-индуцированную дискинезию, не влияя при этом на другие симптомы БП. Патологоанатомические исследования, проведенные как на людях, так и на обезьянах, подвергшихся воздействию МФТП, показали дегенерацию DA-ергических нейронов в среднем мозгу. При этом степень дегенерации нейронов, расположенных в ЧС, значительно превышает гибель нейронов в вентро-теgmentальной области (Seniuk et al., 1990; Muthane et al., 1994). Также было показано, что введение МФТП обезьянам приводит к большей потере терминалей аксонов в путамене, чем в хвостатом ядре, что согласуется с клиническими данными (Moratalla et al., 1992; Snow et al., 2000).

Существуют два подхода к моделированию БП на обезьянах, которые приводят к деградации nigrostriatной системы мозга. Первый подход – это острое введение МФТП, что вызывает быструю гибель DA-ергических нейронов и быстрое появление моторных симптомов (Burns et al., 1983). При этом обезьянам обычно вводят довольно большие дозы нейротоксина – от 0,33 до 0,75 мг/кг, внутривенно или внутримышечно в течение 9–32 дней. Второй подход предполагает хроническое введение МФТП (4–7 мес) в относительно небольшой разовой дозе – 0,05–0,15 мг/кг 3 раза в неделю (Schneider, 1990; Schneider, Kovelowski, 1990). При этом нарушению моторной функции предшествуют когнитивные расстройства. После появления нарушений когнитивных функций начинают постепенно увеличивать ежедневную дозу МФТП, продолжая введение примерно еще 6 месяцев до появления первых моторных симптомов: тремор, брадикинезия и т.д. Другими словами, такие модели воспроизводят не только клиническую, но и доклиническую стадию БП (Schneider, Kovelowski, 1990; Schneider, Pope-Coleman, 1995; Schneider et al., 1998; Decamp et al., 2004).

Несмотря на возможность моделирования на обезьянах паркинсонизма с воспроизведением деградации DA-ергической nigrostriatной системы и моторной симптоматики, у этих моделей существуют и определенные недостатки. Так, в отличие от обезьян, у человека при БП нарушение когнитивных функций происходит на поздней клинической стадии заболевания – после появления моторных симптомов. Кроме того, даже при хроническом введении МФТП скорость деградации DA-ергической nigrostriatной системы гораздо выше, чем у пациентов при БП. Так, при средней продолжительности жизни обезьян 20 лет досимптомная стадия

при моделировании БП с помощью МФТП составляет 1/20 часть жизни, в то время как у людей доклиническая стадия БП составляет 1/6 часть жизни.

Таким образом, появление характерных для БП моторных симптомов и деградацию nigrostriатной системы можно смоделировать у грызунов и обезьян с помощью МФТП – путем острого, подострого и хронического введения. В силу этого модели МФТП-индуцированного паркинсонизма у животных могут быть использованы для изучения патогенеза идиопатической БП и разработки патогенетической терапии.

2.2.3. Недостатки моделей болезни Паркинсона на основе введения 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридина

Несмотря на то что нейротоксические модели на грызунах в значительной степени воспроизводят БП, существует и ряд недостатков. В первую очередь это относится к обратимости функциональной недостаточности nigrostriатной системы за счет компенсаторных процессов, которые в гораздо большей степени выражены у животных, чем у человека (Угрюмов, 2007; Zigmond, 1997; Bezard, Gross, 1998; Ugumov, 2008). Кроме того, на нейротоксических моделях, вызванных 6-ГДА и МФТП, пока не удалось выявить признаков протеинопатии и образования токсических белков, особенно растворимых олигомеров α -синуклеина, которые со временем превращаются в нерастворимые агрегаты, депонирующиеся в тельцах Леви (Shimoji et al., 2005, Gibrat et al., 2009). Противоречивые результаты в отношении этого показателя были получены и при использовании хронических моделей паркинсонизма на мышах при введении МФТП с помощью минипомпы. Тем не менее, в одной из работ было показано, что при ежедневном введении МФТП в дозе 30 мг/кг/день в течение 30 дней на фоне гибели более чем 75% nigrostriатных DA-ергических нейронов в сохранившихся нейронах наблюдалась агрегация α -синуклеина. Аналогичные структуры были обнаружены и в голубом пятне, месте локализации норадренергических нейронов (Fornai et al., 2005). Однако в последующих работах при использовании похожих схем введения МФТП агрегации и накопления α -синуклеина в DA-ергических нейронах не было обнаружено (Alvarez-Fischer et al., 2008, Gibrat et al., 2009).

Интересно, что при моделировании БП с помощью МФТП у молодых обезьян, так же как и у грызунов, отсутствует агрегация патологических белков, в то время как у старых обезьян были выявлены структуры, похожие на тельца Леви причем в основном в нейромеланин-содержащих нейронах (Forno et al., 1986, 1993). Формирование нейромеланина происходит за счет полимеризации аминокрома, который, в свою очередь, образуется при окислении DA (Paris et al., 2009). С возрастом у людей, обезьян, лошадей и овец, но не у грызунов, в DA-ергических нейронах в ЧС и норадренергических нейронах голубого пятна происходит накопление нейромеланина (Marsden, 1961). Нейроны, содержащие нейромеланин, в большей степени подвержены дегенерации, чем нейроны, лишенные нейромеланина (Hirsch et al.,

1988; Herrero et al., 1993), что может быть связано с его токсичностью (Zhang et al., 2009, 2011). По мнению авторов работы (Bezard et al., 2013), различия в метаболизме ДА-ергических нейронов у обезьян и грызунов, такие как образование и накопление нейромеланина с возрастом, каким-то образом обуславливают различную чувствительность нейронов к повреждающим факторам, что может служить объяснением видовых особенностей патогенеза паркинсонизма, в частности агрегацию α -синуклеина только у обезьян.

2.3. Модели на основе введения параквата

Эпидемиологические исследования показали, что длительное воздействие параквата – одного из наиболее широко распространенных гербицидов, повышает риск развития БП у человека (Liou et al., 1997; Shimizu et al., 2001; McCormack et al., 2002). Важно отметить, что паракват (1,1'-диметил-4,4'-бипиридиinium) имеет структурные сходства с МФП+ и с ДА (Brooks et al., 1999; McCormack, Di Monte, 2003). Однако, несмотря на структурное сходство параквата с МФП+, проникновение в мозг и механизм действия внутри нейрона у них разные. Паракват, так же как и МФП+, является заряженной молекулой, но в отличие от МФП+ проникает в мозг с помощью транспортера нейтральных аминокислот (Shimizu et al., 2001; McCormack, Di Monte, 2003). Так, введение L-валина или L-фенилаланина до инъекции параквата животным полностью защищает нейроны в мозге от нейродегенерации (Brooks et al., 1999). **Токсический эффект параквата, как полагают, связан с образованием супероксидных радикалов (Przedborski, Ischiropoulos, 2005), но при этом обладает низкой аффинностью к I комплексу дыхательной цепи митохондрий.**

Данные об эффекте параквата на ДА-ергические нейроны довольно противоречивы, особенно, учитывая то, что он обладает низкой специфичностью к ДАТ (Richardson et al., 2005). **В одних работах были показаны нарушения двигательной функции и гибель ДА-ергических нейронов после введения параквата мышам (Brooks et al., 1999; McCormack et al., 2002). Однако не было обнаружено дегенерации нейронов, которые экспрессируют γ -аминомасляную кислоту, глутаматергических нейронов и ДА-ергических нейронов вентро-теgmentальной области после введения параквата.** Природа такой довольно высокой специфичности остается неясной (Richardson et al., 2005). Другие исследователи при использовании параквата не обнаружили ни изменений в двигательной функции, ни гибели ДА-ергических нейронов, хотя в последующих своих исследованиях показали, что происходит дегенерация nigrostriatной системы (Thiruchelvam et al., 2000a,b; McCormack et al., 2002). Однако даже в тех работах, где была показана дегенерация ДА-ергических нейронов nigrostriatной системы, не было обнаружено изменений в уровне ДА в стриатуме (Thiruchelvam et al., 2000b; McCormack et al., 2002).

Эффект параквата усиливается фунгицидом манебом – этилен-бис-дитиокарбаматом марганца, который предположительно влияет на активность антиоксидантных ферментов (Grosicka-Maciag et al., 2013). **Совместное применение параквата и манеба приводит к более выраженной дегенерации ДА-ергических нейронов**

нигростриатной системы и нарушению двигательной функции (Thiruchelvam et al., 2000a,b). При этом было показано статистически недостоверное снижение концентрации ДА в стриатуме на 20%. До сих пор не ясно, как столь незначительное снижение уровня ДА в стриатуме может быть причиной нарушений двигательной функции животных. Вероятно, наблюдаемые при этом изменения локомоторики связаны с токсическим влиянием параквата на легкие (Clark et al., 1966; Smith, Heath 1976; Cicchetti et al., 2005; Saint-Pierre et al., 2006).

Привлекательностью параквата как токсина для моделирования БП является индуцированная им агрегация α -синуклеина в ДА-ергических нейронах ЧС, что характерно для патогенеза БП (Manning-Bog et al., 2002; Fernagut et al., 2007; Mak et al., 2010). Несмотря на это, паракват вряд ли стоит использовать для моделирования паркинсонизма на животных, поскольку он не вызывает выраженного эффекта на уровень ДА в стриатуме.

2.4. Модели на основе введения ротенона

Первая модель БП на животных была создана с применением ротенона, широко используемого в сельском хозяйстве в качестве инсектицида и пестицида (Betarbet et al., 2000b). Ротенон за счет высокой липофильности легко проникает через гематоэнцефалический барьер и клеточные мембраны, ингибируя в нейронах I комплекс дыхательной цепи, что приводит к нарушению окислительного фосфорилирования в митохондриях (Schuler, Casida, 2001), а также подавляя полимеризацию тубулина и деполимеризацию микротрубочек (Brinkey et al., 1974).

Введение ротенона в больших дозах по острой схеме приводит к дегенерации не только ДА-ергических нейронов нигростриатной системы, но и нейронов в других областях мозга (Heikkila et al., 1985; Ferrante et al., 1997; Rojas et al., 2009). При этом погибают 29% холинергических нейронов ядра моста, что сопровождается снижением плотности транспортера серотонина в стриатуме на 35%. Также погибают и 26% норадренергических нейронов голубого пятна, и мотонейроны спинного мозга (Höglinger et al., 2003; Lapointe et al., 2004; Samantaray et al., 2007). При этом отсутствует линейная зависимость числа погибших нейронов от дозы токсина, так же как и степень повреждения ДА-ергической системы в ответ на введение ротенона не коррелирует с выраженностью двигательных нарушений у животных, в отличие от МФТП-индуцированных моделей (Fleming et al., 2004). С другой стороны, при хроническом введении ротенона в яремную вену с помощью минипомпы была показана селективная дегенерация ДА-ергических нейронов (Betarbet et al., 2000b). Учитывая то, что ротенон ингибирует I комплекс дыхательной цепи митохондрий во всех нейронах, деградация только нигростриатной системы предполагает более высокую чувствительность нигростриатных ДА-ергических нейронов к повреждающим факторам (Tieu, 2011).

Важной позитивной характеристикой моделей БП на основе ротенона с точки зрения моделирования БП является то, что этот токсин вызывает образование внутриклеточных скоплений, содержащих α -синуклеин и убиквитин (Sherer et al., 2003;

Höglinger et al., 2003). Напротив, существенным недостатком этой модели является ее плохая воспроизводимость (Höglinger et al., 2003; Fleming et al., 2004; Lapointe et al., 2004; Zhu et al., 2004), что существенно затрудняет и ограничивает ее использование.

2.5. Модели на основе введения холиномиметиков

Приведенные выше способы моделирования паркинсонизма основаны на повреждении ДА-ергической nigrostriатной системы, воспроизводящей первичный дефицит тормозного нейротрансмиттера ДА в стриатуме и связанные с ним генераторные, детерминантные и системные патофизиологические механизмы паркинсонических симптомов. Дефицит ДА в стриатуме является одним из механизмов индукции гиперактивности холинергических нейронов, образующих генератор патологически усиленного возбуждения. Другой механизм может быть связан с первичной гиперактивацией ацетилхолиновых нейронов, создающей вторичную недостаточность их тормозного контроля (Крыжановский и др., 2002). Для изучения этого патогенетического механизма паркинсонического синдрома используются модели, воспроизводящие первичную гиперактивацию никотиновых холинорецепторов. С этой целью применяется ацетилхолин или другие агонисты никотиновых холинорецепторов, в комбинации с прозеринном, ингибирующим холинэстеразу. Введение ацетилхолина с прозеринном в ростральные отделы хвостатых ядер вызывает формирование генератора патологически усиленного возбуждения в хвостатых ядрах, гиперактивацию нейронов бледного шара и вентромедиальных ядер таламуса, что приводит к индукции паркинсонического синдрома с преобладанием его дрожательно-ригидной формы (Крыжановский и др., 1993). Внутрикаудатное введение ацетилхолина приводит к тяжелым и длительным пароксизмам тремора. Холиномиметики такрин, мускарин моделируют гипокинезию, задержку инициации движений, тремор челюсти (Finn et al., 1996; Mayorga et al., 1996). Таким образом, ацетилхолин при внутристриатном применении воспроизводит ключевой патофизиологический механизм патогенеза паркинсонизма – генератора патологически усиленного возбуждения, обусловленный относительным дефицитом тормозного нейротрансмиттера ДА, и паркинсонический синдром. В силу этого ацетилхолиновая модель может расцениваться как патогенетическая модель паркинсонизма.

3. Генетические модели

БП и ювенильный паркинсонизм являются идиопатической патологией – первичной, наследственно обусловленной недостаточностью специфических медиаторных систем мозга. К настоящему времени известны гены, имеющие отношение к идиопатическому паркинсонизму: ген α -синуклеина, гены *DJ-1*, *LRRK2*, *Parkin*, *UCH-L1*, *PINK1*, митохондриальные респираторные гены. Генетические модели основаны на выключении (**knock out**) или изменении экспрессии ряда генов, бел-

ки которых контролируют синтез специфических белков, а также на мутации этих генов, что определяет функциональную активность и протеолиз соответствующих белков.

В качестве объектов для моделирования БП выступают разные виды животных, начиная от *Caenorhaditis elegans*, *Drosophila melanogaster* и *Zebra fish*, заканчивая грызунами (мыши, крысы). Более того, ведутся работы на культуре клеток, что существенно снижает время для проведения исследования, но позволяет только грубо оценить вклад различных генов и соответствующих белков в те или иные пути метаболизма клетки (нейрона). Среди исследований влияния генных манипуляций на дегенерацию ДА-ергических нейронов наибольший интерес представляют работы на мышах, т.к. организация их нигростриатной системы и базальных ганглиев и их регуляция во многом схожа с таковыми у обезьян и людей, но, с другой стороны, жизненный цикл у них довольно короткий.

3.1. Модели на основе модификации гена α -синуклеина

Первая мутация при БП была обнаружена в гене, кодирующем α -синуклеин (Polymeropoulos et al., 1996). Показано 3 мутации – A30P, A53T, E46K (Polymeropoulos et al., 1997; Krüger et al., 1998; Zarranz et al., 2004). Увеличение экспрессии гена (не мутированного) также является причиной развития заболевания, например дупликация или трипликация (Singleton et al., 2003; Chartier-Harlin et al., 2004; Норе et al., 2004). К факторам, повышающим риск развития БП, относится полиморфизм в промоторе α -синуклеина (Maraganore et al., 2006; Winkler et al., 2007).

Альфа-синуклеин – синаптический белок, который в норме не имеет постоянной третичной структуры, при связывании с мембраной N-конец α -синуклеина приобретает структуру α -спирали, но при этом неправильная «укладка» белка приводит к его агрегации. Существует несколько этапов образования агрегатов α -синуклеина, включая олигомеры (протофибриллы), фибриллы и собственно тельца Леви, где протофибриллы токсичны для нейронов (Li et al., 2005). Такие токсичные формы α -синуклеина играют важную роль при нейродегенерации (Cookson, 2005; Gupta et al., 2008), и мутации в гене этого белка повышают склонность к неправильному сворачиванию α -синуклеина и его агрегации (Kalia et al., 2013).

С учетом столь важной роли α -синуклеина в патологии БП были разработаны несколько генетических « α -синуклеиновых» моделей. Увеличенная экспрессия (overexpression) α -синуклеина немутантного или с заменами A53T, A30P у *D. melanogaster* вызывает дегенерацию ДА-ергических нейронов, усиливающуюся при старении животного, с образованием включений с α -синуклеином (похожие на тельца Леви), а также нарушения двигательной функции (Feany, Bender, 2000). Действительно ли происходит гибель ДА-ергических нейронов или это только потеря маркера – ТГ этих нейронов, остается неясным (Pesah et al., 2005). Увеличенная экспрессия α -синуклеина у *C. elegans* вызывает гибель ДА-ергических нейронов, но без накопления агрегированного α -синуклеина (телец Леви) (Kawahara et al., 2006). Существенным минусом данных объектов (беспозвоночных) является то,

что у них не экспрессируется эндогенный α -синуклеин и не показано характерных для БП симптомов (тремор, брадикинезии и тд.). Поэтому, несмотря на прогрессирующую гибель ДА-ергических нейронов у *D. melanogaster*, данные модели следует использовать с крайней осторожностью, особенно при интерпретации полученных на ней результатов.

Наряду с моделями на беспозвоночных создано несколько линий трансгенных мышей, у которых гена α -синуклеина либо вообще нет (knocked-out), либо повышена его экспрессия (overexpression) (на основе генов A30P, A53T или A30+A53T). Мыши с нокаутом гена α -синуклеина проявляют меньшую активность в открытом поле; у них снижено содержание ДА в стриатуме (Chandra et al., 2004). Одним из патогенетических механизмов действия α -синуклеина у мышей, экспрессирующих мутантный A53T человека, является нарушение «проницаемости переходных пор» митохондрий (mPTP), которые образуются на внутренней мембране (Martin et al., 2006, 2014). Такое нарушение может привести к набуханию митохондрий с дальнейшей гибелью нейронов. В частности, генетическое удаление циклофилина D, модулятора mPTP, задерживало начало заболевания и увеличивало продолжительность жизни у мышей с мутантной формой α -синуклеина. Мыши, лишённые α -синуклеина полностью (Dauer et al., 2002; Thomas et al., 2011; Martin et al., 2014) или частично (Drolet et al., 2004), резистентны к нейротоксическому действию МФТП. Чрезмерная экспрессия α -синуклеинового гена (во много раз превышающая значения эндогенного α -синуклеина) приводит к разнообразным патологиям и изменениям поведения (Rockenstein et al., 2002). У большинства линий мышей с повышенной экспрессией α -синуклеина патологические отклонения возникают во многих структурах мозга, в том числе и в нигростриатной ДА-системе (Richfield et al., 2002; Rockenstein et al., 2002). У трансгенных мышей повреждения ДА-нейронов вызываются редко (Matsuoka et al., 2001), но при экспрессии одновременно двух мутаций гена (A30P+A53T), связанных с промотором экспрессии гена ТГ, α -синуклеин накапливается в телах ДА-ергических клеток, но тельца Леви в нигростриатной системе не развиваются. Кроме того, число ДА-ергических нейронов в ЧС и уровень ДА в стриатуме не изменяются (Dawson et al., 2010).

Эти результаты предполагают, что только повышения экспрессии α -синуклеина в нигростриатной ДА системе недостаточно для запуска нейродегенерации. У трансгенных мышей, экспрессирующих дважды мутированный ген $hm2\alpha$ -синуклеина, связанный с промотором ТГ крысы, происходит прогрессивное уменьшение плотности транспортера ДА (ДАТ) и содержания ДА в стриатуме (Richfield et al., 2002). У этих мышей с возрастом также снижаются спонтанная двигательная функция и вращательные движения, вызванные введением апоморфина и амфетамина (Richfield et al., 2002; Thiruchelvam et al., 2004). Следует отметить, что усиление экспрессии мутантного гена A53T α -синуклеина у мышей приводит к аномальному распределению мутантного трансгенного белка в телах, аксонах и дендритах нейронов во многих структурах мозга. При этом не наблюдается агрегации и накопления белка (Gispert et al., 2003), хотя отмечены нарушение походки, ослабление силы схватывания и сжимания предметов и нарушения устойчивости тела на вращающемся валике. В отличие от мышей с повышенной экспрессией человеческого α -синуклеина

(нормального или мутантного A53T) в нейронах nigrostriатной системы у крыс происходит накопление в цитоплазме большого количества белка, гибель DA-ергических нейронов от 30 до 80%, уменьшение DA и TH в стриатуме на 40–50% (Kirik et al., 2002; Lee et al., 2002).

Показано, что у мышей сверхэкспрессия α -синуклеина в корковых и подкорковых структурах мозга, в том числе в нейронах ЧС в присутствии промотора гена *Thy 1*, ведет к аномальным скоплениям в цитоплазме α -синуклеина, чему соответствует ослабление сенсорно-моторных функций при исследовании спонтанного поведения в цилиндре, расстройства походки и затруднение навыков сдирания с лап клейкой ленты или доставания кусочков ваты из урны и т.д. (Fleming et al., 2004).

3.2. Модели на основе модификации гена *LRRK2*

Самыми распространенными мутациями аутосомно-доминантной формы БП являются мутации в гене *LRRK2* (Paisan-Ruiz et al., 2004; Zimprich et al., 2004), которые также обнаруживаются в 4% случаев при спорадической форме БП (Albrecht, 2005). *LRRK2* (лицин-богатая киназа 2 или дардарин) – большой белок с несколькими доменами (Biskup et al., 2006), который обеспечивает белок-белковые взаимодействия, имеет киназную и ГТФазную активность. Риск развития БП у людей с мутацией G2019S *LRRK2* увеличивается с каждым десятилетием жизни: 28% в 59 лет, 51% в 69 лет и 74% в 79 лет (Healy et al., 2008).

Увеличенная экспрессия *LRRK2* в *D. melanogaster* и *C. elegans* приводит к гибели DA-ергических нейронов и нарушениям двигательной функции, усиливающейся с возрастом, а также к уменьшению продолжительности жизни (Liu et al., 2008; Ng et al., 2009; Saha et al., 2009). Учитывая то, что у *D. melanogaster* и *C. elegans* нет эндогенного α -синуклеина, а мутация *LRRK2* способствует агрегации α -синуклеина, то изучение механизма нейродегенерации при мутациях в гене *LRRK2* на данных животных не совсем корректно.

У мышей с нокаутом гена *LRRK2* не было обнаружено влияния соответствующего белка на развитие и выживаемость DA-ергических нейронов (Wang et al., 2008; Andres-Mateos et al., 2009). У трансгенных мышей с *LRRK2* или мутантными формами данного белка (R1441G, G2019S) не обнаружено дегенерации DA-ергических нейронов (Li et al., 2009a, 2010). Однако в большинстве работ были показаны нарушения в nigrostriатной системе, такие как нарушения нейротрансмиссии DA, что иногда приводило к нарушению двигательной функции. Такие изменения расценивают как раннюю стадию дегенерации DA-ергических нейронов. В случае мутации в гене *LRRK2* R1441G обнаружены нарушения двигательной функции, которые усугубляются с возрастом животных и снижаются при лечении L-ДОФА, но дегенерации DA-ергических нейронов не было обнаружено (Li et al., 2009a, 2010). В отличие от трансгенных мышей временная экспрессия патогенного *LRRK2* мутанта G2019S с использованием ампликона простого герпесного вируса (HSV) или аденовирусного вектора для введения генов *LRRK2* в стриатум или ЧС у мышей вызывает дегенерацию DA-ергических нейронов (Dusonchet et al., 2011).

3.3. Модели на основе модификации гена паркина

Как уже было отмечено, паркин, являясь E3 лигазой, вовлекается в процесс убиквитинации белков – выработки сигнала для их последующего разрушения протеасомами (Lim et al., 2005; Schlossmacher, Shimura, 2005). Белок паркин состоит из 465 аминокислот и выключение его функции достигается посредством удаления части гена, а точнее экзона 3 (Goldberg et al., 2003; Itier et al., 2003), 7 (Von Coelln et al., 2004) или 2 (Perez et al., 2005). Показано (Goldberg et al., 2003), что у мышей с выключенной функцией паркина увеличено содержание внеклеточного ДА в стриатуме, уменьшена синаптическая возбудимость звездчатых клеток среднего размера и ослаблены сенсорномоторные функции, связанные с деятельностью nigростриатной системы. В то же время, количество ДА-ергических нейронов в ЧС у этих мышей было таким же, как и у контрольных животных, в отличие от потери большого числа этих нейронов при БП.

В одной из работ сообщалось о сенсорно-двигательных расстройствах у паркин-нокаутных мышей (Itier et al., 2003). Кроме того, у этих мышей меньше высвобождалось ДА в ответ на введение амфетамина, и была сниженная глутаматергическая нейротрансмиссия. Число ДА-ергических нейронов в nigростриатной системе у нокаутных мышей было таким же, как и у контрольных животных. Но у них было уменьшено содержание ДАТ, что может свидетельствовать, как считают авторы, или о снижении плотности терминалей ДА-ергических аксонов, или об адаптивных изменениях в nigростриатной ДА-ергической системе (Itier et al., 2003). По другим данным (Perez et al., 2005), у нокаутных мышей с отсутствием экзона 3 плотность терминалей ДА аксонов в стриатуме не отличалась от контрольной группы. У мышей с отсутствием экзона 7, как и экзона 3, существенной потери ДА-ергических нейронов не происходило (Von Coelln et al., 2004), но была обнаружена гибель норадренергических нейронов голубого пятна (*locus coeruleus*) – еще одного морфологического проявления БП. При отсутствии экзона 2 нейродегенеративных изменений в голубом пятне и сенсорно-моторных расстройств обнаружено не было (Perez et al., 2005). Обзор работ (Dawson, Dawson, 2014), посвященных роли паркина в спорадической форме БП, показал, что инактивация паркина осуществляется через механизмы S-нитрозилирования, окислительный и ДА-стресс, а также механизмы фосфорилирования стресс-активируемой киназой c-Abl, ведущей к аккумуляции AIMP2 и PARIS (ZNF746).

3.4. Модели на основе модификации гена *DJ-1*

Ген *DJ-1* (*PARK7*) связан с ранним началом заболевания (до 40 лет) (Abou-Sleiman et al., 2004). Белок этого гена состоит из 189 аминокислот и является пептидазой. Мутации *DJ-1* встречаются реже, чем мутации паркина (Bandopadhyay et al., 2004). У *DJ-1* нокаутных мышей наблюдается очень раннее одностороннее повреждение ДА-ергических нейронов в ЧС, переходящее в двусторонние повреждения всей nigростриатной оси по мере взросления (Rousseaux et al., 2012). При

уменьшении или отсутствии DJ-1 повышается чувствительность к окислительному стрессу и снижается протеасомная активность (Yokota et al., 2003).

У DJ-1 нокаутных мышей с отсутствием экзона 2 (Goldberg et al., 2003) количество DA-ергических нейронов было таким же, как у контрольной группы (Kim et al., 2005), но была слабее выражена DA-нейротрансмиссия в стриатуме за счет усиления обратного захвата DA. Меньше проявлялась спонтанная двигательная функция в открытом поле и вращательные движения, вызванные амфетамином, чем у контрольных животных (Kim et al., 2005). Кортикальные нейроны нокаутных мышей-эмбрионов проявляли более высокую чувствительность к окислительному стрессу. Повышенная экспрессия DJ-1, наоборот, защищала их от окислительного стресса *in vitro*, а перенос DJ-1 аденовирусным путем диким мышам повышал у них сопротивляемость к токсическому действию МФТП, т.е. ген *DJ-1* защищал DA-ергические нейроны от окислительного стресса. Можно полагать, что дальнейшее изучение генетики БП позволит определить ключевые патогенетические звенья и обеспечит возможность их экспериментального моделирования.

4. Нейроиммунологические модели

Целесообразность создания иммунологических моделей паркинсонизма следует из современных представлений о роли нейроиммунных процессов в развитии БП. Так, для больных при БП характерен синтез анти-DA антител (Крыжановский и др., 1989, 2002; Dahlstrom et al., 1990) и антител к DA-ергическим нейронам при их повреждении (Dahlstrom et al., 1990; Carvey et al., 1991). Нарушение целостности гематоэнцефалического барьера при паркинсонизме создает условия для внедрения нейроантител в патологически измененные структуры мозга.

Для изучения роли нейроиммунных процессов при паркинсонизме разработаны две модели. Одна из них имитирует острую кумуляцию антител к DA в патогенетически значимом для паркинсонизма отделе мозга – хвостом ядра, что возможно при остром прорыве гематоэнцефалического барьера в связи с повреждением стенки микрососуда. Другая модель создается хронической иммунизацией животных белковым конъюгатом DA, что в известной мере воспроизводит перманентный синтез антител к DA, происходящий у больных БП (Крыжановский и др., 1989, 1991). Микроинъекция анти-DA антител в хвостатые ядра крысы вызывает образование генератора патологически усиленного возбуждения и развитие паркинсонических симптомов: брадикинезии, гипокинезии, мышечной ригидности и мелкоамплитудного тремора покоя. Эпизоды акинезии и тремора совпадают с генераторными разрядами. У животных отсутствуют движения вибрисс, что является аналогом гипомимии. Генераторная активность и паркинсонические симптомы проявляются на протяжении 1–3 суток после введения DA-антител. По своим электрофизиологическим характеристикам разряды иммунологически индуцированного генератора патологически усиленного возбуждения не отличаются от разрядов, моделированных в ответ на МФТП или ацетилхолин.

После самопроизвольной ликвидации гиперактивности каудатных структур у животных восстанавливается обычная двигательная и поведенческая активность (Крыжановский и др., 1989). Многократная курсовая иммунизация кроликов белковым конъюгатом ДА с применением полного адьюванта Фрейнда индуцирует синтез анти-ДА антител. В связи с медленным нарастанием синтеза антител неврологически бессимптомная стадия снижения активности ДА-ергической nigrostriatной системы может продолжаться в течение нескольких месяцев. На стадии значительной кумуляции антител к ДА снижается уровень ДА в хвостатом ядре и ЧС, в каудатных структурах образуется генератор патологически усиленного возбуждения и развивается акинетико-ригидная форма паркинсонического синдрома. Животные обнаруживают гипокинезию, резко выраженную брадикинезию, затруднение инициации движений, значительную ригидность мышц туловища и конечностей (Крыжановский и др., 1997). Кролик, помещенный в центр открытого пространства, часами остается неподвижным, сохраняя обычную позу. Животное не реагирует на условный пищевой раздражитель и берет зеленый корм после многократных стартовых попыток. Акинетико-ригидный синдром устойчив и при повторных курсах иммунизации и может поддерживаться на протяжении нескольких месяцев.

Таким образом, иммунологические модели воспроизводят один из патогенетических механизмов паркинсонизма (нейроиммунные процессы в nigrostriatной ДА-ергической системе) и паркинсонический синдром и в силу этого могут рассматриваться как патогенетические модели паркинсонизма. Преимуществом модели активной иммунизации белковым конъюгатом ДА, по сравнению с другими моделями паркинсонизма, является сравнительно большая длительность доклинической стадии заболевания, что позволяет изучать механизмы естественной защиты и восстановления нейронов, а также механизмы компенсации дефицита ДА в стриатуме.

Важной особенностью нейроиммунных моделей является возможность длительного поддержания паркинсонического статуса, что позволяет увеличить продолжительность скрининговых исследований и наблюдений побочных эффектов антипаркинсонических препаратов.

Недостатки нейроиммунного моделирования паркинсонизма связаны с отсутствием воспроизведения инициального патогенетического звена БП – нейродегенеративного процесса. Моделирование начинается с воспроизведения его следствия – дефицита ДА в стриатуме.

5. Нейровоспалительные модели

При БП помимо гибели ДА-ергических нейронов в ЧС была обнаружена активация глии, которая играет ключевую роль в развитии воспалительного процесса (Block, Hong, 2005; Nagatsu, Sawada, 2005; Gao, Hong, 2008). Так, при БП происходит увеличение содержания ферментов, цитокинов в ЧС, которые участвуют в воспалительном процессе, такие как интерлейкин-1-β, интерферон-γ, фактор некроза

опухоли (ФНО), циклооксигеназа-1 и -2, а также синтаза оксида азота (Hirsch et al., 1988; Mogi et al., 1994; Knott et al., 2000; Tansey et al., 2007). Эти вещества связываются либо напрямую с рецепторами, которые запускают гибель клеток, либо действуют опосредованно через образование активных форм кислорода и азота, вызывая тем самым дисфункцию митохондрий и гибель клеток (Rothwell, 2003; Ferrari, Pott Godoy, 2006; Kim, Joh, 2006). Одной из главных задач изучения роли воспалительного процесса при развитии БП, является поиск первопричины: дегенерация нейронов приводит к развитию воспалительного процесса или воспалительный процесс приводит к дегенерации нейронов в ЧС (Hirsch et al., 1998). Чтобы ответить на этот вопрос, использовали модели паркинсонизма, инициированные нейротоксинами (6-ГДА и МФТП), когда в первую очередь шла дегенерация, и смотрели составляющую воспалительного процесса. Для того чтобы изучать «способность» воспалительного процесса запускать дегенерацию нейронов, разработали новые модели паркинсонизма с использованием липополисахаридов, бактериальных эндотоксинов.

При использовании МФТП в качестве нейротоксина для ДА-ергических нейронов было показано увеличение содержания провоспалительных цитокинов, например ФНО (Miller et al., 2009; Smeyne, Jackson-Lewis, 2005), что свидетельствует о важной роли воспаления в дегенерации нейронов в ЧС. Однако были получены противоречивые данные при использовании веществ, ингибирующих глию (Du et al., 2001; Wu et al., 2002; Yang et al., 2003; O'Callaghan et al., 2008). Миноциклин является ингибитором глии, но показано, что в большой степени подавляет активацию микроглии, чем астроцитов. Его использование не оказало нейропротекторного эффекта на ДА-ергические нейроны, что может свидетельствовать о преобладающей роли астроцитов в нейровоспалении на МФТП-моделях.

Так же как и для МФТП, при использовании 6-ГДА в качестве токсина для ДА-ергических нейронов показано увеличение содержания провоспалительных веществ и активация микроглии (Mogi et al., 1999; Nagatsu, Sawada, 2005; McCoy et al., 2006). Миноциклин и ингибитор циклооксигеназы-2, а также ингибитор образования активных форм кислорода оказывают нейропротекторный эффект на этих моделях (He et al., 2001; Lin et al., 2003; Quintero et al., 2006; Koprach et al., 2008).

Липополисахариды, эндотоксины грамотрицательных бактерий запускают воспалительный процесс при связывании с TLR4-рецепторами глии, что приводит к активации клеток: увеличению содержания провоспалительных цитокинов и активных форм кислорода. Впервые эффект липополисахаридов был показан на ТГ-иммунореактивных нейронах среднего мозга крыс *in vitro*, которые инициировали клеточную гибель (Bronstein et al., 1995). В дальнейшем были разработаны разные способы введения липополисахаридов *in vivo*: стереотаксически (в желудочки мозга и в ткани мозга: стриатум и ЧС) и системно, а также разные схемы введения – острые или хронические для взрослых животных и плодов. Во всех случаях наблюдали селективную дегенерацию ДА-ергических нейронов.

Введение липополисахаридов в ЧС активирует микроглию и приводит к гибели ДА-ергических нейронов. Липополисахариды, по-видимому, повреждают гематоэнцефалический барьер, о чем свидетельствуют данные по системному введению

дексаметазона. Дексаметазон является антагонистом рецепторов глюкокортикоидов, т.е. обладает противовоспалительным эффектом, но в норме практически не проникает через гематоэнцефалический барьер. При совместном введении дексаметазона и липополисахаридов, дексаметазон оказывает нейропротекторный эффект в ЧС (Li et al., 2009b).

Введение липополисахаридов в стриатум мышей вызывает прогрессирующую дегенерацию ДА-ергических нейронов, количество которых снижается до 59% через 4 недели после введения токсина, а уровень ДА в стриатуме – до 58%. На этих моделях помимо воспроизведения дегенерации ДА-ергических нейронов в выживших нейронах была обнаружена агрегация α -синуклеина и убиквитина (Hunter et al., 2009). Представляется крайне интересным, что при системном введении липополисахаридов показана избирательная гибель ДА-ергических нейронов в ЧС (30–70%) по сравнению с ГАМК-ергическими и серотонинергическими нейронами мозга (Herrera et al., 2000; Qin et al., 2007), однако это требует дальнейших исследований.

6. Постадийное моделирование болезни Паркинсона

6.1. Моделирование болезни Паркинсона на доклинической и ранней клинической стадиях

подавляющее большинство существующих работ моделирует позднюю (терминальную) клиническую стадию БП, на которой пул ДА-ергических нейронов практически иссяк, а содержание ДА в стриатуме опускается значительно ниже порогового уровня (снижение более 80%). Однако с точки зрения перспективы разработки доклинической диагностики и превентивного лечения БП наибольший интерес представляют модели БП именно доклинической стадии заболевания, когда дегенерация ДА-ергических нейронов началась, но не достигла порогового значения, а следовательно отсутствуют моторные нарушения. Действительно, эти модели дают уникальную возможность изучать патогенез заболевания – молекулярные механизмы нейродегенерации и нейропластичности, на ранней стадии заболевания осуществлять поиск периферических биомаркеров как основу для создания доклинической диагностики и идентифицировать новые молекулярные мишени для фармакотерапии, в первую очередь для нейропротекции. Очевидно, нейропротекторное лечение может быть эффективно, только если оно начато на доклинической стадии, т.е. в то время, когда погибла лишь незначительная часть нейронов, а не на поздней клинической, когда большая часть нейронов уже погибла. Наряду с созданием модели доклинической стадии БП необходимо моделировать и раннюю клиническую стадию БП, характеризующуюся пороговым уровнем деградации nigrostriatalной ДА-ергической системы и первыми незначительными нарушениями моторной функции. Сравнительный анализ этих двух моделей позволит выявить молекулярные механизмы, которые играют роль триггеров нарушения моторики и могут служить новыми мишенями для фармакотерапии.

Число работ, в которых моделировали бы доклиническую или раннюю клиническую стадии БП, крайне ограничено – одни выполнены на крысах, другие – на обезьянах (Castaneda et al., 1990; Itzhak et al., 1999; Callier et al., 2001; Bezard et al., 2001; Kirchhoff et al., 2009). В большей части работ стадию заболевания идентифицировали только по одному из ключевых показателей – по моторному поведению, или по уровню ДА в стриатуме, или по количеству ДА-ергических нейронов в ЧС. Комплексной оценки по этим трем показателям, а также дополнительно по уровню ДА в ЧС и количеству терминалей аксонов ДА-ергических нейронов в стриатуме до сих пор не проводили. Как уже упоминалось (см. раздел 1), для БП существуют строго определенные пороговые значения деградации nigrostriatной ДА-ергической системы, при которой появляются моторные симптомы (ранняя клиническая стадия) – снижение: (а) количества тел ДА-ергических нейронов в ЧС на 45–55%, (б) числа терминалей аксонов в стриатуме на 60–70%, (в) уровня ДА в стриатуме на 60–70% по сравнению с контролем, принятым за 100%. Допороговый уровень деградации nigrostriatной ДА-ергической системы при отсутствии нарушений моторной функции характерен для доклинической стадии (табл. 2).

Учитывая крайне незначительное число работ, в которых были разработаны модели доклинической стадии, и практически полное отсутствие работ, в которых шло сравнение доклинической и ранней клинической стадий, в Лаборатории нервных и нейроэндокринных регуляций ИБР РАН им. Н.К. Кольцова в сотрудничестве с коллегами из Института общей патологии и патофизиологии РАМН и Института фармакологии им. Закусова РАМН были разработаны модели доклинической и ранней клинической стадий БП на мышах с использованием МФТП (Ugrumov et al., 2011, подробнее см. ниже).

Моделирование доклинических и ранней клинической стадий БП авторы статьи осуществляли на мышах линии C57/Bl6 в возрасте 2–3 месяца путем системного (подкожного) введения МФТП и через две недели проводили анализ полученного материала. В первоначальном скрининговом исследовании при однократном введении различных доз МФТП (40, 20, 16, 8 и 4 мг/кг) оценивали следующие показатели: моторное поведение, уровень ДА в ЧС и в стриатуме, количество ДА-ергических

Таблица 2

Требования к экспериментальным моделям доклинической, ранней и поздней клиническим стадиям болезни Паркинсона по состоянию дофаминергической nigrostriatной системы

Показатель \ Стадия	Досимптомная стадия	Ранняя симптомная стадия	Поздняя симптомная стадия
Количество тел нейронов в черной субстанции	↓ 40%	↓ 45–55%	↓ 60% и более
Количество аксонов в стриатуме	↓ 60%	↓ 60–80%	↓ 80% и более
Концентрация дофамина в стриатуме	↓ 60%	↓ 60–80%	↓ 80% и более

Состояние nigrostriatной системы при однократном введении различных доз
1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридина (МФТП)

МФТП, мг/кг	4		8		12		16		20		40	
Область мозга	ЧС	СТР	ЧС	СТР	ЧС	СТР	ЧС	СТР	ЧС	СТР	ЧС	СТР
Параметр	→	→	→	↓	→	↓	→	↓	↓	↓	↓	↓
Нарушение двигательной активности	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Количество нейронов/аксонов	→	→	→	↓	→	↓	→	↓	↓	↓	↓	↓
Содержание дофамина	→	→	→	↓	→	↓	→	↓	↓	↓	↓	↓

МФТП – 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридин; СТР – стриатум; ЧС, черная субстанция. Достоверные различия между контрольной и опытной группой (100%): → нет различий, ↓ уменьшение, ↑ увеличение, – нет различий, + есть различия. $p < 0,05$.

нейронов в ЧС. Нейроны идентифицировали по наличию в них тирозингидроксилазы (ТГ), скорость лимитирующего фермента синтеза ДА (табл. 3).

Введение МФТП в дозе 40 мг/кг приводило к гибели 30% животных, у выживших мышей наблюдались нарушения моторного поведения, снижение ДА в стриатуме на 80% и потеря 72% нейронов в ЧС. При использовании МФТП в дозе 20 мг/кг у животных наблюдались изменения в поведении только по самому чувствительному тесту, при этом уровень ДА в стриатуме был снижен на 69%, а в ЧС на 41%. Из вышеизложенного следует, что с помощью МФТП в дозе 20 мг/кг можно моделировать раннюю симптомную стадию паркинсонизма, а в дозе 40 мг/кг – позднюю симптомную стадию, сопровождающуюся нередко летальным исходом (Хаиндрава и др., 2010а).

При введении МФТП в дозе 16 мг/кг у животных отсутствовали нарушения моторного поведения, концентрация ДА в стриатуме снижалась на 35% – величину вдвое меньше порогового уровня, при котором появляются нарушения моторного поведения. В ЧС отсутствовали изменения содержания ДА и тел ДА-ергических нейронов (Хаиндрава и др., 2010а; Ugrumov et al., 2011).

В отличие от эксперимента с введением МФТП в дозе 16 мг/кг, при введении МФТП в дозе 8 мг/кг только у 10 животных из 30 были обнаружены изменения в nigrostriatной системе – незначительное снижение концентрации ДА в стриатуме – на 24%, при отсутствии изменений содержания ДА в ЧС. Таким образом, при дозе 8 мг/кг развиваются те же патологические процессы, что и при дозе 16 мг/кг, но выраженные в меньшей степени и не у всех животных, причем в обоих случаях отсутствуют изменения моторного поведения, т.е. воспроизводится доклиническая стадия БП (Хаиндрава и др., 2010а; Ugrumov et al., 2011).

При введении МФТП в дозе 4 мг/кг не только отсутствовали изменения моторного поведения, но также не были обнаружены какие-либо изменения в ДА-ергической нигростриатной системе по всем использованным показателям. Это означает, что МФТП в дозе 4 мг/кг не вызывает деградации даже аксонов – наиболее чувствительного к нейротоксинам отдела ДА-ергических нейронов (Хаиндрава и др., 2010а; Ugrumov et al., 2011).

Исходя из полученных результатов, для дальнейшего моделирования досимптомной стадии паркинсонизма была использована промежуточная доза из тех, что воспроизводили досимптомную стадию паркинсонизма у части (8 мг/кг) или у всех животных (16 мг/кг), т.е. доза 12 мг/кг. Было показано, что при однократном введении МФТП в дозе 12 мг/кг происходит падение уровня ДА на 45% и потеря половины ДА-ергических волокон в стриатуме (см. табл. 3). При этом в ЧС отсутствовали изменения содержания ДА и количества тел ДА-ергических нейронов. Эти данные подтверждают общие представления о том, что деградация нейрона начинается с аксонов и затем распространяется ретроградно до их тел. Таким образом, при введении МФТП в данной дозе поражается только наиболее чувствительная часть нигростриатной системы – ДА-ергические аксоны в стриатуме (Козина и др., 2010; Kozina et al., 2014). Вероятно, это обусловлено более высоким содержанием ДАТ на мембране терминалей аксонов, чем на телах ДА-ергических нейронов, с помощью которого МФТП+ проникает в нейроны (Nirenberg et al., 1996; Sundström, Samuelsson, 1997). Отсюда следует, что дегенерацию тел нейронов, малочувствительных к действию нейротоксина, вероятно, можно вызвать либо путем увеличения однократной дозы нейротоксина, либо путем пролонгирования действия токсина, вводя его многократно с небольшими интервалами в относительно небольшой дозе.

При двукратном введении МФТП в разовой дозе 12 мг/кг с 2-часовым интервалом, соизмеримым со временем полужизни МФТП в общей системе циркуляции, у животных на 15-й день после инъекций отсутствовали изменения моторного поведения, однако содержания ДА в стриатуме снизилось на 60% (табл. 4). Напротив, в ЧС уровень ДА не изменился. На этом фоне в стриатуме число терминалей ДА-ергических аксонов в стриатуме сократилось на 60%, а число тел нейронов в ЧС – на 30%. При этом наблюдается включение компенсаторных механизмов – в выживших нигростриатных нейронах значительно увеличилось содержание ДА, что является показателем увеличения его синтеза. Таким образом, данная схема введения МФТП позволяет смоделировать позднюю доклиническую стадию БП (Хаиндрава и др., 2010б; Ugrumov et al., 2011).

При четырехкратном введении (с 2-часовым интервалом) МФТП в дозе 12 мг/кг наблюдались изменения моторного поведения, причем только по двум наиболее чувствительным тестам – по длине шага и длине пробега. Снижение содержания ДА в стриатуме в этом эксперименте незначительно превысило пороговый уровень – 75%, при котором у человека при БП появляются первые моторные симптомы (Bernheimer et al., 1973). При этом число ДА-ергических волокон в стриатуме снизилось на 68%, а тел нейронов ЧС – на 43%, хотя содержание ДА в ЧС не изменилось. При пересчете на количество выживших ДА-ергических нейронов как для дозы МФТП 2×12 мг/кг, так и 4×12 мг/кг, внутринейрональное содержание ДА

Состояние nigrostriatalной дофаминергической системы при моделировании доклинической и ранней клинической стадий болезни Паркинсона

Модель БП	Доклиническая стадия				Ранняя клиническая стадия				Сравнение стадий			
МФТП, мг/кг	2 x 12				4 x 12							
Область мозга	Область мозга		Нейрон		Область мозга		Нейрон		Область мозга		Нейрон	
	ЧС	СТР	Тело	Аксон	ЧС	СТР	Тело	Аксон	ЧС	СТР	Тело	Аксон
Поведение	—				+							
Тела и аксоны нейронов	↓ 29%	↓ 59%			↓ 43%	↓ 68%			↓	↓		
Дофамин	→	↓ 56%	↑	→	→	↓ 75%	↑	↓	↔	↔	↔	↔
<i>Синтез ДА</i>												
мРНК ТГ	→		↑		↓ 50%		→		↓		↔	
Белок ТГ	↓ 45%	↓ 62%	→	↓ 28%	→	↓ 90%	↓ 29%	26%	↔	↔	↔	↔
Активность ТГ	→	↓ 47%	↑	↑	→	↓ 48%	↑	↑	↔	↔	↔	↔
<i>Выделение, обратных захват и деградация ДА</i>												
Спонтанное выделение дофамина	→	↓ 40%	→	→	→	↓ 56%	↑ 77%	→	↔	↔	↔	↔
Стимулируемое выделение дофамина	→	↑ 29%	↑ 37%	↑ 216%	→	↓ 28%	↑ 63%	↑ 125%	↔	↔	↔	↔
Обратный захват дофамина	→	↑ 5%			→	→			↔	↔		
Активность MAO A	→	→	→	↑ 138%	→	↑ 149%	↑ 116%	↑ 678%	↔	↔	↔	↔
Активность MAO B	→	↓ 33%			→	→			↔	↔		
мРНК D2 рецепторов	→	→			↓ 45%	→			↔	↔		
Внеклеточное содержание дофамина		↓ 61%				↓ 75%			↔	↔		

БП – болезнь Паркинсона; MAO – моноаминоксидаза; МФТП – 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридин; СТР – стриатум; ТГ – тирозингидроксилаза; ЧС – черная субстанция.

Достоверные различия между контрольной и опытной группой (100%): → Нет различий, ↓ уменьшение, ↑ увеличение по сравнению с контролем. ↔ нет различий между стадиями, ↓ снижение параметра на симптомной стадии по сравнению с досимптомной, ↑ увеличение параметра на симптомной стадии по сравнению с досимптомной. $p < 0,05$.

компенсаторно увеличивается более чем на 70% (Хаиндрава и др., 2010б; Ugrumov et al., 2011).

Таким образом, на мышах были смоделированы несколько стадий БП: ранняя доклиническая стадия, поздняя доклиническая стадия и ранняя симптомная стадия.

6.2. Состояние nigростриатной дофаминергической системы на моделях доклинической и ранней клинической стадий болезни Паркинсона

Как упоминалась ранее, длительное бессимптомное течение БП связано отчасти с развитием компенсаторных процессов в мозге, истощение которых можно рассматривать как триггер перехода из доклинической в клиническую стадию БП. Для поиска таких триггеров были использованы модели доклинической и ранней клинической стадии БП с дальнейшим сравнением полученных результатов.

Межклеточная концентрация ДА в стриатуме. Ключевым показателем функциональной активности nigростриатной ДА-ергической системы является межклеточная концентрация ДА в стриатуме, т.е. в той области мозга, где он обеспечивает межклеточную сигнализацию в цепочке нейронов, включенной в регуляцию моторного поведения. Действительно, межклеточное содержание ДА – это интегративный показатель, который отражает синтез нейротрансмиттера, его выделение из нейрона и обратный захват, деградацию в межклеточном пространстве. Определение межклеточной концентрации ДА и его метаболитов в стриатуме осуществляли на моделях ранней и поздней доклинической стадиях и на ранней клинической стадии БП с помощью микродиализа. На ранней досимптомной стадии у мышей (1×12 мг/кг МФТП) обнаружено уменьшение вдвое (на 54,3%) межклеточной концентрации ДА по сравнению с контролем (рис. 2). Интересно, что на этой стадии соизмеримы изменения содержания ДА в аксонах и в межклеточном пространстве в стриатуме. В отличие от ДА, концентрации L-ДОФА – предшественника синтеза ДА, а также ДОФУК и гомованилиновой кислоты (ГВК) – продуктов деградации ДА, не изменялись по сравнению с контролем (Украинцева и др., 2010; Хаиндрава и др., 2010б; Ukraintseva et al., 2010; Ugrumov et al., 2011).

На поздней досимптомной стадии (2×12 мг/кг МФТП) содержание ДА в межклеточном пространстве уменьшилось еще на 7% (в целом на 63%) по сравнению с ранней симптомной стадией (рис. 3).

На модели ранней симптомной стадии паркинсонизма (4×12 мг/кг МФТП) наблюдается уменьшение межклеточной концентрации ДА в стриатуме еще в большей степени, чем на модели досимптомной стадии – на 75% (рис. 4).

Из сопоставления полученных данных следует, что в процессе развития паркинсонизма от ранней досимптомной стадии до ранней симптомной стадии наблюдается нарастающее снижение межклеточного уровня ДА в стриатуме (рис. 5).

Полученные данные по межклеточному содержанию ДА полностью коррелируют с внутриклеточным содержанием нейротрансмиттера в аксонах стриату-

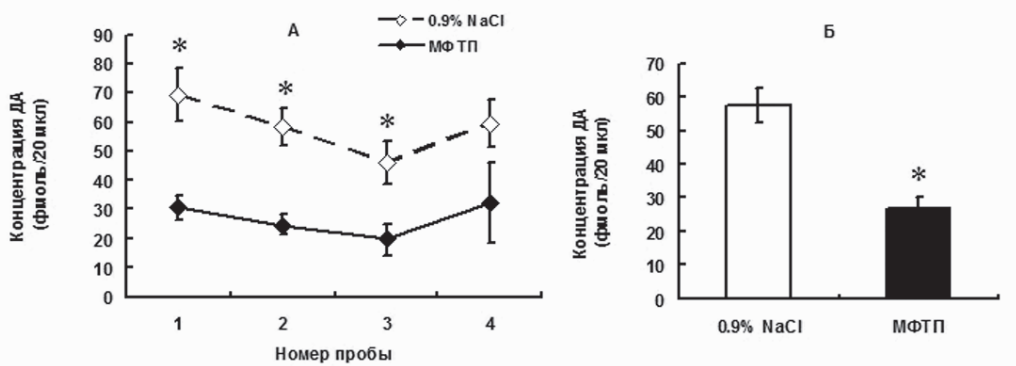


Рис. 2. Межклеточная концентрация дофамина в стриатуме мышей при моделировании ранней доклинической стадии болезни Паркинсона (однократное введение МФТП в дозе 12 мг/кг), серия последовательных проб с 20-минутным интервалом (А); усредненные величины по всем четырем пробам (Б). * $p < 0,05$

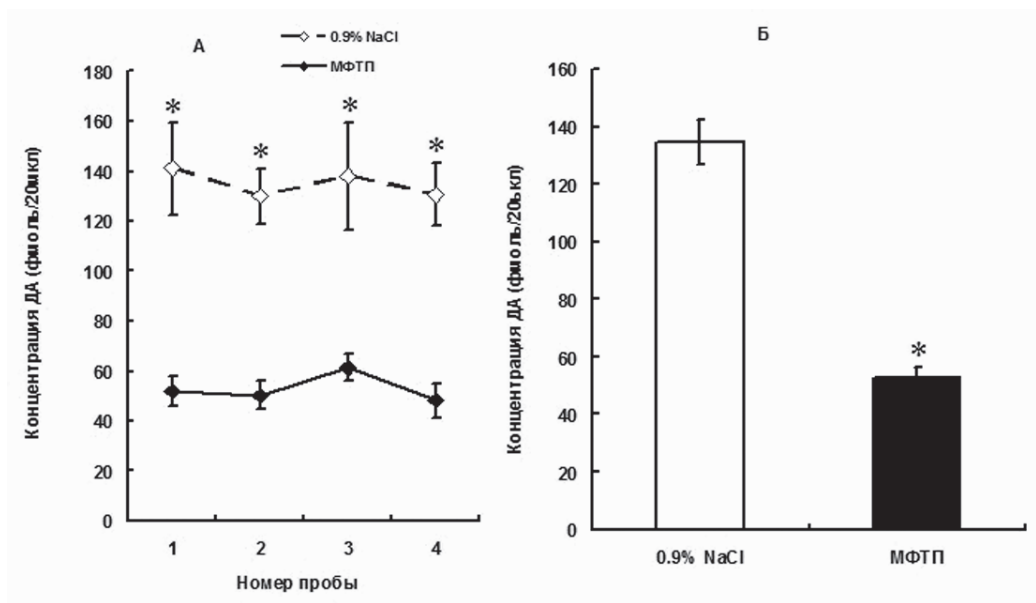


Рис. 3. Межклеточная концентрация дофамина в стриатуме мышей при моделировании поздней доклинической стадии болезни Паркинсона (двукратное введение МФТП в дозе 12 мг/кг), серия последовательных проб с 20-минутным интервалом (А); усредненные величины по всем четырем пробам (Б). * $p < 0,05$

ма (данные ВЭЖХ с ЭД) на исследуемых стадиях паркинсонизма у мышей, что подтверждает тот факт, что симптомы паркинсонизма появляются после снижения действующей (межклеточной) концентрации ДА в стриатуме более чем на 70%.

Для того чтобы определить, какие именно компенсаторные процессы поддерживают ДА выше порогового значения на досимптомной стадии и срыв каких механизмов приводит к снижению уровня этого нейротрансмиттера на симптом-

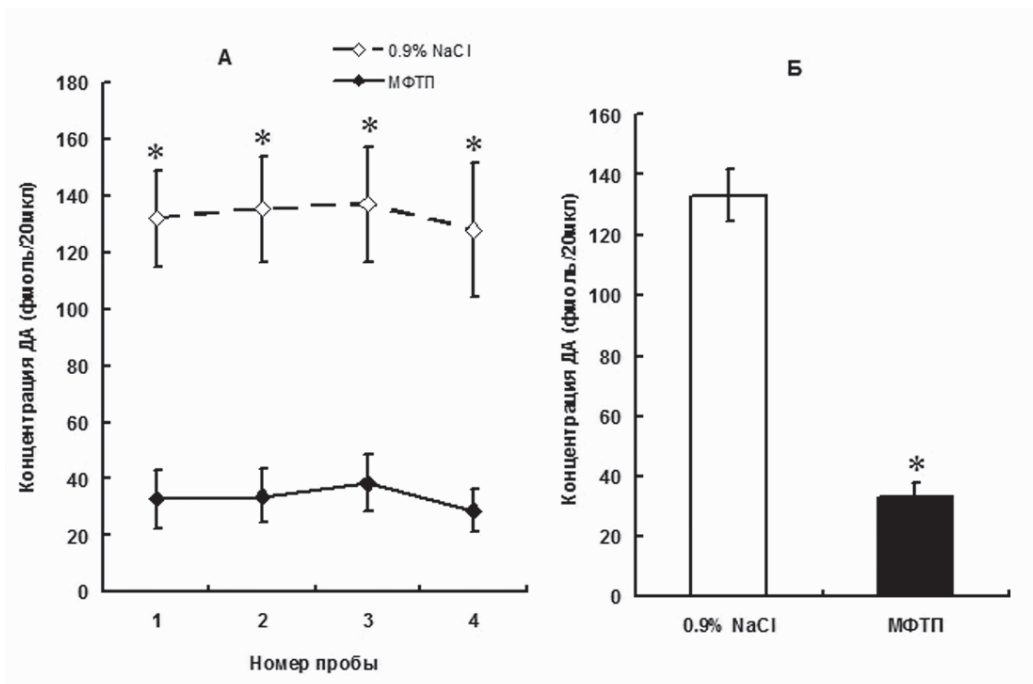


Рис. 4. Межклеточная концентрация дофамина в стриатуме мышей при моделировании ранней клинической стадии болезни Паркинсона (четырежды введение МФТП в дозе 12 мг/кг), серия последовательных проб с 20-минутным интервалом (А); усредненные величины по всем четырем пробам (Б). * $p < 0,05$

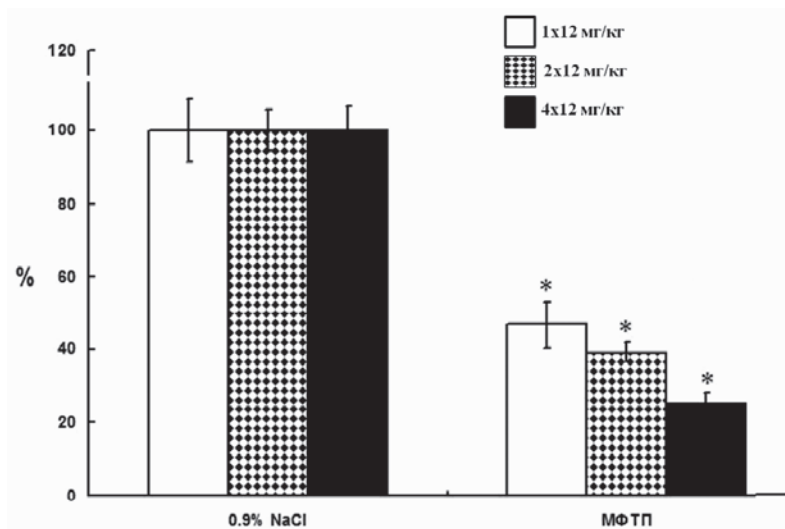


Рис. 5. Изменение межклеточной концентрации дофамина в стриатуме при моделировании на ранней и поздней доклинической, а также на ранней клинической стадиях болезни Паркинсона у мышей. * $p < 0,05$

ной, были количественно охарактеризованы следующие показатели: синтез, деградация, выделение и обратный захват ДА, а также уровень мРНК D2 рецепторов как показатель чувствительности клеток-мишеней к ДА. Учитывая то, что для каждой стадии паркинсонизма было определено количество тел и терминалей аксонов ДА-ергических нейронов, некоторые параметры, например содержание ДА, можно было пересчитать на отдельный нейрон – тело нейрона в ЧС и терминаль аксона в стриатуме.

Синтез и деградация дофамина. Уровень синтеза ДА оценивали по содержанию мРНК и белка ТГ, а также по активности фермента в телах и терминалях аксонов ДА-ергических нейронов соответственно в ЧС и стриатуме. На досимптомной стадии паркинсонизма у мышей в ЧС, несмотря на потерю почти 30% тел ДА-ергических нейронов, уровень мРНК ТГ остается прежним (см. табл. 4), что свидетельствует об увеличении экспрессии гена ТГ в отдельном нейроне. Интересным представляется тот факт, что содержание ТГ (белка) в отдельном нейроне при этом не меняется (ТГ снижено во всей области ЧС на 45%). Такое расхождение в уровне мРНК и белка ТГ свидетельствует о разбалансировке процессов транскрипции и трансляции. В телах ДА-ергических нейронов на досимптомной стадии происходит увеличение транскрипции и либо снижение трансляции, либо увеличение скорости деградации фермента. Эта закономерность была отмечена ранее при моделировании БП на крысах с помощью 6-ГДА (Blanchard et al., 1993).

На ранней симптомной стадии наблюдалась противоположная картина – при потере 43% тел ДА-ергических нейронов в ЧС содержание мРНК ТГ также было снижено на 50%, что свидетельствует о сохранении экспрессии гена ТГ в отдельных нейронах на уровне контроля (Ugrumov et al., 2011; Kozina et al., 2014). При этом содержание ТГ в ЧС не менялось, а при пересчете на отдельный ДА-ергический нейрон даже увеличилось на 29%, что свидетельствует о компенсаторном увеличении скорости трансляции ТГ в выживших нейронах на ранней симптомной стадии паркинсонизма у мышей (Kozina et al., 2014) **при неизменном уровне транскрипции мРНК ТГ.**

На поздней досимптомной и ранней симптомной стадиях паркинсонизма содержание ТГ в терминалях аксонов ДА-ергических нейронов в стриатуме снизилось в равной степени – соответственно на 28% и 26% (Kozina et al., 2014). **Сниженное содержание ТГ** в отдельных терминалях аксонов при неизменном (на досимптомной стадии) или, более того, повышенном (на ранней симптомной стадии) уровне фермента в телах нейронов может свидетельствовать либо об увеличенной деградации ТГ в аксонах, либо о нарушении антероградного аксонального транспорта, что более вероятно. Действительно, было показано, что МФП+ увеличивает скорость дәнеин-зависимого ретроградного транспорта и снижает скорость быстрого кинезин-зависимого антероградного транспорта *in vitro* на аксоне гигантского кальмара через активацию каспаз и протеинкиназы С (Forno et al., 1993; Morfini et al., 2007).

Наиболее важным показателем секреторной активности ДА-ергических нейронов является активность ТГ, которая и определяет скорость синтеза ДА. В ЧС ни на досимптомной, ни на ранней симптомной стадиях изменений активности ТГ не было обнаружено, тогда, как в отдельных выживших нейронах активность ТГ

повышена. Полученные данные хорошо согласуются с данными по уровню ДА в ЧС, который не менялся ни на одной из моделей паркинсонизма у мышей, что в совокупности свидетельствует о неизменном уровне синтеза ДА.

В стриатуме на моделях досимптомной и ранней симптомной стадий паркинсонизма у мышей произошло одинаковое снижение активности ТГ – на 47% и 48%, в то время как в отдельной терминали ДА-ергического аксона в стриатуме происходило увеличение активности этого фермента соответственно на 28% и 59% по отношению к контролю (см. табл. 4). Учитывая то, что активность ТГ отражает скорость синтеза ДА, увеличение этого параметра на фоне неизменного уровня ДА в отдельной терминали аксона на досимптомной стадии свидетельствует о возможном увеличении выделения ДА или снижении его обратного захвата. Также полученные данные могут отражать снижение активности второго фермента синтеза ДА – декарбоксилазы ароматических L-аминокислот (ДАА), что было показано при БП (Melamed et al., 1981). **По-видимому, эти процессы усугубляются на ранней симптомной стадии паркинсонизма по сравнению с досимптомной стадией.** Из приведенных данных следует, что триггером нарушения двигательной функции у мышей на симптомной стадии является не снижение скорости синтеза ДА, а увеличение его обратного захвата или снижение скорости выделения.

Учитывая то, что содержание ДА в нейронах и в межклеточном пространстве отчасти определяется активностью ферментов деградации ДА, на моделях досимптомной и ранней симптомной стадий паркинсонизма оценивали активность моноаминоксидазы (МАО) по содержанию продуктов деградации – ДОФУК и ГВК. МАО – внутриклеточный фермент, представленный у млекопитающих двумя изоформами – МАО А и МАО Б. МАО А содержится только в нейронах, в то время как МАО Б в основном в астроцитах (Saura et al., 1992; Westlund et al., 1993; Nagatsu, 2004). У грызунов ДА метаболизируется в основном МАО А, в то время как МАО Б вносит незначительный вклад в этот процесс (Butcher et al., 1990; Fornai et al., 1999). МАО А метаболизирует ДА до ДОФУК, после чего подключается второй фермент деградации ДА – катехол-О-метилтрансфераза (КОМТ), осуществляющий метилирование ДОФУК до ГВК. Также деградация ДА может происходить в обратном порядке, когда КОМТ вначале метаболизирует ДА до 3-метокситирамина, который деградирует до ГВК при участии МАО. Также был оценен интегральный показатель синтеза и деградации ДА – оборота ДА «turnover» (ДОФУК/ДА и ГВК/ДА).

Активность МАО А в ЧС не изменилась ни на досимптомной стадии паркинсонизма у мышей, ни на ранней симптомной стадии. Более того, не было обнаружено изменений в деградации ДА, определяемой по уровню ДОФУК и ГВК, а также по показателю «turnover», в ЧС ни на одной из изученных стадий (см. табл. 4) (Хакимова и др., 2014; Ugrumov et al., 2011). При этом полученные данные хорошо согласуются с данными о неизменном уровне ДА и активности ТГ в ЧС на досимптомной и ранней симптомной стадиях паркинсонизма.

В стриатуме активность МАО А на досимптомной стадии также не изменилась по сравнению с контролем, в то время как при переходе в симптомную стадию увеличилась в 2,5 раза. При пересчете на отдельные терминали ДА-ергических аксонов в стриатуме на симптомной стадии активность МАО А увеличилась на

678% относительно контроля (Хакимова и др., 2014). ГВК и ДОФУК были снижены примерно в равной степени на обеих стадиях паркинсонизма, в то время как показатель «turnover» на досимптомной стадии был увеличен на 50%, а на ранней симптомной до 250%, что хорошо согласуется с увеличенной активностью МАО А (Хакимова и др., 2014; Ugrumov et al., 2011). Таким образом, наше предположение о снижении ДА в стриатуме на ранней симптомной стадии до порогового уровня при сохранении скорости синтеза нейротрансмиттера за счет увеличения скорости его деградации подтвердилось.

Исследование активности МАО Б представляет особый интерес, т.к. именно этот фермент метаболизирует МФТП до МФП+. Изменение активности МАО Б было обнаружено только на досимптомной стадии паркинсонизма у мышей в стриатуме. Известно, что МФТП вызывает необратимое ингибирование МАО Б, как это было показано в опытах *in vitro* на митохондриях крыс (Tipton, Singler, 1993). В случае изучения компенсаторных механизмов и поиска триггеров перехода из досимптомной стадии БП в симптомную изменения всех параметров изучают на отдаленных сроках после введения МФТП, в нашей работе – через 14 дней после введения МФТП. За это время должен был пройти полный цикл обновления функциональных белков, включая МАО Б, поэтому ингибирование активности МАО Б с помощью МФТП представляется маловероятным. Такое снижение активности МАО Б можно рассматривать как компенсаторный механизм, который направлен на увеличение межклеточного содержания ДА. С другой стороны, МАО Б принимает участие в деградации не только ДА, но и других моноаминов. Изменение его активности может быть направлено на изменение метаболизма других нейротрансмиттеров, например, широко представленного в стриатуме серотонина.

Таким образом, к компенсаторным процессам можно отнести увеличенный синтез ДА, который возрастает при переходе в симптомную стадию. Триггером перехода является увеличение активности МАО А, т.е. деградации нейротрансмиттера, что приводит к снижению уровня ДА ниже порогового значения на симптомной стадии.

Выделение и обратный захват дофамина. К гипотетическим компенсаторным механизмам, которые поддерживают ДА на необходимом уровне в стриатуме, можно отнести увеличение выделения и снижение обратного захвата нейротрансмиттера, что приводит к более длительному «пребыванию» ДА в синаптической щели. С другой стороны, срыв одного из этих механизмов может приводить к снижению межклеточного содержания ДА, т.е. являться триггером перехода из досимптомной стадии в раннюю симптомную стадию паркинсонизма.

Скорость спонтанного и K^+ -стимулированного выделения ДА в ответ на калиевую деполяризацию мембраны, определяли *in vitro* путем перфузии срезов ЧС и стриатума с дальнейшей оценкой содержания ДА в перфузированной среде (см. табл. 4). Ни спонтанное, ни стимулированное выделение ДА в ЧС не изменилось ни на одной из моделей БП. В отдельных выживших ДА-ергических нейронах на досимптомной стадии спонтанное выделение также не изменялось, в то время как стимулированное выделение повысилось на 37%. На ранней симптомной стадии увеличились оба показателя – в телах нейронов на 77% спонтанное выделение ДА

и на 63% стимулированное выделение. Таким образом, при переходе из досимптомной в симптомную стадию компенсаторно возрастает спонтанное выделение ДА из тел нейронов в ЧС.

Спонтанное выделение ДА в стриатуме на досимптомной и ранней симптомной стадии паркинсонизма снижено соответственно на 40% и 56%. При оценке спонтанного выделения ДА на терминаль аксона в стриатуме не обнаружено различий между опытом и контролем, что свидетельствует об отсутствии компенсаторного увеличения этого показателя (Хакимова и др., 2010). Иная картина наблюдается при K^+ -стимулированном выделении ДА в стриатуме. На досимптомной стадии паркинсонизма происходит увеличение стимулированного выделения ДА на 29%, в то время как на ранней симптомной происходит значительное снижение – на 28% относительно контроля. При этом стимулированное выделение ДА из отдельных терминалей аксонов на досимптомной стадии увеличено на 216% по сравнению с контролем, а на симптомной стадии составляет 125%. Уменьшение этого показателя при переходе из одной стадии в другую можно рассматривать как триггер нарушения моторного поведения у животных (Хакимова и др., 2011).

Скорость обратного захвата ДА оценивали *ex vivo* путем статической инкубации срезов ЧС и стриатуме с H^3 -ДА. Скорость обратного захвата ДА в ЧС не меняется ни на одной из рассматриваемых моделей, что хорошо согласуется с неизменным уровнем выделения нейротрансмиттера (Хакимова и др., 2010). В стриатуме наблюдается небольшое, но статически достоверное увеличение захвата H^3 -ДА на досимптомной стадии, в то время как на ранней симптомной стадии изменений по сравнению с контролем нет. Следовательно, при переходе из досимптомной в симптомную стадию происходит минимальное снижение обратного захвата ДА в стриатуме, что является компенсаторным механизмом поддержания ДА в синаптической щели.

Из сопоставления данных по стимулированному выделению ДА из терминалей ДА-ергических аксонов в стриатуме на досимптомной и ранней симптомной стадиях паркинсонизма следует, что выделение ДА снижается, что может быть одной из причин перехода из одной стадии в другую. На досимптомной стадии паркинсонизма показано увеличение обратного захвата ДА в стриатуме на 5% от уровня в контроле (статистически достоверно). В то же время на симптомной стадии обратный захват снижается до контрольного уровня, что также можно рассматривать как триггер нарушения моторного поведения. Полученные данные в целом свидетельствуют о разбалансированности процессов, которые регулируют межклеточное содержание ДА в стриатуме.

Чувствительность нейронов-мишеней к дофамину в стриатуме. Было показано, что как у людей, так и при моделировании БП на мышцах снижение содержание ДА в стриатуме приводит к увеличению экспрессии мРНК D2-рецепторов и их плотности, но без изменений в аффинности к ДА (Rinne et al., 1985; Radja et al., 1993). По нашим данным, уровень мРНК D2-рецепторов в стриатуме не меняется по сравнению с контролем ни на досимптомной стадии паркинсонизма у мышей, ни на ранней симптомной, несмотря на значительное снижение ДА (75-процентное снижение на ранней симптомной стадии). Это может свидетельствовать о том, что

такого снижения ДА недостаточно для активации этого компенсаторного процесса (см. табл. 4).

Таким образом, можно заключить, что к компенсаторным механизмам, которые предотвращают появления нарушений моторного поведения на досимптомной стадии, а также направлены на компенсацию низкого уровня ДА на ранней симптомной стадии, относится увеличение скорости синтеза ДА. К триггерам перехода из досимптомной стадии в раннюю симптомную стадию паркинсонизма можно отнести: снижение выделения и увеличение обратного захвата ДА на уровне аксонов с увеличением активности МАОА, что приводит к снижению содержания ДА в ткани стриатума и в межклеточном пространстве. Отсюда можно заключить, что для возможной коррекции нарушения двигательной функции можно использовать вещества, которые повысили бы содержание ДА в стриатуме выше порогового уровня (25%) за счет увеличения скорости выделения ДА в межклеточное пространство, снижения обратного захвата нейротрансмиттера и снижения скорости дегградации ДА.

6.3. Характеристика дегенерации дофаминергических нейронов нигростриатной системы во времени на модели ранней клинической стадии болезни Паркинсона

Несмотря на то что дегенерация нигростриатных ДА-ергических нейронов является ключевым звеном патогенеза БП, существуют лишь единичные работы, в которых предпринята попытка описать этот процесс, инициируемый нейротоксинами, во времени. Так, было показано, что в ответ на системное четырехкратное введение МФТП в разовой дозе 20 мг/кг погибает до 80% ДА-ергических нейронов в ЧС. Пик дегенерации нейронов приходится на вторые сутки после введения МФТП, и к пятому дню дегенерирующие нейроны не выявляются (Sundström et al., 1988; Jackson-Lewis et al., 1995). Однако в данной работе не было проведено оценки дегенерации терминалей ДА-ергических аксонов в стриатуме, что представляется крайне важным, учитывая косвенные данные, что при БП гибель нейронов начинается с этого, в то время как такого рода исследования дают возможность не только приблизиться к пониманию молекулярных механизмов действия патогенных факторов и гибели нейронов, но и создать тест-системы для поиска потенциальных нейропротекторов.

На нашей модели ранней доклинической стадии БП была проведена ревизия существующего в литературе анализа временных характеристик дегенерации нейронов, и на основе этой модели была разработана тест-система для скрининга потенциальных лекарственных веществ. Основным показателем этой системы является динамика дегенерации ДА-ергических нейронов после введения МФТП. Учитывая то, что до сих пор отсутствуют количественные методы оценки числа дегенерирующих нейронов, нами, как и в других исследованиях, был использован комплементарный подход, т.е. произведен подсчет выживших ДА-ергических (ТГ-иммунореактивных) нейронов – тел нейронов в ЧС и терминалей аксонов в стриатуме через

3, 6, 12 и 24 часа после последней инъекции МФТП. Помимо оценки количества ДА-ергических нейронов, тел нейронов в ЧС и терминалей аксонов в стриатуме, был произведен анализ основных функциональных показателей нигростриатной системы, таких как содержание ДА и ТГ в ЧС и стриатуме (Колачева и др., 2014).

Через 3 часа после последней инъекции МФТП количество тел ДА-ергических нейронов в ЧС не изменилось по сравнению с контролем (табл. 5). Однако к 6 часам после последней инъекции МФТП произошло значительное снижение количества тел нейронов – на 32%, и далее, к 24 часам, изменений не было обнаружено. Реакция аксонов ДА-ергических нейронов в стриатуме в ответ на введение МФТП существенно отличается от реакции тел нейронов. В стриатуме через 3 часа после последней инъекции МФТП количество терминалей ДА-ергических аксонов было уже значительно снижено – на 33,5%, и к 6 часам снизилось еще на 12%. После этого, вплоть до 24 часов после последней инъекции МФТП, количество терминалей аксонов не изменилось, но тенденция к снижению сохранилась (Колачева и др., 2014). Если предположить, что скорость деградации терминалей аксонов не меняется, то этот процесс должен начинаться сразу после первой инъекции МФТП. Это хорошо согласуется с данными, полученными на мышах после однократного введения 12 мг/кг МФТП. В этом случае происходит снижение количества терминалей ДА-ергических аксонов в стриатуме на 20% (Хаиндрава и др., 2010; Ugumov et al., 2011).

Помимо динамики изменения числа терминалей аксонов и тел нейронов была также произведена оценка функционального состояния ДА-ергических нейронов по внутринейрональному содержанию белка ТГ и содержанию ДА (Колачева и др., 2014). На всех исследуемых сроках после введения МФТП (от 3 до 24 часов после последней инъекции МФТП) в телах нейронов содержание ТГ не менялось, в то время как в терминалях аксонов уже через 3 часа после последней инъекции МФТП содержание ТГ было снижено на 24% (см. табл. 5). К 6 часам происходило дальнейшее снижение содержания ТГ еще на 15%, причем по этому показателю в дальнейшем (до 12 часов) не было обнаружено изменений. При этом наблюдалось увеличение количества белка к 24 часам после последней инъекции до 82%. Сниженное содержание ТГ в терминалях аксонов, в отличие от тел нейронов, косвенно свидетельствует о нарушении аксонального транспорта, что также совпадает с данными литературы по влиянию МФТП на поляризацию микротрубочек. Более того, эти данные подтверждают представления о нарушении аксонального транспорта при БП и других нейродегенеративных заболеваниях (Cartelli, Casagrande, 2013).

Концентрация ДА в терминалях аксонов не меняется на протяжении всего периода исследования, т.е. от 3 до 24 часов после последней инъекции МФТП, и составляет примерно 20% от контроля. Такое значительное снижение концентрации ДА при уменьшении количества ТГ на 25% через 3 часа свидетельствует об уменьшении активности ТГ, как и в телах нейронов, либо об увеличении выделения ДА или уменьшении его обратного захвата, т.е. о развитии компенсаторных процессов. К 6 часам после последней инъекции МФТП и в последующие 6 часов уровень ДА в терминалях аксонов не меняется, в то время как количество ТГ в них падает по сравнению с 3 часами, что свидетельствует о дальнейшем снижении активности

Таблица 5
Состояние нигростриатной дофаминергической системы при моделировании доклинической и ранней клинической стадий болезни Паркинсона

Время после МФТП, часы	3				6				12				24			
	Область мозга		Нейрон		Область мозга		Нейрон		Область мозга		Нейрон		Область мозга		Нейрон	
	ЧС	СТР	Тело	Аксон	ЧС	СТР	Тело	Аксон	ЧС	СТР	Тело	Аксон	ЧС	СТР	Тело	Аксон
Нейрон	→	↓ 34%			33%											
Тирозин-гидроксилаза			→	↓ 24%				38%								32%
Дофамин	↓ 75%	↓ 89%	↓ 75%	↓ 84%			18%						32%		58%	

БП – болезнь Паркинсона; MAO – моноаминоксидаза; МФТП – 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридин; СТР – стриатум; ТГ – тирозингидроксилаза; ЧС – черная субстанция.

Достоверные различия между контрольной и опытной группой (100%): → нет различий, ↓ уменьшение, ↑ увеличение по сравнению с контролем, ↔ нет различий между стадиями, ↘ снижение параметра на симптомной стадии по сравнению с досимптомной, ↗ увеличение параметра на симптомной стадии по сравнению с досимптомной. $p < 0,05$.

фермента. Несмотря на увеличение содержания ТГ в терминалях аксонов до 80% к 24 часам после последней инъекции МФТП, концентрация ДА оставалась на прежнем уровне (примерно 20%), что может отражать, с одной стороны, дальнейшее снижение активности фермента синтеза ДА, а с другой стороны, увеличение скорости выделения ДА или уменьшение скорости обратного захвата.

Содержание ДА в телах нейронов в ЧС было снижено почти на 70% через 3 часа после последней инъекции МФТП, что при неизменном уровне ТГ, вероятно, свидетельствует о снижении активности фермента при воздействии МФТП (см. табл. 5) (Ara et al., 1998). В период дегенерации тел ДА-ергических нейронов в ЧС в интервале от 3 до 6 часов после последней инъекции МФТП и последующие 6 часов происходит увеличение содержания ДА при неизменных уровнях ТГ, что свидетельствует об увеличении активности ТГ.

Таким образом, учитывая быструю дегенерацию тел ДА-ергических нейронов (от 3 до 6 часов после последней инъекции МФТП) и значительно более длительную по времени дегенерацию терминалей аксонов (от первой инъекции и 6 часов после последней, т.е. 14 часов), целесообразно использовать как тест-систему для поиска потенциальных нейропротекторов именно терминали ДА-ергических аксонов в стриатуме.

7. Немоторные проявления на различных стадиях болезни Паркинсона

Известно, что основой патогенеза БП является прогрессирующая дегенерация ДА-ергических нейронов nigrostriatной системы, но лишь относительно недавно стало очевидно, что БП – полигенное и системное заболевание. Помимо дегенерации nigrostriatной системы патологический процесс захватывает и ряд других отделов мозга, а также периферическую нервную систему, что приводит к появлению ранних нарушений немоторных функций и появлению соответствующей симптоматики. Показано, что дегенерация идет в голубом пятне, ядре шва, базальном ядре Мейнерта и во многих пептидергических ядрах мозга (Jellinger, 1991; Braak et al., 2002). Учитывая эти данные, представляется крайне важным, чтобы модели БП с использованием нейротоксинов помимо нейродегенерации ДА-ергических нейронов nigrostriatной системы воспроизводили и системность заболевания.

Отсутствие системного характера повреждений нервной системы – мозга и периферической нервной системы, является существенным недостатком большинства моделей БП, включая 6-ГДА-модели. Это связано с тем, что 6-ГДА, как было отмечено ранее, не проникает через гематоэнцефалический барьер и его эффект органичен местом стереотаксического введения. В случае внутрижелудочкового введения дегенерация нейронов захватывает все катехоламинергические системы мозга с росто-каудальным распределением от точки ввода токсина. Дегенерацию же периферических катехоламинергических систем можно обнаружить только при системном введении 6-ГДА, но при этом ЦНС останется неповрежденной (Ungerstedt, 1968; Thoenen, Tranzer, 1968; Tranzer, Thoenen, 1968).

Ротенон также позволяет воспроизводить только некоторую распространенность патологического процесса, причем только в пределах мозга. Действительно, под воздействием ротенона, наряду с ДА-ергическими нейронами, погибают холинергические нейроны ядра моста, норадренергические нейроны голубого пятна и мотонейроны спинного мозга (Hirsch et al., 2003; Lapointe et al., 2004; Samantaray et al., 2007).

Для моделирования системного характера БП наиболее перспективным является использование МФТП на грызунах и обезьянах. Показано, что при введении МФТП, наряду с ДА-ергическими нейронами нигростриатной системы, дегенерируют нейроны и в других отделах мозга, а также в периферической нервной системе (Lee, Lu, 1995).

7.1. Нарушения функций мозга за пределами нигростриатной системы

По данным патологоанатомического исследования, наряду с ДА-ергическими нейронами нигростриатной системы нейродегенерации подвержены и другие нейроны в ряде других отделов мозга. К ним, например, относятся нейроны мезолимбической системы среднего мозга. В ряде отделов мозга при БП обнаружены не органические, а только метаболические изменения. Это в первую очередь относится к ДА-ергическим нейронам тубероинфундибулярной системы (ТИС) гипоталамуса (Braak, Braak, 2000; Braak et al., 2003; Ahlskog, 2004). **Тела этих нейронов локализованы** в аркуатном ядре гипоталамуса, а их аксоны проецируются в срединное возвышение. Синтезирующийся в них ДА выделяется в гипофизарную портальную систему циркуляции, достигает гипофиза с кровотоком, где ингибирует синтез пролактина. При БП было обнаружено (ПЭТ, аутопсийный материал) уменьшение содержания ДА, норадреналина и серотонина в гипоталамусе в целом, что у некоторых больных сопровождается развитием гиперпролактемии (Shannak et al., 1994; Otake et al., 1994; Langston, Forno, 1978).

Наблюдаемые на аутопсийном материале патологические изменения мозга хорошо воспроизводятся при моделировании БП с помощью МФТП. Так, наряду с дегенерацией нигростриатных ДА-ергических нейронов обнаружена дегенерация норадренергических нейронов голубого пятна, серотонинергических нейронов ядра шва, холинергических нейронов базального ядра Мейнерта (Namura et al., 1987; Friedman, Mitilineou, 1990; Pérez-Otaño et al., 1991). **Более того, на этих моделях удается воспроизвести метаболические изменения в тубероинфундибулярной ДА-ергической системе больных при БП.**

При исследовании ДА-ергических нейронов ТИС на модели доклинической стадии БП не было обнаружено ни морфологических (количество ТГ-иммунореактивных тел и терминалей аксонов), ни биохимических (содержание ДА и его метаболитов, норадреналина) изменений (табл. 6) (Дегтярева и др., 2012). На модели ранней клинической стадии БП у мышей, когда дегенерация нигростриатной системы достигает порогового уровня, морфологических изменения в ТИС также не было обнаружено, что свидетельствует об отсутствии гибели ДА-ергических

Состояние тубероинфундибулярной дофаминергической системы при моделировании доклинической и ранней клинической стадий болезни Паркинсона

Модель БП	Доклиническая стадия		Ранняя клиническая стадия	
МФТП, мг/кг	2×12		4×12	
отдел сердца параметр	<i>Аркуатное ядро</i>	<i>Срединное возвышение</i>	<i>Аркуатное ядро</i>	<i>Срединное возвышение</i>
Количество нейронов	→		→	
Количество аксонов		→		→
ОП ТГ в нейронах	→		↑ 20%	
ОП ТГ в аксонах		→		↓ 10%
Дофамин	→		↓ 50%	
Активность ТГ	→		↓ 49%	
	Кровь		Кровь	
Концентрация пролактина	→		→	

БП, болезнь Паркинсона; МФТП, 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридин; ОП, оптическая плотность; СТР, стриатум; ТГ, тирозингидроксилаза; ЧС, черная субстанция.

Достоверные различия между контрольной и опытной группой (100%): → Нет различий, ↓ уменьшение, ↑ увеличение по сравнению с контролем. $p < 0.05$.

нейронов. Однако при этом в ТИС было отмечено снижение уровня ДА на 50%, а в стриатуме еще в большей степени – на 75% (Дегтярева и др., 2012; Ugrumov et al., 2011). Такие метаболические изменения в нейронах ТИС могут быть результатом уменьшения активности ТГ как скорость-лимитирующего фермента ДА, что и было доказано экспериментально.

Разную чувствительность нейронов ТИС и нигростриатной системы к действию МФТП долгое время объясняли низким содержанием ДАТ на мембране (Lin et al., 1993; Lookingland, Moore, 2004). Однако последние исследования показали, что, несмотря на это, содержание МФП+ в нейронах ТИС выше, чем в нейронах нигростриатной системы через 4 часа после однократного введения МФТП (20 мг/кг) (Benskey et al., 2012, 2013). **Авторы исследования предполагают, что МФП+ в нейроны проникает с помощью органического транспортера катионов 3-го типа, который обладает высокой аффинностью к МФП+ (Cui et al., 2009; Gasser et al., 2009).** Это предположение основано на том, что введение GBR-12909 – ингибитора обратного захвата ДА с помощью ДАТ, до введения МФТП не предотвращает изменений в уровне этого нейротрансмиттера в ТИС, которые возникают после введения только МФТП. При предварительном введении GBR-12909 также полностью сохраняются терминалы аксонов ДА-ергических нейронов в стриатуме (Benskey et al., 2012, 2013).

Однако вопрос о значительной резистентности ДА-ергических нейронов ТИС по сравнению с нейронами nigrostriatной системы остается открытым. М. Бенскей с соавторами провели исследование функциональной активности терминалей ДА-ергических аксонов ТИС и nigrostriatной системы спустя 4, 8 и 24 часа после однократного введения МФТП. Содержание ДА в срединном возвышении, куда проецируются аксоны нейронов ТИС, снижено до 70% через 4 часа, но уже к 8 часам происходит увеличение нейротрансмиттера до 60% и продолжает увеличиваться к 24 часам. В стриатуме же снижение уровня ДА происходит на протяжении 8 часов без дальнейших изменений. Увеличение ДА в ТИС не связано с увеличением содержания ТГ, но может быть связано с повышением ее активности, что согласуется с нашими данными. Более того, было показано, что в ДА-ергических нейронах ТИС к 8 часам происходит увеличение содержания паркина и убиквитин С-терминальной гидролазы – белков, мутации в генах которых приводят к развитию БП. В nigrostriatной системе содержание этих белков не только не увеличивается, но даже в значительной степени снижается (Benskey et al., 2012, 2013). Таким образом, устойчивость ТИС к токсическому эффекту МФТП у животных и при БП у больных может быть связана с активацией компенсаторных механизмов, таких как увеличение активности убиквитин-зависимой системы протеолиза, которые, вероятно, теряют свою активность в nigrostriatной системе. Дальнейшее исследование различий в ответ на токсический эффект МФТП этих двух систем позволит найти новые потенциальные мишени для нейропротекции ДА-ергических нейронов nigrostriatной системы.

7.2. Десимпатизации сердца

7.2.1. Десимпатизация сердца на моделях поздней клинической стадии болезни Паркинсона

Системный характер БП проявляется не только в морфо-функциональных изменениях в центральной нервной системе, но и в периферической нервной системе, обеспечивающей регуляцию внутренних органов (Bouhaddi et al., 2004; Forte et al., 2004; Baba et al., 2005; Michell et al., 2005; Barbic et al., 2007; Goldstein et al., 2007a,b; Bogdanov et al., 2008; Halperin et al., 2009; Husain et al., 2009; Obeid et al., 2009; Akazawa et al., 2010; Prigione et al., 2010; Ferrer et al., 2011; Jain, Heming, 2011; Perez-Lloret et al., 2012; Dexter, Jenner, 2013). В частности, при БП наблюдаются изменения в работе и иннервации сердца (Li et al., 2002; Goldstein, 2003; Jain, Goldstein; 2012) – нарушен как симпатический, так и парасимпатический контроль сердечно-сосудистой системы (Bucerus et al., 2006; Jain, Goldstein; 2012; Goldstein, 2014; Joers, Emborg, 2014). Дегенерация периферической нервной системы при БП вызвана множеством патогенетических факторов, включая перестройку биоэнергетики митохондрий, кальциевого гомеостаза, образование токсичных форм катехолаальдегидов, накопление агрегатов α -синуклеина (телец Леви) и нейровоспаление (Goldstein et al., 2011; Hirsch et al., 2013). В периферических катехо-

ламинергических нейронах уже в начале патогенетического процесса наблюдается α -синуклеинопатия (Jain, Goldstein, 2012), что приводит к гибели нейронов. Синдром десимпатизации сердца при БП показан с помощью неинвазивной нейровизуализации (Li et al., 2002; Raffel et al., 2006; Goldstein et al., 2007a,b; Chesselet et al., 2012; Wong et al., 2012) и иммуногистохимически по наличию в миокарде маркера симпатических нервов – тирозингидроксилазы (Orimo et al., 2002; Amino et al., 2008; Fujishiro et al., 2008).

Ключевым вопросом при БП являются сроки наступления норадренергической денервации сердца, причем особенно важно выявить периферические биомаркеры доклинической стадии БП. Однако этот подход практически невозможно реализовать, исследуя пациентов с БП, т.к. они при постановке диагноза уже находятся на клинической стадии заболевания. Помочь в поиске периферических биомаркеров на досимптомной стадии паркинсонизма могут экспериментальные модели.

Для экспериментального исследования изменений в периферических органах и крови используют различные модели (генетические и нейротоксические), среди которых наиболее приближенную картину к реальным патологическим процессам, наблюдаемым у пациентов, воспроизводит МФТП-индуцированная модель (Wallace et al., 1984; Fuller et al., 1984; Algeri et al., 1987; Ambrosio et al., 1988; Luthman, Sundström, 1990; Fukumitsu et al., 2006, 2009; Goldstein et al., 2003; Cano-Jaimez, 2010). До сих пор все результаты по периферическим биомаркерам получены на моделях клинической стадии паркинсонизма.

В данном обзоре рассматриваются периферические биомаркеры паркинсонизма на нейротоксических и генетических моделях. Особый акцент сделан на выявлении биомаркеров досимптомного паркинсонизма, а также на поиске триггеров перехода от досимптомной к ранней симптомной стадии паркинсонизма.

Генетические модели. Хорошо известно, что у пациентов при БП наблюдаются мутации генов, таких как *LRRK2: R1441G, T2356I* и *G2019S*, α -синуклеина. При этом выявлена гибель норадренергических нейронов, иннервирующих сердце (Polymeropoulos et al., 1997; Singleton et al., 2004; Goldstein et al., 2007a,b; Ruiz-Martinez et al., 2011). При моделировании БП у генно-модифицированных мышей с повышенной экспрессией гена α -синуклеина выявлено накопление этого белка в желудочках и предсердиях, а также в норадренергических нейронах, иннервирующих сердце, и выявлен градиент симпатической денервации сердца и сосудов в направлении от аксонов к телам постганглионарных нейронов паравerteбральных ганглиев (Orimo et al., 2008, 2011; Marrachelli et al., 2010; Hallett et al., 2012). У этих животных отмечены изменения функциональной активности сердца – увеличение вариабельности сердечного ритма (Fleming et al., 2009), нарушение барорефлекса (Fleming et al., 2013), отсутствие тахикардии в ответ на введение атропина, что свидетельствует о нарушении и парасимпатической регуляции. Приведенные данные указывают на то, что у данных мышей нарушается как симпатическая, так и парасимпатическая регуляция сердца (Fleming et al., 2009, 2011).

Нейротоксические модели. Весьма обнадеживающие данные в отношении нарушения функций сердца были получены при моделировании БП у мышей с помощью МФТП. Показано, что на этих моделях воспроизводится норадренергическая

денервация сердца со всеми вытекающими отсюда функциональными последствиями (Fuller et al., 1984; Wallace et al., 1984; Ambrosio et al., 1988; Takatsu et al., 2000; Fukumitsu et al., 2006). Предполагается, что существует 3 механизма действия МФП⁺ на норадренергические нейроны – путем: 1) связывания с везикулярным переносчиком моноаминов, который переносит МФП⁺ в синаптические везикулы (Liu et al., 1992); 2) накопления внутри митохондрий (Ramsay, Singer, 1986); 3) накопления в цитозоле, где он взаимодействует с ферментами ксантин-оксидазой и альдегид-дегидрогеназой (Klaidman et al., 1993). Захват МФП⁺ в везикулы, очевидно, защищает нейроны от дегенерации, предотвращая его действие на митохондрии. Важность везикулярного захвата следует из наблюдения, согласно которому нейроны в ЧС под действием МФП⁺ у мышей, которые гетерогенны по содержанию везикулярного переносчика моноаминов (со сниженным количеством переносчика), в большей степени подвержены нейродегенерации, чем нейроны у мышей дикого типа (Liu et al., 1992; Takahashi et al., 1997).

Следует отметить, что МФП⁺ оказывает влияние не только на нервные, но и на мышечные клетки, в частности кардиомиоциты, на мембране которых также содержатся переносчики ДА, норадреналина (Wehrwein et al., 2008) и серотонина (Нигматуллина и др., 2010). В связи с тем, что сердце обладает высокой метаболической активностью и ограниченными возможностями для регенерации, оно очень чувствительно к оксидативному стрессу и гипоксии. Под воздействием активных форм кислорода в сердце компенсаторно происходит гипертрофический рост, который включает увеличение размеров кардиомиоцитов и нарушение их структуры (Morgan, Baker 1991; Chien et al., 1993; Sadoshima, Izumo, 1997). При этом изменение энергетического метаболизма и генерация активных форм кислорода достигают пика в течение нескольких часов после введения МФТП, тогда как нейроны погибают в течение нескольких дней (Jackson-Lewis et al., 1995).

МФТП вызывает симпатическую денервацию сердца не только у мышей (Takatsu et al., 2000; Fukumitsu et al., 2006), но и у крыс (Algeri et al., 1987) и обезьян (Goldstein et al., 2003). Дозы и схемы введения токсина варьируют. После однократного введения мышам МФТП в дозе 32 мг/кг концентрация норадреналина значительно снизилась в сердце спустя 24–48 часов, но вернулась к нормальному уровню в течение 4–7 дней (Fuller et al., 1986). При ежедневном введении крысам МФТП или МФП⁺ в дозе 20 мг/кг в течение 5 дней получили снижение концентрации норадреналина в сердце на 93,5–100% по сравнению с контрольной группой, а через 10 дней после последней инъекции МФТП/МФП⁺ уровень норадреналина в сердце частично восстановился и снижение составило только 40% (Algeri et al., 1987). Иммуногистохимический анализ через 1 неделю после двукратного введения мышам МФТП в дозе 30 мг/кг показал хорошо сохранившуюся норадренергическую иннервацию сердца, хотя методом ВЭЖХ выявлено снижение в сердце содержания норадреналина и ДА (Amino et al., 2008). У обезьян системное введение МФТП вызывало уменьшение иннервации сердца, а также снижение уровня катехоламинов в крови (Goldstein et al., 2003). Интересно отметить, что действие МФТП на катехоламинергические нейроны, иннервирующие сердце и кишечник, различается (Natale et al., 2010). Наряду с органическими обнаружены только ме-

табolicеские периферические эффекты МФТП – он не вызывает деградацию хро-маффинных клеток мозгового вещества надпочечников, хотя вызывает изменение синтеза катехоламинов в этих клетках (Edwards, Jones, 1993).

Диапазон применяемых доз МФТП при моделировании паркинсонизма весьма широк – в суммарной дозировке от 8 мг/кг (Khaindrava et al., 2011) до 300 мг/кг (Ogawa et al., 1985). Существуют единичные исследования влияния МФТП на функции сердца. Тем не менее, при моделировании симптомной стадии паркинсонизма на мышцах путем двукратного введения МФТП в дозе 30 мг/кг в течение 24 часов было показано, что нарушается работа кардиомиоцитов: на 15% снижена амплитуда сокращения, на 147% увеличен период расслабления, на 21% увеличена скорость расслабления, максимальная внутриклеточная концентрация кальция и загрузка кальция в саркоплазматический ретикулум снижены соответственно на 55% и 38% (Ren et al., 2004). В другом исследовании мышам линии C57/BL6 вводили МФТП по 25 мг/кг в течение 10 дней, суммарно 250 мг/кг, и показали, что эта дозировка нейротоксина не влияет на массу миокарда левого желудочка, частоту сердечных сокращений, длительность интервала R-R и сегмента ST электрокардиограммы (Al-Jarrah et al., 2007). Механизмы влияния МФТП на морфо-функциональные характеристики сердца на различных стадиях паркинсонизма до сих пор не изучены. Особый интерес эти исследования представляют на моделях доклинической стадии БП.

7.2.2. Десимпатизация сердца на моделях доклинической и ранней клинической стадий болезни Паркинсона

Органические и функциональные изменения в сердце. Проведенные нами исследования на мышцах на досимптомной и ранней симптомной стадиях паркинсонизма позволили выявить изменения в морфологии и функционировании различных отделов сердца (Ugrumov et al., 2011; Nigmatullina et al., 2013). На досимптомной стадии увеличивается масса правого и левого желудочков соответственно на 23% и 15% (табл. 7). В этих же отделах сердца происходит увеличение площади кардиомиоцитов на 34% и 21%. На ранней симптомной стадии, несмотря на увеличение массы всех отделов сердца, площадь кардиомиоцитов снижается. Это противоречие можно объяснить существенным разрастанием соединительной фиброзной ткани. Действительно, на досимптомной стадии в миокарде желудочков наблюдается развитие фиброзной ткани диффузного характера, более выраженное в правом желудочке, которое на ранней симптомной стадии сменяется выраженным фиброзом обоих желудочков.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что на досимптомной стадии паркинсонизма происходит гипертрофия миокарда желудочков и межжелудочковой перегородки за счет увеличения размера кардиомиоцитов – продольного и поперечного диаметра, и выраженности фиброза. Вероятно, наблюдаемые изменения в морфологии различных отделов сердца вызваны увеличением систолического

Изменение морфо-функциональных показателей сердца при моделировании доклинической и ранней клинической стадий болезни Паркинсона

Модель БП	Доклиническая стадия				Ранняя клиническая стадия			
МФТП, мг/кг	2 x 12				4 x 12			
Отдел сердца	<i>Правый желудочек</i>	<i>Левый желудочек</i>	<i>Правое предсердие</i>	<i>Левое предсердие</i>	<i>Правый желудочек</i>	<i>Левый желудочек</i>	<i>Правое предсердие</i>	<i>Левое предсердие</i>
Параметр								
Масса миокарда	↑ 23%	↑ 15%	→	→	↑ 38%	→	→	↑ 57%
Площадь миокарда	↑ 34%	↑ 21%	→	→	↓ 25%	→	→	→
Сила сокращения	↑ 45%	36%	→	→	↓ 75%	↓ 50%	→	→
Длительность сокращения	↑ 16%	17%	→	↓ 34%	↓ 15%	→	→	→

БП – болезнь Паркинсона; МФТП – 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридин.

Достоверные различия между контрольной и опытной группой (100%): → нет различий, ↓ уменьшение, ↑ увеличение по сравнению с контролем. $p < 0,05$.

давления крови в малом круге кровообращения и компенсаторной гипертрофией миокарда.

Хорошо известно, что при гипертрофии миокарда у человека наблюдаются нарушения систолы (сокращение) и диастолы (расслабление) сердца. Похожие изменения отмечены и у мышей на досимптомной стадии паркинсонизма – сила сокращений левого желудочка снижена на 36%, а правого – на 45% (см. табл. 7). Следовательно, уже на досимптомной стадии паркинсонизма происходят изменения амплитудно-временных параметров сокращения. Сила сокращения различных отделов сердца, сниженная на досимптомной стадии, в еще большей мере снижается на ранней симптомной стадии. Однако временные параметры сокращения – длительность сокращения, длительность расслабления и общая длительность сокращения, существенно уменьшаются на досимптомной стадии и по мере прогрессирования паркинсонизма не изменяются.

Гипертрофия миокарда желудочков мышей при паркинсонизме, выявленная нами при гистологическом исследовании, отчетливо проявляется в функционировании сердца. Так, у мышей на ранней симптомной стадии паркинсонизма ударный объем крови выше по сравнению с контролем. Увеличение частоты сердечных сокращений, ударного и минутного объемов крови у мышей на ранней симптомной стадии паркинсонизма может быть вызвано повышенной чувствительностью десимпатизированного сердца к циркулирующим катехоламинам. На ранней симптомной стадии выявлены существенные изменения в фазовой структуре сердечного цикла, т.е. на быстрое изгнание крови затрачивается 36%, а на медленное изгнание 64% времени от периода изгнания крови, что отличается от контрольных показателей, составляющих соответственно 33% и 67% (Nigmatullina et al., 2013). Следует отметить, что в фазу быстрого изгнания крови из желудочков сердца в системный кровоток поступает максимальное количество крови.

Норадренергическая денервация сердца и ее проявления. Имеются единичные данные о том, что у пациентов на доклинической стадии БП наблюдается десимпатизация сердца (Goldstein, 2003). Поэтому важно было оценить, наблюдаются ли подобные изменения у мышей при паркинсонизме на досимптомной стадии. В наших исследованиях на экспериментальных моделях досимптомного и раннего симптомного паркинсонизма, создаваемых введением МФТП, также выявлена десимпатизация сердца (Nigmatullina et al., 2013). Согласно литературным данным, МФТП/МФП⁺ интоксикация происходит за счет захвата нейротоксина в норадренергические нейроны переносчиком норадреналина. Действительно, у мышей, крыс и обезьян МФТП/МФП⁺ вызывают деградацию терминалей аксонов периферических норадренергических нейронов, о чем свидетельствует уменьшение накопления радиолиганда ¹²³I-MIBG – маркера обратного захвата норадреналина (Wallace et al., 1984; Fuller et al., 1984, 1988; Luthman, Jonsson, 1986; Fuller, Hemrick-Luecke, 1986; Algeri et al., 1987; Ambrosio et al., 1988; Luthman, Sundström, 1990; Fukumitsu et al., 2006). Более того, показано, что под воздействием МФП⁺ норадренергические нейроны в культуре погибают по пути апоптоза, о чем свидетельствует увеличение числа апоптотических ядер и наличие активированной каспазы-3 (Cano-Jaimez, 2010).

Известно, что концентрация норадреналина, которая коррелирует с норадренергической иннервацией сердца, у лабораторных мышей самая большая в правом и левом предсердиях, меньше в правом желудочке и самая низкая в левом желудочке (Umamoto, 1984). Снижение норадренергической иннервации сердца может сопровождаться уменьшением концентрации норадреналина в различных отделах сердца и повышением реакции на норадреналин (Родионов, 1988). В наших исследованиях показано, что сила сокращения миокарда правого предсердия животных в ответ на норадреналин на досимптомной стадии паркинсонизма увеличивается в 3–5 раз по сравнению с контролем (табл. 8). В левом предсердии максимальная

Таблица 8

Реакция силы сокращения сердца на норадреналин у мышей при моделировании доклинической и ранней клинической стадий болезни Паркинсона

Модель БП	Доклиническая стадия				Ранняя клиническая стадия			
МФТП, мг/кг	2 × 12				4 × 12			
Отдел сердца	Правый желудочек	Левый желудочек	Правое предсердие	Левое предсердие	Правый желудочек	Левый желудочек	Правое предсердие	Левое предсердие
Норадреналин, мМ								
0,1	↑ 91%	↑ 670%	↑ 310%	→	↓ 43%	→	↓ 71%	→
1,0	↑ 116%	1315%	↑ 308%	↑ 230%	↓ 90%	→	↓ 80%	↑ 59%
10,0	↑ 107%	↑ 1366%	↑ 515%	↑ 210%	→	↓ 60%	↓ 69%	→

БП – болезнь Паркинсона; МФТП – 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридин.

Достоверные различия между контрольной и опытной группой (100%): → нет различий, ↓ уменьшение, ↑ увеличение по сравнению с контролем. p < 0,05.

положительная реакция силы сокращения на 230% больше, чем в контроле, а в правом желудочке – на 116%. У мышей на досимптомной и ранней симптомной стадии паркинсонизма происходит значительное увеличение силы сокращения в ответ на норадреналин. Вероятно, на данной стадии паркинсонизма для поддержания сократительной функции миокарда существенно повышается чувствительность регуляторного белка тропонина С к ионам кальция. Однако это предположение требует экспериментального подтверждения.

Следует отметить, что на ранней симптомной стадии паркинсонизма по сравнению с досимптомной стадией наблюдается снижение положительной инотропной реакции на норадреналин практически во всех отделах сердца. Это может свидетельствовать о том, что несмотря на наличие гипертрофии миокарда наступает срыв компенсации, и чувствительность к норадреналину существенно снижается. Следовательно, существенная перестройка морфологии и функций сердца, а также изменение чувствительности к норадреналину происходят уже на досимптомной стадии паркинсонизма. Вероятно, сердце по сравнению с другими органами отличается повышенной чувствительностью к воздействию МФТП. В пользу этого свидетельствуют результаты о том, что на модели ранней симптомной стадии паркинсонизма, вызванной однократным введением МФТП в дозе 30 мг/кг, наибольшая концентрация токсина – МФТП⁺, была выявлена в сердце, меньшая – в печени и легких, и незначительная в почках и мозге (Fuller et al., 1989). МФТП⁺ быстрее всего выводится из мозга, сердца и печени, менее быстро из легких и почек. Несмотря на то что в сердце самая высокая концентрация МФТП⁺/МФТП, окислительная способность данного органа, измеренная *in vitro*, была гораздо меньше, чем в печени. Предположение о том, что высокая концентрация МФТП⁺ в сердце обусловлена его накоплением в норадренергических нейронах, было проверено на крысах, которым предварительно вводили 6-гидроксидофамин для разрушения норадренергических нейронов или EXP561 для ингибирования его захвата в норадренергические терминалы. Ни одно из указанных воздействий не изменяло уровень МФТП⁺ в сердце или других органах и не влияло на скорость его выведения из сердца. Высокая концентрации МФТП⁺ в сердце, очевидно, не является результатом его накопления в норадренергических нейронах. Вероятно, накопление происходит в других клетках сердца (Fuller et al., 1989) и вполне возможно, что местом накопления МФТП⁺ могут являться кардиомиоциты или фибробласты. Однако механизм влияния МФТП на кардиомиоциты и фибробласты до сих пор неизвестен.

В нашем исследовании показано, что на досимптомной стадии паркинсонизма концентрация норадреналина в желудочках снижается на 14%–21%, но снижение в правом предсердии более выражено (на 29%) (табл. 9). На ранней симптомной стадии концентрация норадреналина в большей мере снижена в левом предсердии (на 34%) и в правом желудочке (на 31%). В миокарде правого предсердия наблюдается увеличение концентрации норадреналина до нормы, что может быть вызвано снижением активности ферментов деградации норадреналина или повышением активности ферментов его синтеза.

На досимптомной стадии паркинсонизма происходит повышение концентрации адреналина в левом предсердии, правом и левом желудочке (см. табл. 9). Ве-

Концентрация катехоламинов в различных отделах сердца мышей при моделировании доклинической и ранней клинической стадий болезни Паркинсона (Нигматуллина и др., неопубликованные данные)

Модель БП	Доклиническая стадия				Ранняя клиническая стадия			
МФТП, мг/кг	2 × 12				4 × 12			
Отдел сердца Концентрация	Правый желу- дочек	Левый желу- дочек	Правое пред- сердие	Левое пред- сердие	Правый желу- дочек	Левый желу- дочек	Правое пред- сердие	Левое пред- сердие
Норадреналин	→	→	↓ 29%	→	↓ 31%	↓ 7%	→	↓ 34%
Адреналин	↑ 11%	↑ 4%	→	↑ 3%	↓ 25%	→	→	↓ 34%
Дофамин	↓ 28%	→	→	→	↑ 38%	→	→	↓ 25%

БП – болезнь Паркинсона; МФТП – 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридин.

Достоверные различия между контрольной и опытной группой (100%): → Нет различий, ↓ уменьшение, ↑ увеличение по сравнению с контролем. $p < 0,05$.

роотно, местом его синтеза являются адренергические нейроны интрамуральных ганглиев, так называемые СИФ-клетки (слабая интенсивность флуоресценции). Возможно, изменение синтеза адреналина в СИФ-клетках может быть компенсаторной реакцией на гибель постганглионарных норадренергических нейронов, с чем и может быть связано снижение концентрации норадреналина. ДА является предшественником синтеза норадреналина, и его концентрация снижается в желудочках и несколько повышается в предсердиях на досимптомной стадии паркинсонизма. Вероятно, активность ферментов синтеза как норадреналина, так и ДА в желудочках снижается уже на досимптомной стадии паркинсонизма. Об этом может косвенно свидетельствовать снижение на 12–24% концентрации ДОФУК – продукта ферментативной деградации дофамина.

7.3. Изменение метаболизма в надпочечниках и содержания в крови катехоламинов

Как известно, симпатическая нервная система принимает участие в регуляции надпочечников – основного источника катехоламинов в периферической крови. При фармакологической десимпатизации наблюдается компенсаторная гипертрофия надпочечников (Родионов, 1988). На досимптомной стадии паркинсонизма нами выявлено незначительное снижение содержания норадреналина и адреналина в надпочечниках, а на ранней симптомной стадии в надпочечниках происходит значительное компенсаторное увеличение концентрации всех катехоламинов (табл. 10).

Изменения содержания катехоламинов в надпочечниках в значительной степени коррелирует с изменением их содержания в плазме крови. Так, на досимптомной стадии концентрация всех катехоламинов в крови незначительно снижается, а на ранней симптомной стадии значительно повышается. Эти данные позволяют

Концентрация катехоламинов в плазме крови и надпочечниках у мышей при моделировании доклинической и ранней клинической стадий болезни Паркинсона

Модель БП	Доклиническая стадия		Ранняя клиническая стадия	
МФТП, мг/кг	2 × 12		4 × 12	
Отдел	Плазма крови	Надпочечники	Плазма крови	Надпочечники
Концентрация				
Норадреналин	→	↓ 18%	↑ 46%	↑ 82%
Адреналин	→	→	↑ 44%	↑ 67%
Дофамин	↓ 28%	→	↑ 229%	↑ 51%

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

Достоверные различия между контрольной и опытной группой (100%): → нет различий, ↓ уменьшение, ↑ увеличение по сравнению с контролем. $p < 0,05$.

предположить, что основным, хотя и не единственным, источником катехоламинов в крови являются надпочечники.

Таким образом, на основании проведенных нами исследований и литературных данных дегенерация норадренергических нейронов, иннервирующих сердце, является одним из системных проявлений патогенеза БП. Большинство работ, направленных на изучение патологии сердечно-сосудистой системы при БП, были выполнены на пациентах и крайне редко на экспериментальных моделях. Однако, учитывая раннее проявление нарушений регуляции и функционирования сердечно-сосудистой системы при БП, исследования на экспериментальных моделях представляют особую ценность. Разработанные нами на мышах с помощью МФТП модели доклинической и ранней клинической стадий БП хорошо воспроизводят изменения сердечно-сосудистой системы и ее регуляции, наблюдаемые у пациентов при БП. К периферическим биомаркерам можно отнести снижение сократимости миокарда и повышение его чувствительности к норадреналину, что свидетельствует о десимпатизации сердца уже на досимптомной стадии паркинсонизма. В качестве дифференциальной диагностики досимптомного и симптомного паркинсонизма можно предложить определение концентрации норадреналина, адреналина и ДА в крови, которые снижаются на досимптомной и существенно увеличиваются на ранней симптомной стадии. Следовательно, модели досимптомного и раннего симптомного паркинсонизма (Ugrumov et al., 2011) адекватно воспроизводят изменение в периферических органах и системах, к которым относится сердечно-сосудистая система и кровь.

8. Заключение

Клеточные и молекулярные механизмы патогенеза БП активно изучаются в последние два десятилетия. Особое значение имеют результаты клинических исследований, проведенных с помощью неинвазивных нейровизуализационных методов и патоанатомических исследований, выполненных на аутопсийном материале, полученном в терминальной фазе клинической стадии (Угрюмов, 2010; Betarbet et al.,

2000b; Bezard et al., 2001; Palfi et al., 2002; Sandmann-Keil, Braak, 2005; Ugrumov, 2008). На основе данных клинических исследований создано два типа экспериментальных моделей БП: токсические и генетические, которые имитируют комплементарные механизмы патогенеза. Генетические модели воспроизводят протеинопатии и агрегацию патологических белков, а токсические модели – избирательную гибель ДА-ергических нейронов nigростриатной системы. Наиболее широко используются модели на основе применения нейротоксинов, специфических для ДА-ергических нейронов, 6-ГДА и МФТП. В подавляющем большинстве работ моделирование БП затрагивает только терминальную фазу симптомной стадии, когда подавляющее большинство ДА-ергических нейронов уже погибло и лечение крайне неэффективно (Tranzer, Thoenen, 1968; Ungerstedt, 1968; Gerlach, Riederer, 1996). Исследования, проведенные на таких моделях, позволили идентифицировать два типа качественно различающихся и включающихся последовательно компенсаторных процессов, которые направлены на поддержание межклеточной концентрации ДА и на повышение чувствительности клеток-мишеней к ДА. Однако до последнего времени остается неясной динамика и молекулярные механизмы дегенерации ДА-ергических нейронов и включающихся при этом компенсаторных процессов на ранних этапах заболевания (доклиническая стадия) – до появления нарушений двигательной функции. Более того, отсутствует информация о том, какие именно компенсаторные процессы включаются на доклинической стадии БП, и приводит ли именно их «истощение» к нарушению двигательной функции. На эти вопросы в настоящее время невозможно ответить, используя клинический материал, т.к. до сих пор невозможно выявить больных на доклинической стадии. Приблизиться к пониманию механизмов начальных этапов развития БП пока можно, только используя экспериментальные модели доклинической и ранней клинической стадий БП, которые недавно были разработаны авторами статьи. Эти модели сейчас широко используются для выяснения клеточно-молекулярных механизмов нейродегенерации, пластичности nigростриатной системы мозга и поиска триггеров нарушения моторной функции, т.е. клеточно-молекулярных механизмов, ответственных за переход из доклинической стадии в клиническую. Более того, они воспроизводят не только локальную дегенерацию nigростриатных ДА-ергических нейронов, но и системные патологические изменения в нервной системе и как следствие – в функциональной активности внутренних органов и в составе физиологически активных веществ в крови. Эти исследования позволяют идентифицировать относительно специфичные периферические легкодоступные для анализа биомаркеры, на основе которых предполагается создать комплексную диагностику БП на доклинической стадии. Такой подход имеет большое значение и при поиске новых молекулярных мишеней для медикаментозной терапии, основанной на замедлении дегенерации нейронов и регуляции компенсаторных процессов с учетом их специфики на каждой стадии заболевания. Особый интерес представляет поиск молекулярных механизмов – триггеров нарушения моторного поведения, которые также могут служить мишенями для фармакотерапии нового поколения. Создание доклинической диагностики и превентивной нейропротекторной терапии, направленной на остановку или замедление нейродегенерации, позволит продлить неограниченно долго

(до смерти по другой причине) доклиническую стадию заболевания и период комфортной жизни потенциального больного.

Литература

- Дегтярева Е.А., Пронина Т.С., Угрюмов М.В. Состояние тубероинфундибулярной дофаминергической системы при моделировании паркинсонизма у мышей // *Нейрохимия*. 2012. Т. 29. № 4. С. 311-317.
- Дильмухаметова Л.К., Пронина Т.С., Зиязетдинова Г.З. и др. Роль норадреналина в развитии дофамин-зависимой гиперпролактинемии // *Нейрохимия*. 2009. Т. 26. № 4. С. 318-327.
- Козина Е.А., Хаиндрава В.Г., Кудрин В.С. и др. Экспериментальное моделирование функциональной недостаточности nigrostriатной дофаминергической системы у мышей // *Рос. физиол. журнал*. 2010. Т. 96. № 3. С. 270-282.
- Колачева А.А., Козина Е.А., Волина Е.В., Угрюмов М.В. Дегенерация nigrostriатных дофаминергических нейронов на экспериментальной модели ранней клинической стадии болезни Паркинсона // *Нейрохимия*. 2014. Т. 31. № 3. С. 225-235.
- Крыжановский Г.Н., Атаджанов М.А., Магаева С.В. и др. Изменения ЭЭГ и явления паркинсонизма при интракаудатном введении антител к дофамину // *Бюлл. exper. биол. и мед.* 1989. № 1. С. 13-16.
- Крыжановский Г.Н., Евсеев В.А., Магаева С.В. и др. Антитела к дофамину в патогенезе паркинсонизма // *Бюлл. exper. биол. и мед.* 1991. № 1. С. 16-19.
- Крыжановский Г.Н., Атаджанов М.А., Воронина Т.А., Неробкова Л.Н. Особенности паркинсонического синдрома, вызванного в эксперименте дефицитом nigrostriатного дофамина и стимуляцией холинергических нейронов хвостатых ядер // *Журн. неврол. и псих. им. С.А. Корсакова*. 1993. № 6. С. 3-6.
- Крыжановский Г.Н., Магаева С.В., Макаров С.В. *Нейроиммунопатология*. М.: НИИ общей патологии и патофизиологии РАМН, 1997. 284 с.
- Крыжановский Г.Н., Карабань И.Н., Магаева С.В. и др. *Болезнь Паркинсона: Этиология, патогенез, клиника, лечение, профилактика*. М.: Медицина, 2002. 336 с.
- Кучеряну В.Г., Крыжановский Г.Н. Влияние глутамата и антагонистов N-метил-D-аспартатрецепторов на экспериментальный паркинсонический синдром у крыс // *Бюлл. exper. биол. и мед.* 2000. Т. 130. С. 20-23.
- Нигматуллина Р.Р., Кириллова В.В., Абдульянов В.А. и др. Экспрессия 5-HT_{2в}-рецепторов в миокарде правого предсердия и концентрация серотонина в крови у больных с хронической сердечной недостаточностью // *Вестник межрегионального клинико-диагностического центра*. 2010. № 1. С. 21-27.
- Родионов И.М. *Иммунологическая и химическая десимпатизация*. М.: Наука, 1988. 149 с.
- Угрюмов М.В. Экспрессия ферментов синтеза дофамина в недофаминергических нейронах: функциональное значение и регуляция // *Успехи физиол. наук*. 2007. Т. 38, № 4. С. 3-20.
- Угрюмов М.В. Новые представления о патогенезе, диагностике и лечении нейродегенеративных заболеваниях // *Вестник РАМН*. 2010. № 8. С. 6-19.
- Украинцева Ю.С., Щеголевский Н.В., Кориунов В.А. и др. Моделирование досимптомной стадии паркинсонизма у мышей – анализ выделения дофамина в стриатуме // *Нейрохимия*. 2010. Т. 27. № 2. С. 164-169.
- Хаиндрава В.Г., Козина Е.А., Кучеряну В.Г. и др. Моделирование доклинической и ранней клинической стадий болезни Паркинсона // *Журн. неврол. и псих. им. С.С. Корсакова*. 2010а. № 7. С. 41-47.
- Хаиндрава В.Г., Кудрин В.С., Кучеряну В.Г. и др. Экспериментальное моделирование клинической и преклинической стадий болезни Паркинсона // *Бюлл. exper. биол. и мед.* 2010б. Т. 150. № 11. С. 494-498.
- Хакимова Г.Р., Козина Е.А., Сапронова А.Я., Угрюмов М.В. Обратный захват дофамина в черной субстанции и стриатуме на досимптомной и ранней симптомной стадиях паркинсонизма у мышей // *Докл. РАН*. 2010. Т. 435. № 2. С. 272-274.

- Хакимова Г.Р., Козина Е.А., Сапронова А.Я., Угрюмов М.В. Выделение дофамина в черной субстанции и стриатуме на досимптомной и ранней симптомной стадиях паркинсонизма у мышей // *Нейрохимия*. 2011. Т. 28. № 1. С. 42-48.
- Хакимова Г.Р., Козина Е.А., Бунеева О.А. и др. М.В. Активность моноаминоксидазы в нигростриатной системе на досимптомной и ранней симптомной стадиях паркинсонизма у мышей // *Бюл. экспер. биол. и мед.* 2014 (в печати).
- Abercrombie E.D., Keefe K.A., Stricker E.M. et al. Environmental stress increases extracellular dopamine in striatum of 6-hydroxydopamine-treated rats: in vivo microdialysis studies // *Brain Res.* 1990. Vol. 527. № 2. P. 350-353.
- Abou-Sleiman P.M., Healy D.G., Wood N.W. Causes of Parkinson's disease: Genetics of DJ-1 // *Cell Tissue Res.* 2004. Vol. 318. № 1. P. 185-188.
- Agid Y. Parkinson's disease: pathophysiology // *Lancet*. 1991. Vol. 337. P. 1321-1324.
- Ahlskog J.E. Challenging conventional wisdom: the etiologic role of dopamine oxidative stress in Parkinson's disease // *Mov. Disord.* 2004. Vol. 20. P. 271-282.
- Akazawa Y.O., Saito Y., Hamakubo T. et al. Elevation of oxidized DJ-1 in the brain and erythrocytes of Parkinson disease model animals // *Neurosci. Lett.* 2010. Vol. 483. P. 45-205.
- Albrecht M. LRRK2 mutations and Parkinsonism // *Lancet*. 2005. Vol. 365. № 9466. P. 1230.
- Algeri S., Ambrosio S., Garofalo P. et al. Peripheral effects of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) and its main metabolite 1-methyl-4-phenylpyridinium ion (MPP+) in the rat // *Eur. J. Pharmacol.* 1987. Vol. 141. P. 309-312.
- Al-Jarrah M., Pothakos K., Novikova L. et al. Endurance exercise promotes cardiorespiratory rehabilitation without neurorestoration in the chronic mouse model of parkinsonism with severe neurodegeneration // *Neurosci.* 2007. Vol. 149. P. 28-37.
- Alvarez-Fischer D., Guerreiro S., Hunot S. et al. Modelling Parkinson-like neurodegeneration via osmotic minipump delivery of MPTP and probenecid // *J. Neurochem.* 2008. Vol. 107. N 3. P. 701-711.
- Ambrosio S., Blesa R., Mintenig G.M. et al. Acute effects of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) on catecholamines in heart, adrenal gland, retina and caudate nucleus of the cat // *Toxicol. Lett.* 1988. Vol. 44. P. 1-6.
- Amino T., Uchihara T., Tsunekawa H. et al. Myocardial nerve fibers are preserved in MPTP-treated mice, despite cardiac sympathetic dysfunction // *Neurosci. Res.* 2008. Vol. 60. P. 314-318.
- Andres-Mateos E., Mejias R., Sasaki M. et al. Unexpected lack of hypersensitivity in LRRK2 knock-out mice to MPTP (1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine) // *J. Neurosci.* 2009. Vol. 29. № 50. P. 15846-15850.
- Ara J., Przedborski S., Naini A.B. et al. Inactivation of tyrosine hydroxylase by nitration following exposure to peroxynitrite and 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) // *J. Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1998. Vol. 95. P. 7659-7663.
- Arai N., Misugi K., Goshima Y., Mitsu Y. Evaluation of a 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)-treated C57 black mouse model for parkinsonism // *Brain Res.* 1990. Vol. 515. № 1. P. 57-63.
- Arima K., Hirai S., Sunohara N. et al. Cellular co-localization of phosphorylated tau- and NACP/alpha-synuclein-epitopes in lewy bodies in sporadic Parkinson's disease and in dementia with Lewy bodies // *Brain Res.* 1999. Vol. 843. № 1-2. P. 53-61.
- Baba M., Nakajo S., Tu P.H. et al. Aggregation of alpha-synuclein in Lewy bodies of sporadic Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies // *Am. J. Pathol.* 1998. Vol. 152. № 4. P. 879-884.
- Baba Y., Kuroiwa A., Uittic R.J. et al. Alterations of T-lymphocyte populations in Parkinson disease // *Parkinsonism and Related Disorders.* 2005. Vol. 11. P. 493-498.
- Bandopadhyay R., Kingsbury A.E., Cookson M.R. et al. The expression of DJ-1 (PARK7) in normal human CNS and idiopathic Parkinson's disease // *Brain.* 2004. Vol. 127. P. 420-430.
- Bankiewicz K.S., Oldfield E.H., Chiueh C.C. et al. Hemiparkinsonism in monkeys after unilateral internal carotid artery infusion of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) // *Life Sci.* 1986. Vol. 39. № 1. P. 7-16.
- Barbic F., Perego F., Canesi M. et al. Early abnormalities of vascular and cardiac autonomic control in Parkinson's disease without orthostatic hypotension // *Hypertension.* 2007. Vol. 49. P. 120-126.

- Behrouz B., Drolet R.E., Sayed Z.A. et al.* Unique responses to mitochondrial complex I inhibition in tuberoinfundibular dopamine neurons may impart resistance to toxic insult // *Neurosci.* 2007. Vol. 47. № 3. P. 592-598.
- Benskey M., Behrouz B., Sunryd J. et al.* Recovery of hypothalamic tuberoinfundibular dopamine neurons from acute toxicant exposure is dependent upon protein synthesis and associated with an increase in parkin and ubiquitin carboxy-terminal hydrolase-L1 expression // *Neurotoxicology.* 2012. Vol. 33. № 3. P. 321-331.
- Benskey M., Lee K.Y., Parikh K. et al.* Sustained resistance to acute MPTP toxicity by hypothalamic dopamine neurons following chronic neurotoxicant exposure is associated with sustained up-regulation of parkin protein // *Neurotoxicology.* 2013. Vol. 37. P. 144-153.
- Bergstrom B.P., Garriss P.A.* «Passive stabilization» of striatal extracellular dopamine across the lesion spectrum encompassing the presymptomatic phase of Parkinson's disease: a voltammetric study in the 6-OHDA-lesioned rat // *J. Neurochem.* 2003. Vol. 87. T. 5. P. 1224-1236.
- Bernheimer H., Birkmayer W., Hornykiewicz O. et al.* Brain dopamine and the syndromes of Parkinson and Huntington. Clinical, morphological and neurochemical correlations // *J. Neurol. Sci.* 1973. Vol. 20. № 4. P. 415-455.
- Betarbet R., Porter R.H., Greenamyre J.T.* GluR1 glutamate receptor subunit is regulated differentially in the primate basal ganglia following nigrostriatal dopamine denervation // *J. Neurochem.* 2000a. Vol. 74. T. 3. P. 1166-1174.
- Betarbet R., Sherer T.B., MacKenzie G. et al.* Garcia-Osuna MChronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson's disease // *Nat Neurosci.* 2000b. Vol. 3. N 12. P. 1301-1306.
- Bezard E., Gross C.E.* Compensatory mechanisms in experimental and human parkinsonism: towards a dynamic approach // *Prog. Neurobiol.* 1998. Vol. 55. № 2. P. 93-116.
- Bezard E., Dovero S., Bioulac B., Gross C.E.* Kinetics of nigral degeneration in a chronic model of MPTP-treated mice // *Neurosci. Lett.* 1997. Vol. 234. № 1. P. 47-50.
- Bezard E., Dovero S., Prunier C. et al.* Relationship between the appearance of symptoms and the level of nigrostriatal degeneration in a progressive 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-lesioned marmoset model of Parkinson's disease // *J. Neurosci.* 2001. Vol. 21. № 17. P. 6853-6861.
- Bezard E., Yue Z., Kirik D., Spillantini M.G.* Animal models of Parkinson's disease: limits and relevance to neuroprotection studies // *Mov. Disord.* 2013. Vol. 28. № 1. P. 61-70.
- Biskup S., Moore D.J., Celsi F. et al.* Localization of LRRK2 to membranous and vesicular structures in mammalian brain // *Ann. Neurol.* 2006. Vol. 60. T. 5. P. 557-569.
- Blanchard V., Raisman-Vozari R., Savasta M. et al.* Cellular quantification of tyrosine hydroxylase in the rat brain by immunautoradiography // *J. Neurochem.* 1993. Vol. 2. P. 617-626.
- Blanchet P.J., Calon F., Morissette M. et al.* Relevance of the MPTP primate model in the study of dyskinesia priming mechanisms // *Parkinsonism Relat. Disord.* 2004. Vol. 10. T. 5. P. 297-304.
- Block M.L., Hong J.S.* Microglia and inflammation-mediated neurodegeneration: multiple triggers with a common mechanism // *Prog. Neurobiol.* 2005. Vol. 76. № 2. P. 77-98.
- Bogdanov M., Matson W.R., Wang L. et al.* Metabolic profiling to develop blood biomarkers for Parkinson's disease // *Brain.* 2008. Vol. 131. P. 389-396.
- Bonuccelli U., Fariello R.G.* Evidence for an epileptogenic action of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine // *Neuropharmacology.* 1989. Vol. 28. P. 1419-1422.
- Bosler O., Calas A.* Radioautographic investigation of monoaminergic neurons: an evaluation // *Brain Res. Bull.* 1982. Vol. 9. P. 151-169.
- Bouhaddi M., Vuillier F., Fortrat J.O. et al.* Impaired cardiovascular autonomic control in newly and long-term-treated patients with Parkinson's disease: involvement of L-dopa therapy // *Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical.* 2004. Vol. 116. P. 30-38.
- Braak H., Braak E.* Pathoanatomy of Parkinson's disease // *J. Neurol.* 2000. Vol. 247. Suppl. 2. P. 3-10.
- Braak H., Del Tredici K., Bratzke H. et al.* Staging of the intracerebral inclusion body pathology associated with idiopathic Parkinson's disease (preclinical and clinical stages) // *J. Neurol.* 2002. Vol. 249. Suppl. 3:III/1-5.
- Braak H., Del Tredici K., Rüb U. et al.* Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease // *Neurobiol Aging.* 2003. Vol. 24. № 2. P. 197-211.
- Brinkley B.R., Barham S.S., Barranco S.C. et al.* Rotenone inhibition of spindle microtubule assembly in mammalian cells // *Exp. Cell. Res.* 1974. Vol. 30. T. 85. № 1. P. 41-46.

- Bronstein D.M., Perez-Otano I., Sun V. *et al.* GLIA-Dependent neurotoxicity and neuroprotection in mesencephalic cultures // *Brain Res.* 1995. Vol. 704. № 1. P. 112-116.
- Brooks A.I., Chadwick C.A., Gelbard H.A. *et al.* Paraquat elicited neurobehavioral syndrome caused by dopaminergic neuron loss // *Brain Res.* 1999. Vol. 823. № 1-2. P. 1-10.
- Bucnerius J., Joe A.Y., Schmaljohann J. *et al.* Feasibility of 2-deoxy-2-[18F]fluoro-D-glucose- A85380-PET for imaging of human cardiac nicotinic acetylcholine receptors in vivo // *Clin. Res. Cardiol.* 2006. Vol. 2. P. 105-109.
- Burns R.S., Chiueh C.C., Markey S.P. *et al.* A primate model of parkinsonism: Selective destruction of dopaminergic neurons in the pars compacta of the substantia nigra by N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1983. Vol. 80. P. 4546-4550.
- Butcher S.P., Fairbrother I.S., Kelly J.S. *et al.* // *J. Neurochem.* 1990. Vol. 55. P. 981-988.
- Cadete L.M., Katz L., Jackson L.V., Fahn S. Vitamin E attenuate toxic effect of intrastriatal injection of 6-hydroxydopamine (6-OHDA) in cats. Behavioral and biochemical evidence // *J. Neurochem.* 1989. Vol. 476. P. 10-15.
- Callier S., Morissette M., Grandbois M. *et al.* Neuroprotective properties of 17beta-estradiol, progesterone, and raloxifene in MPTP C57Bl/6 mice // *Synapse.* 2001. Vol. 41. № 2. P. 131-138.
- Cano-Jaimez M., Perez-Sanchez F., Milan M. *et al.* Vulnerability of peripheral catecholaminergic neurons to MPTP is not regulated by α -synuclein // *Neurobiol. Disease.* 2010. Vol. 38. P. 92-103.
- Cartelli D., Casagrande F., Busceti C.L. *et al.* Microtubule alterations occur early in experimental parkinsonism and the microtubule stabilizer epothilone D is neuroprotective // *Sci. Rep.* 2013. Vol. 3. P. 1837.
- Castaneda E., Whishaw I.Q., Robinson T.E. Changes in striatal dopamine neurotransmission assessed with microdialysis following recovery from a bilateral 6-OHDA lesion: variation as a function of lesion size // *J. Neurosci.* 1990. Vol. 10. № 6. P. 1847-1854.
- Chandra S., Fornai F., Kwon H.B. *et al.* Double-knockout mice for alpha- and beta-synucleins: effect on synaptic functions // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2004. Vol. 101. № 41. P. 14966-14971.
- Chang F.W., Wang S.D., Lu K.T., Lee E.H. Differential interactive effects of gliotoxin and MPTP in the substantia nigra and the locus coeruleus in BALB/c mice // *Brain Res. Bull.* 1993. Vol. 31. P. 253-266.
- Chartier-Harlin M.C., Kachergus J., Roumier C. *et al.* Alpha-synuclein locus duplication as a cause of familial Parkinson's disease // *Lancet.* 2004. Vol. 64. № 9440. P. 1167-1169.
- Chesselet M.F. In vivo alpha-synuclein overexpression in rodents: a useful model of Parkinson's disease? // *Exp. Neurol.* 2008. Vol. 209. P. 22-27.
- Chesselet M.F., Richter F., Zhu C. *et al.* A progressive mouse model of Parkinson's disease: the Thy1-aSyn («Line 61») mice // *Neurotherapeutics.* 2012. Vol. 9. № 2. P. 297-314.
- Chien K.R., Zhu H., Knowlton K.U. *et al.* Transcriptional regulation during cardiac growth and development // *Annu. Rev. Physiol.* 1993. Vol. 55. P. 77-95.
- Cicchetti F., Lapointe N., Roberge-Tremblay A. *et al.* Systemic exposure to paraquat and maneb models early Parkinson's disease in young adult rats // *Neurobiol. Dis.* 2005. Vol. 20. № 2. P. 360-371.
- Clark D.G., McElligott T.F., Hurst E.W. The toxicity of paraquat // *Br. J. Ind. Med.* 1966. Vol. 23. №2. P. 126-132.
- Cohen G., Werner P. Free radicals, oxidative stress, and neurodegeneration // *Neurodegenerative Diseases.* Ed. D.B. Calne. 1994. P. 139-161.
- Cookson M.R. The biochemistry of Parkinson's disease // *Annu. Rev. Biochem.* 2005. Vol. 74. P. 29-52.
- Cui M., Aras R., Christian W.V. *et al.* The organic cation transporter-3 is a pivotal modulator of neurodegeneration in the nigrostriatal dopaminergic pathway // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2009. Vol. 106. № 19. P. 8043-8048.
- Cutillas B., Espejo M., Gil J. *et al.* Caspase inhibition protects nigral neurons against 6-OHDA-induced retrograde degeneration // *Neuroreport.* 1999. Vol. 20. T. 10. № 12. P. 2605-8.
- Dauer W., Przedborski S. Parkinson's disease: mechanisms and models // *Neuron.* 2003a. Vol. 11. T. 39. №6. P. 889-909.
- Dauer W., Przedborski S. Parkinson's disease: mechanisms and models // *Neuron.* 2003b. Vol. 39. № 6. P. 889-909.
- Dauer W., Kholodilov N., Vila M. *et al.* Resistance of alpha -synuclein null mice to the parkinsonian neurotoxin MPTP // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2002. Vol. 29. T. 99. № 22. P. 14524-14529.
- Dawson T.M., Dawson V.L. Parkin plays a role in sporadic Parkinson's disease // *Neurodegener. Dis.* 2014. Vol. 3. № 2-3. P. 69-71.

- Dawson T.M., Ko H.S., Dawson V.L. Genetic animal models of Parkinson's disease // *Neuron*. 2010. Vol. 66. № 5. P. 646-661.
- Decamp E., Tinker J.P., Schneider J.S. Attentional cueing reverses deficits in spatial working memory task performance in chronic low dose MPTP-treated monkeys // *Behav. Brain Res.* 2004. Vol. 152. № 2. P. 259-262.
- Dexter D.T., Jenner P. Parkinson disease: from pathology to molecular disease mechanisms // *Free Radical Biology and Medicine*. 2013. Vol. 62. P. 132-144.
- Drolet R.E., Behrouz B., Lookingland K.J. et al. Mice lacking alpha-synuclein have an attenuated loss of striatal dopamine following prolonged chronic MPTP administration // *Neurotoxicology*. 2004. Vol. 25. T. 5. P. 761-769.
- Du Y., Ma Z., Lin S. et al. Minocycline prevents nigrostriatal dopaminergic neurodegeneration in the MPTP-model of Parkinson's disease // *Proc. Natl. Acad. Sci. US A*. 2001. Vol. 98. № 25. P. 14669-14674.
- Dunnett S.B., Bjorklund A. Prospects for new restorative and neuroprotective treatments in Parkinson's disease // *Nature*. 1999. Vol. 399. № 6738 (Suppl). P. A32-A39.
- Dusonchet J., Kochubey O., Stafa K. et al. A rat model of progressive nigral neurodegeneration induced by the Parkinson's disease-associated G2019S mutation in LRRK2 // *J. Neurosci.* 2011. Vol. 31. P. 907-912.
- Ebert A.D., Hann H.J., Bohn M.C. Progressive Degeneration of Dopamine Neurons in 6-Hydroxydopamine Rat Model of Parkinson's Disease Does Not Involve Activation of Caspase-9 and Caspase-3 // *J. Neurosci. Res.* 2007. Vol. 86. № 2. P. 317-325.
- Edwards A.V., Jones C.T. Adrenal cortical and medullary responses to acetylcholine and vasoactive intestinal peptide in conscious calves // *J. Physiol.* 1993. Vol. 468. P. 515-527.
- Faull R.L., Laverty R. Changes in dopamine levels in the corpus striatum following lesions in the substantia nigra // *Exp. Neurol.* 1969. Vol. 23. № 3. P. 332-340.
- Feany M.B., Bender W.W. A Drosophila model of Parkinson's disease // *Nature*. 2000. Vol. 404. P. 394-398.
- Fernagut P.O., Hutson C.B., Fleming S.M. et al. Behavioral and histopathological consequences of paraquat intoxication in mice: effects of alpha-synuclein over-expression // *Synapse*. 2007. Vol. 1. № 12. P. 991-1001.
- Ferrante R.J., Schulz J.B., Kowall N.W., Beal M.F. Systemic administration of rotenone produces selective damage in the striatum and globus pallidus, but not in the substantia nigra // *Brain Res.* 1997. Vol. 753. № 1. P. 157-162.
- Ferrari C.C., Pott Godoy M.C. Progressive neurodegeneration and motor isabilities induced by chronic expression of IL-1beta in the substantia nigra // *Neurobiol. Dis.* 2006. Vol. 24. № 1. P. 183-193.
- Ferrer I., Martinez A., Blanco R. et al. Neuropathology of sporadic Parkinson disease before the appearance of parkinsonism: preclinical Parkinson disease // *J. Neural. Transmission*. 2011. Vol. 118. P. 821-839.
- Finn M., Mayorga A.J., Bittman K., Salamone D. Animal models of parkinsonian symptoms: involvement of pallidal and nigral GABA in generation of tetrabenazine-induced tremor in rats // *Abstr. Soc. Neurosci.* 1996. Vol. 22. № 3. P. 2129.
- Fleming S.M. Cardiovascular autonomic dysfunction in animal models of Parkinson's disease // *J. Parkinson's Disease*. 2011. Vol. 1. P. 321-327.
- Fleming S.M., Zhu C., Fernagut P.O. et al. Behavioral and immunohistochemical effects of chronic intravenous and subcutaneous infusions of varying doses of rotenone // *Exp. Neurol.* 2004. Vol. 187. № 2. P. 418-429.
- Fleming S.M., Holden J.G., Sioshansi P.C. et al. Alterations in heart rate variability in transgenic mice overexpressing human wildtype alpha synuclein // *Society of Neuroscience*. Chicago: IL, 2009. № 531.9. P. K8.
- Fleming S.M., Jordan M.C., Mulligan C.K. et al. Impaired baroreflex function in mice overexpressing alpha-synuclein // *Front Neurol*. 2013. Vol. 4. P. 103.
- Fornai F., Schlüter O.M., Lenzi P. et al. Parkinson-like syndrome induced by continuous MPTP infusion: convergent roles of the ubiquitin-proteasome system and alpha-synuclein // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2005. Vol. 102. № 9. P. 3413-3418.
- Forno L.S., Langston J.W., DeLanney L.E. et al. Locus ceruleus lesions and eosinophilic inclusions in MPTP-treated monkeys // *Ann. Neurol.* 1986. Vol. 20. № 4. P. 449-455.
- Forno L., DeLanney L., Irwin I. et al. Similarities and differences between MPTP induced parkinsonism and Parkinson's disease // *Neuropathology Considerations*. Adv. Neurol. 1993. Vol. 60. P. 600-608.

- Forte G., Bocca B., Senofonte O. et al.* Trace and major elements in whole blood, serum, cerebrospinal fluid and urine of patients with Parkinson's disease // *J. Neural. Transmission.* 2004. Vol. 111. P. 1031-1040.
- Freed C., Revay R., Vaughan R.A. et al.* Dopamine transporter immunoreactivity in rat brain // *J. Comp. Neurol.* 1995. Vol. 359. P. 340-349.
- Freyaldenhoven T.E., Cadet J.L., Ali S.F.* The dopamine-depleting effects of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine in CD-1 mice are gender-dependent // *Brain Res.* 1996. Vol. 735. № 2. P. 232-238.
- Friedman L.K., Mytilineou C.* Neurochemical and toxic effects of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine and 1-methyl-4-phenylpyridine to rat serotonin neurons in dissociated cell cultures // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1990. Vol. 253. № 2. P. 892-898.
- Fujishiro H., Frigerio R., Burnett M. et al.* Cardiac sympathetic denervation correlates with clinical and pathologic stages of Parkinson's disease // *Mov. Disord.* 2008. Vol. 23. P. 1085-1092.
- Fukumitsu N., Suzuki M., Fukuda T. et al.* Reduced 125I-meta-iodobenzylguanidine uptake and norepinephrine transporter density in the hearts of mice with MPTP-induced parkinsonism // *Nuclear Medicine and Biology.* 2006. Vol. 33. P. 37-42.
- Fukumitsu N, Suzuki M, Fukuda T, Kiyono Y.* Multipoint analysis of reduced (125)I-meta-iodobenzylguanidine uptake and norepinephrine turnover in the hearts of mice with 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced parkinsonism // *Nucl. Med. Biol.* 2009. Vol. 36. № 6. P. 623-629.
- Fuller R.W., Hahn R.A., Snoddy H.D. et al.* Depletion of cardiac norepinephrine in rats and mice by 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) // *Biochem. Pharmacol.* 1984. Vol. 33. P. 2957-2960.
- Fuller R.W., Hemrick-Luecke S.K.* Depletion of norepinephrine in mouse heart by 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) mimicked by 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP+) and not blocked by deprenyl // *Life Sci.* 1986. Vol. 39. P. 1645-1650.
- Fuller R.W., Hemrick-Luecke S.K., Robertson D.W.* Comparison of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) and 1-methyl-4-phenylpyridine (MPP+) effects on mouse heart norepinephrine // *Biochemical Pharmacology.* 1988. Vol. 37. P. 3343-3347.
- Fuller R.W., Hemrick-Luecke S.K., Perry K.W.* Tissue conservations of MPTP and MPP+ in relation to catecholamine depletion after the oral or subcutaneous administration of MPTP to mice // *Life Sci.* 1989. Vol. 45. P. 2077-2083.
- Gao H.M., Hong J.S.* Why neurodegenerative diseases are progressive: uncontrolled inflammation drives disease progression // *Trends Immunol.* 2008. Vol. 29. № 8. P. 357-365.
- Gasser P.J., Orchinik M., Raju I., Lowry C.A.* Distribution of organic cation transporter 3, a corticosterone-sensitive monoamine transporter, in the rat brain // *J. Comp. Neurol.* 2009. Vol. 512. № 4. P. 529-55.
- Georgiev V., Kambourova T.* Behavioural effects of angiotensin II in the mouse following MPTP administration // *Gen. Pharmacol.* 1991. Vol. 22. P. 625-630.
- Gerlach M., Riederer P.* Animal models of Parkinson's disease: an empirical comparison with the phenomenology of the disease in man // *J. Neural. Transm.* 1996. Vol. 103. № 8-9. P. 987-1041.
- Gibrat C., Saint-Pierre M., Bousquet M. et al.* Differences between subacute and chronic MPTP mice models: investigation of dopaminergic neuronal degeneration and alpha-synuclein inclusions // *J. Neurochem.* 2009. Vol. 109. № 5. P. 1469-1482.
- Gispert S., Del Turco D., Garrett L. et al.* Transgenic mice expressing mutant A53T human alphasynuclein show neuronal dysfunction in the absence of aggregate formation // *Mol. Cell. Neurosci.* 2003. Vol. 24. P. 419-429.
- Goldberg M.S., Fleming S.M., Palacino J.J. et al.* Parkin-deficient mice exhibit nigrostriatal deficits but not loss of dopaminergic neurons // *J. Biol. Chem.* 2003. Vol. 278. P. 4328-4335.
- Goldstein D.S.* Dysautonomia in Parkinson's disease: neurocardiological abnormalities // *Lancet Neurol.* 2003. Vol. 2. P. 669-676.
- Goldstein D.S.* Dysautonomia in Parkinson disease // *Compr. Physiol.* 2014. Vol. P. 805-826.
- Goldstein D.S., Li S.T., Holmes C., Bankiewicz K.* Sympathetic innervation in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine primate model of Parkinson's disease // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2003. Vol. 306. № 3. P. 855-860.
- Goldstein D.S., Imrich R., Peckham E. et al.* Neurocirculatory and nigrostriatal abnormalities in Parkinson disease from LRRK2 mutation // *Neurology.* 2007a. Vol. 69. P. 1580-1584.
- Goldstein D.S., Sharabi Y., Karp B.I. et al.* Cardiac sympathetic denervation preceding motor signs in Parkinson disease // *Clin. Auton. Res.* 2007b. Vol. 17. P. 118-121.

- Goldstein D.S., Holmes C., Kopin I.J. et al. Intra-neuronal vesicular uptake of catecholamines is decreased in patients with Lewy body diseases // *J. Clin. Investig.* 2011. Vol. 121. P. 3320-3330.
- Grosicka-Maciąg E., Szumilo M., Czczot H. et al. Modulation of antioxidant defense system by the dithiocarbamate fungicides Maneb and Zineb in Chinese hamster V79 cells and the role of N-acetyl-L-cysteine // *Food Chem. Toxicol.* 2013. Vol. 60. P. 130-134.
- Gupta A., Dawson V.L., Dawson T.M. What causes cell death in Parkinson's disease? // *Ann. Neurol.* 2008. Vol. 64. Suppl 2. P. S3-S15.
- Hallett P.J., McLean J.R., Kartunen A. et al. Alpha-synuclein overexpressing transgenic mice show internal organ pathology and autonomic deficits // *Neurobiol. Dis.* 2012. Vol. 47. P. 258-267.
- Halperin I., More I.I., Korezyn M. et al. Biomarkers for evaluation of clinical efficacy of multipotential neuroprotective drugs for Alzheimer's and Parkinson's diseases // *J. Am. Soc. Experiment. NeuroTherapeutics.* 2009. Vol. 6. P. 128-140.
- He Y., Lee T., Leong S.K. 6-Hydroxydopamine induced apoptosis of dopaminergic cells in the rat substantia nigra // *Brain Res.* 2000. Vol. 858. № 1. P. 163-166.
- He Y., Appel S., Le W. Minocycline inhibits microglial activation and protects nigral cells after 6-hydroxydopamine injection into mouse striatum // *Brain Res.* 2001. Vol. 909. № 1-2. P. 187-193.
- Healy D.G., Falchi M., O'Sullivan S.S. et al. International LRRK2 Consortium. Phenotype, genotype, and worldwide genetic penetrance of LRRK2-associated Parkinson's disease: a case-control study // *Lancet. Neurol.* 2008. Vol. 7. P. 583-590.
- Heikkila R.E., Nicklas W.J., Vyas I., Duvoisin R.C. Dopaminergic toxicity of rotenone and the 1-methyl-4-phenylpyridinium ion after their stereotaxic administration to rats: implication for the mechanism of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine toxicity // *Neurosci. Lett.* 1985. Vol. 62. № 3. P. 389-394.
- Herrera A.J., Castaño A., Venero J.L. et al. The single intranigral injection of LPS as a new model for studying the selective effects of inflammatory reactions on dopaminergic system // *Neurobiol. Dis.* 2000. Vol. 7. № 4. P. 429-447.
- Herrero M.T., Hirsch E.C., Kastner A. et al. Neuromelanin accumulation with age in catecholaminergic neurons from *Macaca fascicularis* brainstem // *Dev. Neurosci.* 1993. Vol. 15. № 1. P. 37-48.
- Hirsch E., Graybiel A.M., Agid Y.A. Melanized dopaminergic neurons are differentially susceptible to degeneration in Parkinson's disease // *Nature.* 1988. Vol. 334. №6180. P. 345-348.
- Hirsch E.C., Hunot S., Damier P., Faucheux B. Glial cells and inflammation in Parkinson's disease: a role in neurodegeneration? // *Ann Neurol.* 1998. Vol. 44. № 3. Suppl 1. P. S115-S120.
- Hirsch E.C., Höglinger G.U., Rousset E. et al. Animal models of Parkinson's disease in rodents induced by toxins: an update *J. Neural. Transm. Suppl.* 2003. Vol. 65. P. 89-100.
- Hirsch E.C., Jenner P., Przedborski S. Pathogenesis of Parkinson's disease // *Mov. Disord.* 2013. Vol. 28. P. 24-30.
- Höglinger G.U., Féger J., Prigent A. et al. Chronic systemic complex I inhibition induces a hypokinetic multisystem degeneration in rats // *J. Neurochem.* 2003. Vol. 84. № 3. P. 491-502.
- Hökfelt T., Ungerstedt U. Specificity of 6-hydroxydopamine induced degeneration of central monoamine neurones: an electron and fluorescence microscopic study with special reference to intracerebral injection on the nigro-striatal dopamine system // *Brain Res.* 1973. Vol. 60. № 2. P. 269-297.
- Hope A.D., Myhre R., Kachergus J. et al. Alpha-synuclein missense and multiplication mutations in autosomal dominant Parkinson's disease // *Neurosci. Lett.* 2004. Vol. 367. № 1. P. 97-100.
- Hou J.G., Cohen G., Mytilineou C. Basic fibroblast growth factor stimulation of glial cells protects dopamine neurons from 6-hydroxydopamine toxicity: involvement of the glutathione system // *J. Neurochem.* 1997. Vol. 69. № 1. P. 76-83.
- Hunter R.L., Cheng B., Choi D.Y. et al. Intra-striatal lipopolysaccharide injection induces parkinsonism in C57/B6 mice // *J. Neurosci. Res.* 2009. Vol. 87. № 8. P. 1913-1921.
- Husain M., Shukla R., Dikshit M. et al. Altered platelet monoamine oxidase-B activity in idiopathic Parkinson's disease // *Neurochem Res.* 2009. Vol. 34. P. 1427-1432.
- Ishizawa T., Mattila P., Davies P., Wang D., Dickson D.W. Colocalization of tau and alpha-synuclein epitopes in Lewy bodies // *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 2003. Vol. 62. № 4. P. 389-3897.
- Itier J.M., Ibanez P., Mena M.A. et al. Parkin gene inactivation alters behaviour and dopamine neurotransmission in the mouse // *Hum. Mol. Genet.* 2003. Vol. 12. P. 2277-2291.
- Itzhak Y., Martin J.L., Black M.D., Ali S.F. Effect of the dopaminergic neurotoxin MPTP on cocaine-induced locomotor sensitization // *Pharmacol. Biochem. Behav.* 1999. Vol. 63. № 1. P. 101-107.

- Jackson-Lewis V., Jakowec M., Burke R.E. et al.* Time course and morphology of dopaminergic neuronal death caused by the neurotoxin 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine // *Neurodegeneration*. 1995. Vol. 3. P. 257-269.
- Jain S.* Multi-organ autonomic dysfunction in Parkinson disease // *Parkinsonism and Related Disorders*. 2011. Vol. 17. P. 77-83.
- Jain S., Goldstein D.S.* Cardiovascular dysautonomia in Parkinson disease: from pathophysiology to pathogenesis // *Neurobiol. Dis.* 2012. Vol. 46. P. 572-580.
- Jellinger K.A.* Pathology of Parkinson's disease. Changes other than the nigrostriatal pathway // *Mo. Chem. Neuropathol.* 1991. Vol. 14. № 3. P. 153-197.
- Jeon B.S., Jackson-Lewis V., Burke R.E.* 6-Hydroxydopamine lesion of the rat substantia nigra: time course and morphology of cell death // *Neurodegeneration*. 1995. Vol. 4. № 2. P. 131-137.
- Joers V., Emborg M.* Modeling and imaging cardiac sympathetic neurodegeneration in Parkinson's disease // *Am. J. Nuc.l Med. Mol. Imaging*. 2014. Vol. 4. № 2. P. 125-159.
- Johannessen J.N., Chiueh C.C., Burns R.S., Markey S.P.* Differences in the metabolism of MPTP in the rodent and primate parallel differences in sensitivity to its neurotoxic effects // *Life Sci.* 1985. Vol. 36. № 3. P. 219-224.
- Jonsson G.* Chemical lesioning techniques: Monoamine neurotoxins // **Handbook of Chemical Neuroanatomy** Vol 1: Methods in Chemical Neuroanatomy. Eds. A. Björklund, T. Hökfelt. Amsterdam: Elsevier, 1983. P. 463-507.
- Kalia L.V., Kalia S.K., McLean P.J. et al.* α -Synuclein oligomers and clinical implications for Parkinson disease // *Ann. Neurol.* 2013. Vol. 73. № 2. P. 155-169.
- Khaindrava V.G., Kozina E.A., Kudrin V.S. et al.* Experimental modeling of preclinical and clinical stages of Parkinson's disease // *Bull. Exp. Biol. Med.* 2011. Vol. 5. P. 566-569.
- Kim Y.S., Joh T.H.* Microglia, major player in the brain inflammation: their roles in the pathogenesis of Parkinson's disease // *Exp. Mol. Med.* 2006. Vol. 38. № 4. P. 333-347.
- Kim R.H., Amith P.D., Aleyasin H. et al.* Hypersensitivity of DJ-1-deficient mice to 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) and oxidative stress // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2005. Vol. 102. P. 5215-5220.
- Kirchhoff J., Mork A., Brennum L.T., Sager T.N.* Striatal extracellular dopamine levels and behavioural reversal in MPTP-lesioned mice // *Neuroreport*. 2009. Vol. 20. № 5. P. 482-486.
- Kirik D., Rosenblad C., Burger C. et al.* Parkinson-like neurodegeneration induced by targeted overexpression of alpha-synuclein in the nigrostriatal system // *J. Neurosci.* 2002. Vol. 22. № 7. P. 2780-2791.
- Klaidman L.K., Adams J.D. Jr, Leung A.C. et al.* **Redox cycling of MPP⁺: evidence for a new mechanism involving hydride transfer with xanthine oxidase, aldehyde dehydrogenase, and lipoamide dehydrogenase** // *Free Radic. Biol. Med.* 1993. Vol. 2. P. 169-179.
- Knott C., Stern G., Wilkin G.P.* Inflammatory regulators in Parkinson's disease: iNOS, lipocortin-1, and cyclooxygenases-1 and -2 // *Mol. Cell. Neurosci.* 2000. Vol. 16. № 6. P. 724-739.
- Koprach J.B., Reske-Nielsen C., Mithal P., Isacson O.* Neuroinflammation mediated by IL-1 β increases susceptibility of dopamine neurons to degeneration in an animal model of Parkinson's disease // *J. Neuroinflammation*. 2008. Vol. 27. P. 5-8.
- Kordower J.H., Felten S.Y., Gash D.M.* Behavioral sequelae following MPTP administration in mice // *MPTP: a Neurotoxin Producing a Parkinsonian Syndrome*. Eds. S.P. Markey, N.Jr. Castagnoli, A.J. Trevor, I.J. Kopin. Orlando: Academic Press, 1986. P. 413-417.
- Kozina E.A., Khakimova G.R., Khaindrava V.G. et al.* Tyroaine hydroxylase expression and activity in nigrostriatal dopaminergic neurons of MPTP-treated mice at the presymptomatic and symptomatic stages of parkinsonism // *J. Neurol. Sci.* 2014. Vol. 340. P. 198-207.
- Kozlowski D.A., Miljan E.A., Bremer E.G. et al.* Quantitative analyses of GFR α -1 and GFR α -2 mRNAs and tyrosine hydroxylase protein in the nigrostriatal system reveal bilateral compensatory changes following unilateral 6-OHDA lesions in the rat // *Brain Res.* 2004. Vol. 1016. № 2. P. 170-181.
- Krüger R., Kuhn W., Müller T. et al.* Ala30Pro mutation in the gene encoding alpha-synuclein in Parkinson's disease // *Nat. Genet.* 1998. Vol. 18. № 2. P. 106-108.
- Kurosaki R., Muramatsu Y., Kato H.* Biochemical, behavioral and immunohistochemical alterations in MPTP-treated mouse model of Parkinson's disease // *Pharmacol. Biochem. Behav.* 2004. Vol. 78. № 1. P. 143-153.

- Kuwahara T., Koyama A., Gengyo-Ando K. et al. Familial Parkinson mutant alpha-synuclein causes dopamine neuron dysfunction in transgenic *Caenorhabditis elegans* // *J. Biol. Chem.* 2006. Vol. 281. P. 334-340.
- Langston J.W., Ballard P. Parkinsonism induced by 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP): implications for treatment and the pathogenesis of Parkinson's disease // *Can. J. Neurol. Sci.* 1984. Vol. 11. № 1 P. 160-165.
- Langston J.W., Forno L.S. The hypothalamus in Parkinson disease // *Ann. Neurol.* 1978. Vol. 3. № 2. P. 129-133.
- Langston J.W., Ballard P., Tetrud J.W. et al. Chronic Parkinsonism in humans due to a product of meperidine-analog synthesis // *Science.* 1983. Vol. 219. № 4587. P. 979-980.
- Langston J.W., Irwin I., Langston E.B. et al. MPTP-induced parkinsonism in humans: A review of the syndrome and observations relating to the phenomenon of tardive toxicity // *MPTP: A Neurotoxin Producing a Parkinsonian Syndrome.* Ed. S.P. Markey. Orlando (Fla.): Acad. Press, 1986. P. 9-21.
- Langston J.W., Forno L.S., Tetrud J. et al. Evidence of active nerve cell degeneration in the substantia nigra of humans years after 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine exposure // *Ann. Neurol.* 1999. Vol. 46. P. 598-605.
- Lapointe N., St-Hilaire M., Martinoli M.G. et al. Rotenone induces non-specific central nervous system and systemic toxicity // *FASEB J.* 2004. Vol. 18. №6. P. 717-719.
- Lau Y.-S., Trobough K.L., Crampton J.M. et al. Effects of probenecid on striatal dopamine depletion in acute and long-term 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)-treated mice // *Gen. Pharmacol.* 1990. Vol. 21. P. 181-187.
- Lee E.H., Lu K.T. Neurotoxicity of MPTP and uptake of MPTP into dopamine and norepinephrine neurons in mice // *Adv. Exp. Med. Biol.* 1995. Vol. 363. P. 29-46.
- Lee M.K., Stirling W., Xu Y., et al. Human alpha-synuclein-harboring familial Parkinson's disease-linked Ala-53 → Thr mutation mutation causes neurodegenerative disease with alpha-synuclein aggregation in transgenic mice // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2002. Vol. 99. № 13. P. 8968-8973.
- Lees A.J., Hardy J., Revesz T. Parkinson's disease // *Lancet.* 2009. Vol. 373. № 9680. P. 2055-2066.
- Li S.T., Dendi R., Holmes C. et al. Progressive loss of cardiac sympathetic innervation in Parkinson's disease // *Ann. Neurol.* 2002. Vol. 52. P. 220-223.
- Li W., West N., Colla E. et al. Aggregation promoting C-terminal truncation of alpha-synuclein is a normal cellular process and is enhanced by the familial Parkinson's disease-linked mutations // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2005. Vol. 102. P. 2162-2167.
- Li Y., Liu W., Oo T.F. et al. Mutant LRRK2 R1441G) BAC transgenic mice recapitulate cardinal features of Parkinson's disease // *Nat. Neurosci.* 2009a. Vol. 12. P. 826-828.
- Li L., Whiteman M., Moore P.K. Dexamethasone inhibits lipopolysaccharide-induced hydrogen sulphide biosynthesis in intact cells and in an animal model of endotoxic shock // *J. Cell. Mol. Med.* 2009b. Vol. 13. № 8B. P. 2684-2692.
- Li X., Patel J.C., Wang J. et al. Enhanced striatal dopamine transmission and motor performance with LRRK2-overexpression in mice is eliminated by familial Parkinson's disease mutation G2019S // *J. Neurosci.* 2010. Vol. 30. №5. P. 1788-1797.
- Lim K.L., Chew K.C., Tan J.M. et al. Parkin mediates nonclassical, proteasomal-independent ubiquitination of synphilin-1: Implications for Lewy body formation // *J. Neurosci.* 2005. Vol. 25. P. 2002-2009.
- Lin J.Y., Mai L.M., Pan J.T. Effects of systemic administration of 6-hydroxydopamine, 6-hydroxydopa and 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydroxyppyridine (MPTP) on tuberoinfundibular dopaminergic neurons in the rat // *Brain Res.* 1993. Vol. 624. № 1-2. P. 126-130.
- Lin S., Wei X., Xu Y. et al. Minocycline blocks 6-hydroxydopamine-induced neurotoxicity and free radical-production in rat cerebellar granule neurons // *Life Sci.* 2003. Vol. 72. № 14. P. 1635-1641.
- Linder J.C., Klemfuss H., Groves P.M. Acute ultrastructural and behavioral effects of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) in mice // *Neurosci. Lett.* 1987. Vol. 82. № 2. P. 221-226.
- Liou H.H., Tsai M.C., Chen C.J. et al. Environmental risk factors and Parkinson's disease: a case-control study in Taiwan // *Neurology.* 1997. Vol. 48. № 6. P. 1583-1588.
- Liu Y., Peter D., Roghani A. et al. cDNA that suppresses MPP+ toxicity encodes a vesicular amine transporter // *Cell.* 1992. Vol. 4. P. 539-551.
- Liu Z., Wang X., Yu Y. A *Drosophila* model for LRRK2-linked parkinsonism // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2008. Vol. 105. P. 2693-2698.

- Lookingland K.J., Moore K.E.* Functional neuroanatomy of hypothalamic dopaminergic neuroendocrine systems // Handbook of Chemical Neuroanatomy. 2004. Vol. 20. P. 433-521.
- Luthman J., Jonsson G.* Effects of the parkinsonism-inducing neurotoxin MPTP and its metabolite MPP+ on sympathetic adrenergic nerves in mouse iris and atrium // *Med. Biol.* 1986. Vol. 64. № 2-3. P. 95-102.
- Luthman J., Sundström E.* No apparent difference in the effects of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) on the sympathetic system in NMRI and C57 BL/6 mice // *Toxicology Letters.* 1990. Vol. 53. P. 83-92.
- Luthman J., Fredriksson A., Sundström E. et al.* Selective lesion of central dopamine or noradrenaline neuron systems in the neonatal rat: motor behavior and monoamine alterations at adult stage // *Behav. Brain Res.* 1989. Vol. 33. № 3. P. 267-277.
- Mak S.K., McCormack A.L., Manning-Bog A.B. et al.* Lysosomal degradation of alpha-synuclein in vivo // *J. Biol. Chem.* 2010. Vol. 285. № 18. P. 13621-13629.
- Manning-Bog A.B., McCormack A.L., Li J. et al.* The herbicide paraquat causes up-regulation and aggregation of alpha-synuclein in mice: paraquat and alpha-synuclein // *J. Biol. Chem.* 2002. Vol. 277. № 3. P. 1641-1644.
- Maraganore D.M., de Andrade M., Elbaz A. et al.* Collaborative analysis of alpha-synuclein gene promoter variability and Parkinson disease // *JAMA. Genetic Epidemiology of Parkinson's Disease (GEO-PD) Consortium.* 2006. Vol. 296. № 6. P. 661-670.
- Marrachelli V.G., Miranda F.J., Alabadi J.A. et al.* Perivascular nerve fiber alpha-synuclein regulates contractility of mouse aorta: a link to autonomic dysfunction in Parkinson's disease // *Neurochem. Inter.* 2010. Vol. 56. P. 991-998.
- Marsden C.D.* Pigmentation in the nucleus substantiae nigrae of mammals // *J. Anat.* 1961. Vol. 95. P. 256-261.
- Martin L.J., Pan Y., Price A.C. et al.* Parkinson's disease alpha-synuclein transgenic mice develop neuronal mitochondrial degeneration and cell death // *J. Neurosci.* 2006. Vol. 26. P. 41-50.
- Martin L.J., Semenkow S., Hanaford A., Wong M.* Mitochondrial permeability transition pore regulates Parkinson's disease development in mutant alpha-synuclein transgenic mice // *Neurobiol. Aging.* 2014. Vol. 35. № 5. P. 1132-1152.
- Matsuoka Y., Vila M., Lincoln S. et al.* Lack of nigral pathology in transgenic mice expressing human alpha-synuclein driven by the tyrosine hydroxylase promoter // *Neurobiol. Diseases.* 2001. Vol. 8. P. 535-539.
- Mayorga A.J., Cousins G., Granutos G., Salamono J.* Animal models of parkinsonian symptoms: Effect of selective muscarinic agents on pilocarpine-induced tremulous jaw movement in rats // *Abstr. Soc. Neurosci.* 1996. Vol. 22. Pt. 3. P. 2129.
- McCormack A.L., Thiruchelvam M., Manning-Bog A.B. et al.* Environmental risk factors and Parkinson's disease: selective degeneration of nigral dopaminergic neurons caused by the herbicide paraquat // *Neurobiol. Dis.* 2002. Vol. 10. № 2. P. 119-127.
- McCormack A.L., Di Monte D.A.* Effects of L-dopa and other amino acids against paraquat-induced nigrostriatal degeneration // *J. Neurochem.* 2003. Vol. 85. № 1. P. 82-86.
- McCoy M.K., Martinez T.N., Ruhn K.A. et al.* Szymkowski DE, Smith CG, Botterman BR, Tansey KE, Tansey MG. Blocking soluble tumor necrosis factor signaling with dominant-negative tumornecrosis factor inhibitor attenuates loss of dopaminergic neurons in models of Parkinson's disease // *J. Neurosci.* 2006. Vol. 26. № 37. P. 9365-9375.
- Melamed E., Hefti F., Pettibone D.J. et al.* Aromatic L-amino acid decarboxylase in rat corpus striatum: implications for action of L-dopa in parkinsonism // *Neurology.* 1981. Vol. 31. № 6. P. 651-655.
- Michell A.W., Luheshi L.M., Barker R.A.* Skin and platelet alpha-synuclein as peripheral biomarkers of Parkinson's disease // *Neurosci. Lett.* 2005. Vol. 381. P. 294-298.
- Mikkelsen M., Moller A., Jensen L.H. et al.* MPTP-induced parkinsonism in mini-pigs: A behavioral, biochemical, and histological study // *Neurotoxicol. Teratol.* 1999. Vol. 21. P. 169-175.
- Miller R.L., James-Kracke M., Sun G.Y., Sun A.Y.* Oxidative and inflammatory pathways in Parkinson's disease // *Neurochem. Res.* 2009. Vol. 34. № 1. P. 55-65.
- Mitra N., Mohanakumar K.P., Ganguly D.K.* Dissociation of serotonergic and dopaminergic components in acute effects of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine in mice // *Brain Res. Bull.* 1992. Vol. 28. P. 355-364.

- Mizuno Y., Sone N., Saitoh T. Effects of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine and 1-methyl-4-phenylpyridinium ion on activities of the enzymes in the electron transport system in mouse brain // *J. Neurochem.* 1987. Vol. 48. P. 1787-1793.
- Mogi M., Harada M., Kondo T. et al. Interleukin-1 beta, interleukin-6, epidermal growth factor and transforming growth factor-alpha are elevated in the brain from parkinsonian patients // *Neurosci. Lett.* 1994. Vol. 180. № 2. P. 147-150.
- Mogi M., Togari A., Tanaka K. et al. Increase in level of tumor necrosis factor (TNF)-alpha in 6-hydroxydopamine-lesioned striatum in rats without influence of systemic L-DOPA on the TNF-alpha induction // *Neurosci. Lett.* 1999. Vol. 268. № 2. P.101-104.
- Moratalla R., Quinn B., DeLanney L.E. et al. Differential vulnerability of primate caudate-putamen and striosome-matrix dopamine systems to the neurotoxic effects of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1992. Vol. 89. № 9. P. 3859-3863.
- Morfini G., Pigino G., Opalach K., Serulle Y., Moreira J.E. Sugimori M., Llinas R.R. Brady S.T. 1-methyl-4-phenylpyridinium affects fast axonal transport by activation of caspase and protein kinase C // *PNAS.* 2007. Vol. 104. № 7. P. 2442-2447.
- Morgan H.E., Baker K.M. Cardiac hypertrophy // *Circulation.* 1991. Vol. 83. P. 13-25.
- Muralikrishnan D., Mohanakumar K.P. Neuroprotection by bromocriptine against 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced neurotoxicity in mice // *FASEB J.* 1998. Vol. 12. P. 905-912.
- Muthane U., Ramsay K.A., Jiang H. et al. Differences in nigral neuron number and sensitivity to 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine in C57/bl and CD-1 mice // *Exp. Neurol.* 1994. Vol. 126. № 2. P. 195-204.
- Nagatsu T. Progress in monoamine oxidase (MAO) research in relation to genetic engineering // *J. Neurotoxicology.* 2004. Vol. 25. № 1-2. P. 11-20.
- Nagatsu T., Sawada M. Inflammatory process in Parkinson's disease: role for cytokines // *Curr. Pharm. Des.* 2005. Vol. 11. № 8. P. 999-1016.
- Namura I., Douillet P., Sun C.J. et al. MPP+ (1-methyl-4-phenylpyridine) is a neurotoxin to dopamine-, norepinephrine- and serotonin-containing neurons // *Eur. J. Pharmacol.* 1987. Vol. 136. № 1. P. 31-37.
- Natalé G., Kastsiushenka O., Fulceri F. et al. MPTP-induced parkinsonism extends to a subclass of TH-positive neurons in the gut // *Brain Res.* 2010. Vol. 1355. P. 195-206.
- Ng C.-H., Mok S.Z.S., Koh C. et al. Parkin protects against LRRK2 G2019S mutant-induced dopaminergic neurodegeneration in *Drosophila* // *J. Neurosci.* 2009. Vol. 29. P. 11257-11262.
- Nicklas W.J., Vyas I., Heikkila R.E. Inhibition of NADH-linked oxidation in brain mitochondria by 1-methyl-4-phenyl-pyridine, a metabolite of the neurotoxin, 1-methyl-4-phenyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine // *Life Sci.* 1985. Vol. 36. P. 2503-2508.
- Nigmatullina R.R., Fedoseeva T.S., Khakimova G.R. et al. Modeling of presymptomatic and symptomatic stages of Parkinsonism in MPTP-treated mice: heart contraction adrenergic regulation and catecholamines content in blood // *J. Electrocardiology.* 2013. Vol. 43. P. e2.
- Nirenberg M.J., Vaughan R.A., Uhl G.R. et al. The dopamine transporter is localized to dendritic and axonal plasma membranes of nigrostriatal dopaminergic neurons // *J. Neurosci.* 1996. Vol. 16. P. 436-437.
- Obeid R., Schadt A., Dillmann U. et al. Methylation status and neurodegenerative markers in Parkinson disease // *Clinical Chemistry.* 2009. Vol. 55. P. 1852-1860.
- O'Callaghan J.P., Sriram K., Miller D.B. Defining »neuroinflammation« // *Ann. NY Acad. Sci.* 2008. Vol. 1139. P. 318-330.
- Offen D., Beart P.M., Cheung N.S. et al. Transgenic mice expressing human Bcl-2 in their neurons are resistant to 6-hydroxydopamine and 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine neurotoxicity // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1998. Vol. 95. № 10. P. 5789-5794.
- Ogawa N., Hirose Y., Ohara S. et al. A simple quantitative bradykinesia test in MPTP-treated mice // *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.* 1985. Vol. 50. № 3. P. 435-441.
- Orimo S., Oka T., Miura H. et al. Sympathetic cardiac denervation in Parkinson's disease and pure autonomic failure but not in multiple system atrophy // *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry.* 2002. Vol. 73. P. 776-777.
- Orimo S., Uchihara T., Nakamura A. et al. Axonal alpha-synuclein aggregates herald centripetal degeneration of cardiac sympathetic nerve in Parkinson's disease // *Brain.* 2008. Vol. 131. P. 642-650.
- Orimo S., Uchihara T., Kanazawa T. et al. Unmyelinated axons are more vulnerable to degeneration than myelinated axons of the cardiac nerve in Parkinson's disease // *Neuropathol., Appl. Neurobiol.* 2011. Vol. 37. P. 791-802.

- Orr C.F., Rowe D.B., Haliday G.M. An inflammatory review of Parkinson's disease // *Progress in Neurobiology*. 2002. Vol. 68. P. 325-340.
- Ossowska K., Wardas J., Smialowska M. et al. A slowly developing dysfunction of dopaminergic nigrostriatal neurons induced by long-term paraquat administration in rats: an animal model of preclinical stages of Parkinson's disease? // *Eur. J. Neurosci*. 2005. Vol. 22. № 6. P. 1294-304.
- Otake K., Oiso Y., Mitsuuma T. et al. Hypothalamic dysfunction in Parkinson's disease patients // *Acta. Med. Hung*. 1994. Vol. 50. № 1-2. P. 3-13.
- Paisán-Ruiz C., Jain, S., Evans, E.W. et al. Cloning of the gene containing mutations that cause PARK8-linked Parkinson's disease // *Neuron*. 2004. Vol. 44. P. 595-600.
- Palfi S., Leventhal L., Chu Y. et al. Lentivirally delivered glial cell line-derived neurotrophic factor increases the number of striatal dopaminergic neurons in primate models of nigrostriatal degeneration // *J. Neurosci*. 2002. Vol. 22. № 12. P. 4942-5494.
- Paris I., Lozano J., Perez-Pastene C. et al. Molecular and neurochemical mechanisms in PD pathogenesis // *Neurotox. Res*. 2009. Vol. 16. № 3. P. 271-279.
- Perez F.A., Curtis W.R., Palmiter R.D. Parkin-deficient mice are not more sensitive to 6-hydroxydopamine or methamphetamine neurotoxicity // *BMC. Neurosci*. 2005. Vol. 6. P. 71.
- Perez-Lloret S., Rey M.V., Fabre N. et al. Factors related to orthostatic hypotension in Parkinson's disease // *Parkinsonism and Related Disorders*. 2012. Vol. 18. P. 501-505.
- Pérez-Otaño I., Herrero MT, Oset C. et al. Extensive loss of brain dopamine and serotonin induced by chronic administration of MPTP in the marmoset // *Brain Res*. 1991. Vol. 567. №1. P. 127-132.
- Pesah Y., Burgess H., Middlebrooks B. et al. Whole-mount analysis reveals normal numbers of dopaminergic neurons following misexpression of alpha-Synuclein in *Drosophila* // *Genesis*. 2005. Vol. 41. № 4. P. 154-159.
- Petroske E., Meredith G.E., Callen S. et al. Mouse model of Parkinsonism: a comparison between subacute MPTP and chronic MPTP/probenecid treatment // *Neuroscience*. 2001. Vol. 106. № 3. P. 589-601.
- Polymeropoulos M.H., Higgins J.J., Golbe L.I. et al. Mapping of a gene for Parkinson's disease to chromosome 4q21-q23 // *Science*. 1996. Vol. 274. № 5290. P. 1197-1199.
- Polymeropoulos M.H., Lavedan C., Leroy E. et al. Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease // *Science*. 1997. Vol. 276. P. 2045-2047.
- Prigione A., Piazza F., Brighina L. et al. Alpha-synuclein nitration and autophagy response are induced in peripheral blood cells from patients with Parkinson disease // *Neurosci. Lett*. 2010. Vol. 477. P. 57-10.
- Przedborski S., Ischiropoulos H. Reactive oxygen and nitrogen species: weapons of neuronal destruction in models of Parkinson's disease // *Antioxid. Redox. Signal*. 2005. Vol. 7. № 5-6. P. 685-93.
- Przedborski S., Vila M. The 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine mouse model: a tool to explore the pathogenesis of Parkinson's disease // *Ann. NY Acad. Sci*. 2003. Vol. 991. P. 189-98.
- Przedborski S., Jackson-Lewis V., Djaldetti R. et al. The parkinsonian toxin MPTP: action and mechanism // *Restor. Neurol. Neurosci*. 2000. Vol. 16. № 2. P. 135-142.
- Qin L., Wu X., Block M.L. et al. Systemic LPS causes chronic neuroinflammation and progressive neurodegeneration // *Glia*. 2007. Vol. 55. № 5. P. 4534-62.
- Quintero E.M., Willis .L., Singleton R. et al. Behavioral and morphological effects of minocycline in the 6-hydroxydopamine rat model of Parkinson's disease // *Brain Res*. 2006. Vol. 1093. № 1. P. 198-207.
- Radja F., el Mansari M., Soghomonian J.J. et al. Changes of D1 and D2 receptors in adult rat neostriatum after neonatal dopamine denervation: quantitative data from ligand binding, in situ hybridization and iontophoresis // *Neurosci*. 1993. Vol. 57. № 3. P. 635-648.
- Raffel D.M., Chen W., Sherman P.S. et al. Dependence of cardiac 11C-meta-hydroxyephedrine retention on norepinephrine transporter density // *J. Nucl. Med*. 2006. Vol. 47. P. 1490-1496.
- Ramsay R.R., Singer T.P. Energy-dependent uptake of N-methyl-4-phenylpyridinium, the neurotoxic metabolite of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine, by mitochondria // *J. Biol. Chem*. 1986. Vol. 17. P. 7585-7587.
- Ren J., Porter J.E., Wold L.E. et al. Depressed contractile function and adrenergic responsiveness of cardiac myocytes in an experimental model of Parkinson disease, the MPTP-treated mouse // *Neurobiology of Aging*. 2004. Vol. 25. P. 131-138.
- Ricaurte G.A., Langston J.W., Delaney L.E. et al. Fate of nigrostriatal neurons in young mature mice given 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine: a neurochemical and morphological reassessment // *Brain Res*. 1986. Vol. 18. № 376. № 1. P. 117-124.

- Richardson J.R., Quan Y., Sherer T.B. *et al.* Paraquat neurotoxicity is distinct from that of MPTP and rotenone // *Toxicol Sci.* 2005. Vol. 88. № 1. P. 193-201.
- Richfield E.K., Thiruchelvam M.J., Cory-Slechta D.A. *et al.* Behavioral and neurochemical effects of wild-type and mutated human alpha-synuclein in transgenic mice // *Exp. Neurol.* 2002. Vol. 175. P. 35-48.
- Rinne J.O., Rinne J.K., Laakso K. *et al.* Dopamine D-1 receptors in the parkinsonian brain // *Brain Res.* 1985. Vol. 359. № 1-2. P. 306-310.
- Robinson T.E., Whishaw I.Q. Normalization of extracellular dopamine in striatum following recovery from a partial unilateral 6-OHDA lesion of the substantia nigra: a microdialysis study in freely moving rats // *Brain Res.* 1988. Vol. 450. № 1-2. P. 209-224.
- Rockenstein E., Mallory M., Hashimoto M. *et al.* Differential neuropathological alterations in transgenic mice expressing alpha-synuclein from the platelet-derived growth factor and Thy-1 promoters // *J. Neurosci. Res.* 2002. Vol. 68. P. 568-578.
- Rodriguez M., Barroso-Chinea P., Abdala P. *et al.* Dopamine cell degeneration induced by intraventricular administration of 6-hydroxydopamine in the rat: similarities with cell loss in parkinson's disease // *Exp. Neurol.* 2001. Vol. 169. № 1. P. 163-181.
- Rojas J.C., Simola N., Kermath B.A. *et al.* Striatal neuroprotection with methylene blue // *Neurosci.* 2009. Vol. 163. № 3. P. 877-889.
- Rothwell N. Interleukin-1 and neuronal injury: mechanisms, modification, and therapeutic potential // *Brain Behav. Immun.* 2003. Vol. 17. № 3. P. 152-157.
- Rousseaux M.W., Marcogliese P.C., Qu D. *et al.* Progressive dopaminergic cell loss with unilateral-to-bilateral progression in a genetic model of Parkinson disease // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2012. Vol. 109. № 39. P. 15918-159123.
- Rowland N., Stricker E.M. Effects of dopamine-depleting brain lesions on experimental hyperphagia in rats // *Physiol. Behav.* 1982. Vol. 28. № 2. P. 271-277.
- Ruiz-Martinez J., Gorostidi A., Goyenechea E. *et al.* Olfactory deficits and cardiac 123I-MIBG in Parkinson's disease related to the LRRK2 R1441G and G2019S mutations // *Mov. Disord.* 2011. Vol. 26. P. 2026-2031.
- Sadoshima J., Izumo S. The cellular and molecular response of cardiac myocytes to mechanical stress // *Annu Rev Physiol.* 1997. Vol. 59. P. 551-571.
- Saha S., Guillily M.D., Ferree A. *et al.* LRRK2 modulates vulnerability to mitochondrial dysfunction in *Caenorhabditis elegans* // *J. Neurosci.* 2009. Vol. 29. P. 9210-9218.
- Saint-Pierre M., Tremblay M.E., Sik A. *et al.* Temporal effects of paraquat/maneb on microglial activation and dopamine neuronal loss in older rats // *J. Neurochem.* 2006. Vol. 98. № 3. P. 760-772.
- Sakai K., Gash D.M. Effect of bilateral 6-OHDA lesions of the substantia nigra on locomotor activity in the rat // *Brain Res.* 1994. Vol. 633. № 1-2. P. 144-150.
- Sandmann-Keil D., Braak H. Postmortal diagnosis of Parkinson's disease // *Pathologie.* 2005. Vol. 26. № 3. P. 214-212.
- Samantaray S., Knaryan V.H., Guyton M.K. *et al.* The parkinsonian neurotoxin rotenone activates calpain and caspase-3 leading to motoneuron degeneration in spinal cord of Lewis rats // *Neurosci.* 2007. Vol. 146. № 2. P. 741-755.
- Sauer H., Oertel W.H. Progressive degeneration of nigrostriatal dopamine neurons following intrastriatal terminal lesions with 6-hydroxydopamine: a combined retrograde tracing and immunocytochemical study in the rat // *Neurosci.* 1994. Vol. 59. № 2. P. 401-415.
- Saura J., Kettler R., Da Prada M. *et al.* Quantitative enzyme vadio autography with 3H-Ro 41-1049 and 3H-Ro 19-6327 *in vivo*: localization and abundance of MAO-A and MA)-B in nat CNS, ptripheral organs, and human brain // *J. Neurosci.* 1992. Vol. 12. P. 1977-1999.
- Schallert T., Upchurch M., Wilcox R.E. *et al.* Posture-independent sensorimotor analysis of inter-hemispheric receptor asymmetries in neostriatum // *Pharmacol. Biochem. Behav.* 1983. Vol. 18. № 5. P. 753-759.
- Schallert T., Fleming S.M., Leasure J.L. *et al.* CNS plasticity and assessment of forelimb sensorimotor outcome in unilateral rat models of stroke, cortical ablation, parkinsonism and spinal cord injury // *Neuropharmacology.* 2000. Vol. 39. № 5. P. 777-787.
- Schlossmacher M.G., Shimura H. Parkinson's disease: Assays for the ubiquitin ligase activity of neural Parkin // *Meth. Mol. Bio.* 2005. Vol. 301. P. 351-369.
- Schneider J.S. Chronic exposure to low doses of MPTP. II. Neurochemical and pathological consequences in cognitively-impaired, motor asymptomatic monkeys // *Brain Res.* 1990. Vol. 534. № 1-2. P. 25-36.

- Schneider J.S., Denaro F.J.* Astrocytic responses to the dopaminergic neurotoxin 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) in cat and mouse brain // *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 1988. Vol. 47. № 4. P. 452-458.
- Schneider J.S., Kovelowski C.J.* Cognitive deficits in motor asymptomatic monkeys // *Brain Res.* 1990. Vol. 519. № 1-2. P. 122-128.
- Schneider J.S., Pope-Coleman A.* Cognitive deficits precede motor deficits in a slowly progressing model of parkinsonism in the monkey // *Neurodegeneration.* 1995. Vol. 4. № 3. P. 245-55.
- Schneider J.S., Rothblat D.S., Distefano L.* Volume transmission of dopamine over large distances may contribute to recovery from experimental parkinsonism // *Brain Res.* 1994. Vol. 643. P. 86-91.
- Schneider J.S., Pope-Coleman A., Van Velson M. et al.* Effects of SIB-1508Y, a novel neuronal nicotinic acetylcholine receptor agonist, on motor behavior in parkinsonian monkeys// *Mov. Disord.* 1998. Vol. 13. № 4. P. 637-42.
- Schuler F., Casida J.E.* Functional coupling of PSST and ND1 subunits in NADH: ubiquinone oxidoreductase established by photoaffinity labeling // *Biochim. Biophys. Acta.* 2001. Vol. 1506. № 1. P. 79-87.
- Schober A.* Classic toxin-induced animal models of Parkinson's disease: 6-OHDA and MPTP // *Cell. Tissue Res.* 2004. Vol. 318. № 1. P. 215-224.
- Schwartz R.K.W., Huston J.P.* The unilateral 6-hydroxydopamine lesion model in behavioral brain research: analysis of functional deficits, recovery and treatments // *Progr. Neurobiol.* 1996. Vol. 50. P. 275-331.
- Schwartz R.K.W., Sedelis M., Hofe K., et al.* Strain-dependent recovery of open-field behavior and striatal dopamine deficiency in the mouse MPTP model of Parkinson's disease // *Neurotox. Res.* 1999. Vol. 1. P. 41-56.
- Sedelis M., Rainer K.W., Schwartz J.P.* Behavioral phenotyping of the MPTP mouse model of Parkinson's disease // *Behav. Brain Res.* 2001a. Vol. 125. P. 109-122.
- Seniuk N.A., Tatton W.G., Greenwood C.E.* Dose-dependent destruction of the coeruleus-cortical and nigral-striatal projections by MPTP// *Brain Res.* 1990. Vol. 527. № 1. P. 7-20.
- Shannak K., Rajput A., Rozdilsky B. et al.* Noradrenaline, dopamine and serotonin levels and metabolism in the human hypothalamus: observations in Parkinson's disease and normal subjects // *Brain Res.* 1994. Vol. 639. № 1. P. 33-41.
- Sherer T.B., Betarbet R., Testa C.M. et al.* Mechanism of toxicity in rotenone models of Parkinson's disease // *J. Neurosci.* 2003. Vol. 23. № 34. P. 10756-10764.
- Shimizu K., Ohtaki K., Matsubara K. et al.* Carrier-mediated processes in blood-brain barrier penetration and neural uptake of paraquat // *Brain Res.* 2001. Vol. 906. № 1-2. P. 135-142.
- Shimoji M., Zhang L., Mandir A.S. et al.* Absence of inclusion body formation in the MPTP mouse model of Parkinson's disease // *Brain Res. Mol. Brain Res.* 2005. Vol. 134. № 1. P. 103-108.
- Singleton A.B., Farrer M., Johnson J. et al.* Alpha-Synuclein locus triplication causes Parkinson's disease // *Science.* 2003. Vol. 302. P. 841.
- Singleton A., Gwinn-Hardy K., Sharabi Y. et al.* Association between cardiac denervation and parkinsonism caused by alpha-synuclein gene triplication // *Brain.* 2004. Vol. 127. P. 768-772.
- Smeyne R.J., Jackson-Lewis V.* The MPTP model of Parkinson's disease // *Brain Res. Mol. Brain Res.* 2005. Vol. 134. № 1. P. 57-66.
- Smith P., Heath D.* Paraquat // *CRC Crit Rev Toxicol.* 1976. Vol. 4. № 4. P. 411-445.
- Smith A.D., Cohen A.D., Castro S.L. et al.* Activation of the extracellular-signal regulated kinase signaling cascade by forced limb-use in a 6-hydroxydopamine Parkinson's disease rodent model // *Soc. Neurosci.* 2003.
- Snow B.J., Vingerhoets F.J., Langston J.W. et al.* Pattern of dopaminergic loss in the striatum of humans with MPTP induced parkinsonism // *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry.* 2000. Vol. 68. № 3. P. 313-316.
- Sonsalla P.K., Heikkila R.E.* The influence of dose and dosing interval on MPTP-induced dopaminergic neurotoxicity in mice // *Eur. J. Pharmacol.* 1986. Vol. 129. № 3. P. 339-345.
- Spooren W.P.J.M., Vassout A., Waldmeier P., Gentsch C.* Differences in pre- and post-synaptic sensitivity to apomorphine between saline and 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-treated C57BL/6 mice as reflected in climbing activity // *Eur. J. Pharmacol.* 1998. Vol. 353. P. 1-4.
- Stern Y., Tetrud J.W., Martin W.R. et al.* Cognitive change following MPTP exposure // *Neurology.* 1990. Vol. 40. № 2. P. 261-4.
- Stricker E.M., Zigmond M.J.* Effects on homeostasis of intraventricular injections of 6-hydroxydopamine in rats // *J. Comp. Physiol. Psychol.* 1974. Vol. 86. № 6. P. 973-994.
- Sundström E., Samuelsson E.B.* Comparison of key steps in 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) neurotoxicity in rodents // *Pharmacol. Toxicol.* 1997. Vol. 81. P. 226-231.

- Sundström E., Luthman J., Jonsson G., Goldstein M.* Determination of monoamines by use of liquid chromatography with electrochemical detection in the study of selective monoamine neurotoxins // *Life Sci.* 1987a. Vol. 41. № 7. P. 857-860.
- Sundström E., Strömberg I., Tsutsumi T. et al.* Olson L, Jonsson G. Studies on the effect of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) on central catecholamine neurons in C57BL/6 mice. Comparison with three other strains of mice // *Brain Res.* 1987b. Vol. 405. № 1. P. 26-38.
- Sundström E., Luthman J., Goldstein M., Jonsson G.* Time course of MPTP-induced degeneration of the nigrostriatal dopamine system in C57 BL/6 mice // *Brain Res. Bull.* 1988. Vol. 21. № 2. P. 257-263.
- Takahashi R.N., Rogerio R., Zanin M.* Maneb enhances MPTP neurotoxicity in mice // *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.* 1989. Vol. 66. P. 167-170.
- Takahashi N., Miner L.L., Sora I. et al.* VMAT2 knockout mice: heterozygotes display reduced amphetamine-conditioned reward, enhanced amphetamine locomotion, and enhanced MPTP toxicity // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1997. Vol. 18. P. 9938-9943.
- Takatsu H., Nishida H., Matsuo H. et al.* Cardiac sympathetic denervation from the early stage of Parkinson's disease: clinical and experimental studies with radiolabeled MIBG // *J. Nucl. Med.* 2000. Vol. 41. P. 71-77.
- Tansey M.G., McCoy M.K., Frank-Cannon T.C.* Neuroinflammatory mechanisms in Parkinson's disease: potential environmental triggers, pathways, and targets for early therapeutic intervention // *Exp Neurol.* 2007. Vol. 208. № 1. P. 1-25.
- Tatton N.A., Kish S.J.* In situ detection of apoptotic nuclei in the substantia nigra compacta of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-treated mice using terminal deoxynucleotidyl transferase labelling and acridine orange staining // *Neurosci.* 1997. Vol. 77. № 4. P. 1037-48.
- Tetrad J.W., Langston J.W., Redmond D.E. et al.* Mptp-induced tremor in human and non-human primates // *Neurology.* 1986. Vol. 36. Suppl. 1. P. 308-308.
- Thiruchelvam M., Brockel B.J., Richfield E.K. et al.* Potentiated and preferential effects of combined paraquat and maneb on nigrostriatal dopamine systems: environmental risk factors for Parkinson's disease? // *Brain Res.* 2000a. Vol. 873. № 2. P. 225-234.
- Thiruchelvam M., Richfield E.K., Baggs R.B. et al.* The nigrostriatal dopaminergic system as a preferential target of repeated exposures to combined paraquat and maneb: implications for Parkinson's disease // *J. Neurosci.* 2000b. Vol. 20. № 24. P. 9207-9214.
- Thiruchelvam M.J., Powers J.M., Cory-Slechta D.A., Richfield E.K.* Risk factors for dopaminergic neuron loss in human alpha-synuclein transgenic mice // *Europ. J. Neurosci.* 2004. Vol. 19. P. 845-854.
- Thoenen H., Tranzer J.P.* On the possibility of chemical sympathectomy by selective destruction of adrenergic nerve endings with 6-hydroxydopamine (6-OH-DA) // *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Exp. Pathol. Pharmacol.* 1968. Vol. 260. № 2. P. 212-213.
- Thomas B., Mandir A.S., West N. et al.* Resistance to MPTP-Neurotoxicity in α -synuclein knockout mice is complemented by human α -synuclein and associated with increased β -synuclein and Akt activation // *PLoS One.* 2011. Vol. 6. № 1. Article ID e16706.
- Tieu K.* A guide to neurotoxic animal models of Parkinson's disease // *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 2011. doi: 10.1101/cshperspect.a009316.
- Tillerson J.L., Caudle W.M., Reverón M.E. et al.* Detection of behavioral impairments correlated to neurochemical deficits in mice treated with moderate doses of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine // *Exp. Neurol.* 2002. Vol. 178. № 1. P. 80-90.
- Tipton K.F., Singer T.P.* Advances in our understanding of the mechanisms of the neurotoxicity of MPTP and related compounds // *J. Neurochem.* 1993. Vol. 61. P. 1191-1206.
- Tranzer J.P., Thoenen H.* An electron microscopic study of selective, acute degeneration of sympathetic nerve terminals after administration of 6-hydroxydopamine // *Experientia.* 1968. Vol. 24. № 2. P.155-156.
- Ugrumov M.* Brain neurons partly expressing monoaminergic phenotype: Distribution, development, and functional significance in norm and pathology // *Handbook of Neurochemistry and Molecular Neurobiology.* Ed. A. Lajta. Heidelberg: Springer, 2008. P. 21-53.
- Ugrumov M., Khaindrava V., Kozina E. et al.* Modeling of presymptomatic and symptomatic stages of parkinsonism in mice // *Neurosci.* 2011. Vol. 181. P. 178-188.
- Ukrainitseva Yu.S., Shchegolevskii N.V., Korshunov V.A. et al.* Modeling of the presymptomatic stage of parkinsonism in mice: Analysis of dopamine release in the striatum // *Neurochem. J.* 2010. Vol. 4. № 2. P. 142-147.

- Umamoto S. Distributions of catecholamines in the heart of mammalian laboratory species // Bull. Yamaguchi Med. Sch. 1984. Vol. 31. P. 71-77.
- Ungerstedt U. 6-Hydroxy-dopamine induced degeneration of central monoamine neurons // Eur. J. Pharmacol. 1968. Vol. 5. № 1. P. 107-110.
- Ungerstedt U. Stereotaxic mapping of the monoamine pathways in the rat brain // Acta. Physiol. Scand. Suppl. 1971. Vol. 367. P. 1-48.
- Ungerstedt U., Arbuthnott G.W. Quantitative recording of rotational behavior in rats after 6-hydroxydopamine lesions of the nigrostriatal dopamine system // Brain Res. 1970. Vol. 24. № 3. P. 485-493.
- Vila M., Jackson-Lewis V., Vukosavic S. et al. Bax ablation prevents dopaminergic neurodegeneration in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine mouse model of Parkinson's disease // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2001. Vol. 98. № 5. P. 2837-2842.
- Viswanath V., Wu Y., Boonplueang R. et al. Caspase-9 activation results in downstream caspase-8 activation and bid cleavage in 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced Parkinson's disease // J. Neurosci. 2001. Vol. 21. № 24. P. 9519-9528.
- Von Coelln R., Dawson V.L., Dawson T.M. Parkin-associated Parkinson's disease // Cell. Tissue. Res. 2004. Vol. 318. P. 175-184.
- Wallace R.A., Boldry R., Schmittgen T. et al. Effect of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6 tetrahydropyridine (MPTP) on monoamine neurotransmitters in mouse brain & heart // Life Sci. 1984. Vol. 35. P. 285-291.
- Wang D., Tang B., Zhao G. et al. Dispensable role of Drosophila ortholog of LRRK2 kinase activity in survival of dopaminergic neurons // Mol. Neurodegener. 2008. Vol. 3. P. 3.
- Warenycia M.W., McKenzie G.M. Activation of striatal neurons by dexamphetamine is antagonized by degeneration of striatal dopaminergic terminals // J. Neural. Transm. 1987. Vol. 70. № 3-4. P. 217-32.
- Wehrwein E.A., Parker L.M., Wright A.A. et al. Cardiac norepinephrine transporter protein expression is inversely correlated to chamber norepinephrine content // Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. 2008. Vol. 3. P. R857-863.
- Weihmuller F.B., Hadjiconstantinou M., Bruno J.P., Neff N.H. Administration of GM1 ganglioside eliminates neuroleptic-induced sensorimotor deficits in MPTP-treated mice // Neurosci. Lett. 1988. Vol. 92. P. 207-212.
- Weihmuller F.B., Hadjiconstantinou M., Bruno J.P. Dopamine receptors and sensorimotor behavior in MPTP-treated mice // Behav. Brain Res. 1990. Vol. 38. P. 263-273.
- Westlund K.N., Krakower T.J., Kwan S.W. et al. Intracellular distribution of monoamine oxidase A in selected regions of rat and monkey brain and spinal cord // Brain Res. 1993. Vol. 612. P. 221-230.
- Winkler S., Hagenah J., Lincoln S. et al. Alpha-Synuclein and Parkinson disease susceptibility // Neurology. 2007. Vol. 69. P. 1745-1750.
- Wong K.K., Raffel D.M., Koeppel R.A. et al. Pattern of cardiac sympathetic denervation in idiopathic Parkinson disease studied with ¹¹C hydroxyephedrine PET // Radiology. 2012. Vol. 265. P. 240-247.
- Wu D.C., Jackson-Lewis V., Vila M. et al. Blockade of microglial activation is neuroprotective in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine mouse model of Parkinson disease // J. Neurosci. 2002. Vol. 22. № 5. P. 1763-1771.
- Yang L., Matthews R.T., Schulz J.B. et al. 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine neurotoxicity is attenuated in mice overexpressing Bcl-2 // J. Neurosci. 1998. Vol. 15. № 18. № 20. P. 8145-52.
- Yang L., Sugama S., Chirichigno J.W. et al. Minocycline enhances MPTP toxicity to dopaminergic neurons // J. Neurosci. Res. 2003. Vol. 74. № 2. P. 278-285.
- Yokota T., Sugawara K., Ito K. et al. Down regulation of DJ-1 enhances cell death by oxidative stress, ER stress, and proteasome inhibition // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2003. Vol. 312. P. 1342-1348.
- Zarranz J.J., Alegre J., Gómez-Esteban J.C. et al. The new mutation, E46K, of alpha-synuclein causes Parkinson and Lewy body dementia // Ann. Neurol. 2004. Vol. 55. № 2. P. 164-173.
- Zhang W., Phillips K., Wielgus A.R. et al. Neuromelanin activates microglia and induces degeneration of dopaminergic neurons: implications for progression of Parkinson's disease // Neurotox. Res. 2011. Vol. 19. № 1. P. 63-72.
- Zhu C., Vourc'h P., Fernagut P.O. et al. Variable effects of chronic subcutaneous administration of rotenone on striatal histology // J. Comp. Neurol. 2004. Vol. 478. № 4. P. 418-426.
- Zigmond M.J. Do compensatory processes underlie the preclinical phase of neurodegenerative disease? Insights from an animal model of parkinsonism // Neurobiol. Dis. 1997. Vol. 4. № 3-4. P. 247-253.

- Zigmond M.J., Stricker E.M.* Recovery of feeding and drinking by rats after intraventricular 6-hydroxydopamine or lateral hypothalamic lesions // *Science*. 1973. Vol. 16. №182. № 4113. P. 717-720.
- Zigmond M.J., Abercrombie E.D., Berger T.W. et al.* Compensations after lesions of central dopaminergic neurons: some clinical and basic implications // *Trends Neurosci*. 1990. Vol. 13. P. 290-296.
- Zimprich A., Biskup S., Leitner P. et al.* Mutations in LRRK2 cause autosomal-dominant parkinsonism with pleomorphic pathology // *Neuron*. 2004. Vol. 44. P. 601-607.
- Zuch C.L., Nordstroem V.K., Briedrick L.A. et al.* Time course of degenerative alterations in nigral dopaminergic neurons following a 6-hydroxydopamine lesion // *J. Comp. Neurol*. 2000. Vol. 427. № 3. P. 440-454.

НАРУШЕНИЕ МОТОРИКИ НЕПАРКИНСОНИЧЕСКОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

Судорожная активность и нейродегенерация

В.А. Аниол, Н.В. Гуляева

Эпилепсия является одним из наиболее распространенных неврологических заболеваний человека (Annegers, 1994; Berg et al., 1996). При этом эпилепсия не представляет собой нозологического единства; по сути, это группа заболеваний с различной этиологией, общим для которых является развитие характерной спонтанной судорожной активности в мозге. Среди причин эпилепсии рассматривают повреждения, пороки развития мозга и опухоли (симптоматическая эпилепсия); тем не менее, чаще всего явную причину развития эпилепсии выявить не удастся (идиопатическая эпилепсия). В последнем случае предполагают наличие генетически обусловленных нарушений в строении мембранных ионных каналов, белков-транспортеров или ионных насосов клетки. Неясной по сей день остается взаимосвязь эпилептогенеза и нейродегенерации, обнаруживаемой в образцах ткани, полученной в ходе хирургического вмешательства по поводу фармакорезистентной эпилепсии или посмертного исследования мозга пациентов с эпилепсией (Dam, 1980; Babb et al., 1984; Meldrum, 1997; Sutula, Pitkanen, 2001; Briellmann et al., 2001; Duncan, 2002; Meldrum, 2002; Sutula et al., 2003). **Модели на животных не в состоянии** вполне адекватно решить эту проблему, так как при моделировании судорог первичным действующим фактором является тот или иной проконвульсивный стимул, что ограничивает возможность изучения ранних механизмов возникновения эпилепсии. Тем не менее, эти модели могут помочь в изучении более поздних стадий эпилептогенеза и выяснить, принимает ли участие нейродегенерация, вызванная судорогами, в дальнейшем прогрессировании судорожной активности, или же она является исключительно следствием судорожной активности в мозге, определяющим некоторые из симптомов эпилепсии, но не влияющим на ход основного патологического процесса. Вопрос о принадлежности эпилепсии к группе заболеваний, патогенез которых связан с нейродегенерацией, сводится, таким образом, к выяснению того, в какой степени гибель нейронов в мозге при эпилепсии может способствовать повышению вероятности наступления повторных судорог.

Наиболее распространенным и изученным с патоморфологической точки зрения синдромом является эпилепсия височной доли (ЭВД), встречающаяся у 60–75% пациентов с эпилепсией (Sirven, 2002). У взрослых лимбические судороги при ЭВД приводят к потере клеток мозга и развитию склероза гиппокампа (Naegele, 2007).

Сокращения: ЭВД – эпилепсия височной доли.

В раннем исследовании (Margerison, Corsellis, 1966) при анализе постмортального материала от пациентов с ЭВД у 95% было установлено наличие склероза гиппокампа разной степени выраженности. В дальнейшем с развитием хирургических методов лечения фармакорезистентной эпилепсии эти данные были подтверждены, причем умеренное снижение числа нейронов в гиппокампе было продемонстрировано даже в тех случаях, когда склероз гиппокампа не был явно выражен в резекционном материале (De Lanerolle et al., 1994, 2003; Zaveri et al., 2001). В развернутой форме склероз гиппокампа выявлен у 60–85% пациентов, которым проводили хирургическое вмешательство по поводу ЭВД (Fuerst et al., 2003). В основном нейродегенерация наблюдается в пирамидном слое полей CA1, CA3 и в полиморфном слое зубчатой извилины (хилусе). Умеренная гибель нейронов происходит в поле CA2, гранулярном слое зубчатой извилины и в субикулуме (Miller et al., 2000; Lawson et al., 2000; Pitkanen et al., 2000). Склероз гиппокампа преимущественно происходит ипсилатерально к очагу судорог, хотя иногда наблюдают и склероз контралатерального гиппокампа; в существенной доле случаев он наблюдается даже при экстратемпоральном расположении очагов судорог (Kim, 2001).

Пирамидные нейроны полей CA1-CA3 являются, по-видимому, наиболее подверженными дегенерации у пациентов с ЭВД; объем нейрональной гибели здесь может колебаться между 50% от их нормальной численности и почти тотальной гибелью (Kim et al., 1990). Высокая чувствительность полей CA1-CA3 к повреждающему действию судорог является причиной того, что у части пациентов с эпилепсией эти области являются единственными участками в мозге, где наблюдается нейрональная гибель. В зубчатой извилине гиппокампа ЭВД в большинстве случаев сопровождается истончением слоя гранулярных нейронов и появлением в нем промежутков (De Lanerolle et al., 1992), а также рассеянием (дисперсией) гранулярных нейронов из одноименного слоя в вышележащий молекулярный слой (Blümcke et al., 2009). Интересно, что данная патология является, видимо, врожденной, и связана со снижением уровня реелина – белка, ответственного за правильную миграцию предшественников нейронов во время созревания мозга (Naas et al., 2002). Область зубчатой извилины является также местом постнатального нейрогенеза, однако дисперсия гранулярного слоя, видимо, не имеет отношения к этому процессу, так как у пациентов с длительно текущей фармакорезистентной эпилепсией, являющейся показанием к оперативному вмешательству, уровень нейрогенеза в гиппокампе обычно существенно снижен (Fahner et al., 2007). Еще одной характерной особенностью гранулярных клеток при эпилепсии является т.н. «спраутинг» мшистых волокон (эфферентов гранулярных нейронов). Этот феномен заключается в избыточном ветвлении аксонов оставшихся гранулярных нейронов и возврате части их коллатералей обратно в молекулярный слой, где они могут образовывать синапсы на дендритах соседних гранулярных клеток (Isokawa, 1997). Было показано, что такая реорганизация зубчатой фасции в действительности способствует формированию в этом месте эпилептогенного очага.

Развитию гипервозбуждения в гиппокампе способствует ослабление его торозных контуров. Так, при склерозе гиппокампа наблюдается уменьшение численности интернейронов полиморфного слоя зубчатой извилины (хилуса), содер-

жащих нейропептид Y, вещество P и соматостатин (De Lanerolle et al., 1989). В качестве основного медиатора эти нейроны выделяют ГАМК, поэтому их гибель приводит к растормаживанию главных нейронов зубчатой извилины. Еще большее значение имеет, как полагают, гибель мшистых клеток хилуса. Эти клетки образуют возбуждающие глутаматергические синапсы на тормозных корзинчатых нейронах (Sloviter, 1991). В результате уменьшения плотности мшистых клеток, наблюдаемого при судорогах, происходит снижение активности корзинчатых клеток и, как следствие, ослабление тормозного влияния на гранулярные клетки зубчатой извилины (Sloviter, 1987). На этих примерах видно, что гибель интернейронов хилуса, наблюдаемая при эпилепсии, может способствовать дальнейшему прогрессированию заболевания.

На различных моделях судорог у животных также было показано существенное снижение плотности нейронов в различных отделах гиппокампа, а также областях новой коры и ядрах амигдалярного комплекса. Специфичность нейрональной гибели при экспериментальном моделировании судорог в целом соответствует картине, наблюдаемой при ЭВД у человека с наиболее выраженной дегенерацией в полях CA1 и CA3, а также в хилусе зубчатой извилины (Lowenstein, 2001; Lukoyanov et al., 2004). При моделировании хронической, постепенно развивающейся судорожной активности (пентилентетразоловый и амигдалярный киндлинг) также была показана гибель нейронов в различных отделах гиппокампа (Frantseva et al., 2000; Franke, Kittner, 2001; Pavlova et al., 2006b; Попова и др., 2012).

Среди факторов, индуцирующих гибель нейронов, наибольшее внимание уделяют эксайтотоксичности и кальциевой перегрузке (Ben-Ari 2001, 2008), а также нейровоспалению (Bernardino et al., 2005; Vezzani et al., 2008). **В свою очередь, гибель определенной популяции тормозных интернейронов или аномальная регенерация возбуждающих нейронов может приводить к хронической эпилепсии за счет потери нормального торможения и разрастания (спраутинга) новых отростков возбуждающих нейронов (Wasterlain, Shirasaka, 1994).**

Гибель нейронов при эпилепсии связывают с их длительным возбуждением в ходе реализации судорожной активности в мозге. Уже давно было известно, что пересечение возбуждающих путей, таких как перфорантный путь (Ben-Ari et al., 1980) или мшистые волокна (Nadler, Cuthbertson, 1980), приводило к уменьшению повреждений в гиппокампе вследствие судорог. Кроме того, морфологическая картина отравлений аналогами глутамата (домоевой кислотой) аналогична той, что наблюдается в гиппокампе при ЭВД (Lowenstein, 2001). Действительно, при судорогах происходит массивный выброс глутамата, который запускает избыточный ток кальция в постсинаптические нейроны через каналные NMDA-рецепторы (Ben-Ari, 2001). **Это приводит к активации внутриклеточных протеаз и нейрональной синтазы оксида азота, генерации свободных радикалов и повреждению клеточных мембран, структурных белков и важнейших ферментов. При вызванной судорогами гибели нейронов реализуются механизмы запрограммированной гибели, в частности, активация p53, семейства белков Bcl-2, индуцированного эндонуклеазой расщепления ДНК (Fujikawa, 2005).** Таким образом, апоптогические сигнальные пути участвуют в гибели нейронов в результате судорог, однако класси-

ческая апоптотическая гибель не обязательно имеет место (Henshall, Murphy, 2008). Митохондрии тесно связаны с путями, ведущими к гибели нейронов в участках эпилептогенеза (Kunz, 2002). Следует отметить, что, как и окислительный стресс, митохондриальная дисфункция может быть как следствием, так и причиной судорожной активности (Patel, 2002). Уже в 80-е годы прошлого века было обнаружено, что судорожная активность сопровождается накоплением кальция в митохондриях дендритов пирамидных нейронов гиппокампа, что ведет к их набуханию и, в конечном счете, к разрушению (Evans et al., 1984). Набухание митохондрий – непереносимое условие клеточного повреждения, и если такое состояние длится долго, происходит нарушение кальциевого гомеостаза и гибель клетки (Mitchell, Cotran, 1997).

Из многочисленных экспериментов Б.С. Мелдрам сделал заключение, что судорожная активность, которая длится более 30 минут, вызывает острую некротическую гибель нейронов в чувствительных структурах мозга. Такая гибель является следствием избытка кальция в митохондриях и последующего энергетического истощения, а также свободнорадикального повреждения (Meldrum, 2002). С помощью электронномикроскопического ультраструктурного анализа, Р.С. Словитер (Sloviter et al., 1996) выявили, что в ответ на длительное возбуждение ПП в нейронах поля СА4 гиппокампа появляются признаки некроза с ранней эндоплазматической вакуолизацией.

Позже исследователи обратили внимание на возможность участия апоптоза в гибели нейронов, вызванной судорожной активностью (Roux et al., 1999; Bengzon et al., 2002; Henshall et al., 2002). **Так, признаки апоптоза были выявлены в гранулярных клетках зубчатой извилины после судорог (Sloviter et al., 1996; Covolan et al., 2000).** Интересно отметить, что апоптоз в нейронах был выявлен уже после однократного эпизода непродолжительной судорожной активности (Bengzon et al., 1997). Было показано, что эпизод кратковременной судорожной активности без моторных судорог вызывает появление нейронов с апоптотическими признаками билатерально в зубчатой извилине, в то время как после выраженных судорог обнаруживаются погибающие нейроны с признаками некроза и апоптоза (Bengzon et al., 2002). **По мнению (Wasterlain et al., 2002), тип гибели нейронов при эпилептическом статусе в основном (но не исключительно) некротический у взрослых, а в более раннем возрасте намного чаще проявляется апоптоз.** Однако вызванный судорогами некроз имеет ряд биохимических черт апоптоза с ранним выходом цитохрома из митохондрий и активацией каспазы.

Среди возможных механизмов, предположительно вовлеченных в гибель нейронов в эпилептическом мозге, интересно также отметить версию aberrантного клеточного цикла («митотической катастрофы»). Имеются данные, свидетельствующие в пользу того, что нейроны с высоким риском нейродегенерации также отличаются способностью к ре-инициации клеточного цикла, включая экспрессию белков клеточного цикла и репликацию ДНК. Потеря способности зрелых нейронов регулировать (подавлять) клеточный цикл может быть причиной одних нейродегенеративных заболеваний и конечным общим путем других (Herrup et al., 2004; Herrup, Jang, 2007). Первое свидетельство наличия aberrантного клеточного цикла в мозге больных височной эпилепсией было получено в работе (Nagy, Esiri, 1998),

продемонстрировавшей наличие в гиппокампе пациентов с ЭВД высокой ядерной экспрессии циклина В, сопровождавшейся экспрессией в цитоплазме нейронов, связанной с гибелью белка Вах. Активация клеточного цикла при ЭВД подтверждается и данными (Guekht et al., 2010), показавшими экспрессию в нейронах белков фазы G2 клеточного цикла (циклина В1 и циклин-зависимой киназы Cdc2), а также маркера пролиферации PCNA в образцах гиппокампа пациентов с ЭВД. При этом отмечалось появление двухъядерных нейронов. Эти находки были интерпретированы как свидетельство нарушений клеточного цикла, ассоциированных с гибелью нейронов гиппокампа. Наличие неапоптотической (TUNEL-негативной) гибели нейронов, сопровождавшейся экспрессией белков клеточного цикла, было подтверждено на моделях ЭВД на животных. Х.Б. Келлер с сотрудниками (Koeller et al., 2008) показали, что экспрессия циклина D1 может делать гиппокампаальные нейронные сети более чувствительными к отдельным эпиприлептогенным агентам и эксайтотоксической гибели. Большинство поврежденных клеток в гиппокампе животных после kindlinga, вызванного пентилентетразолом, были циклин-В1-позитивными, при этом не выявлено экспрессии других маркеров клеточного цикла или TUNEL-позитивных («апоптотических») ядер. Поврежденные нейроны также экспрессировали циклин-зависимую киназу 2, что позволяет предположить участие в гибели нейронов активного комплекса CDK2/циклин В1 (Pavlova et al., 2006a). Связь реинициации клеточного цикла и нейрональной гибели косвенно подтверждается также данными (Timsit et al., 1999), показавшими, что экспрессия мРНК циклина D1 после каинатных судорог в полях CA1 и CA3 достигала максимума непосредственно перед конденсацией хроматина и фрагментацией ДНК.

Эпилептические судороги вызывают повышение секреции нейротрофинов и их про-форм, а также увеличение экспрессии неспецифического рецептора p75(NTR). В то же время, известно, что секретируемые предшественники нейротрофинов могут вызывать апоптозоподобную гибель нейронов через рецептор p75. Таким образом, одним из триггеров нейродегенерации при судорогах может быть изменение нейротрофического микроокружения нейронов (Friedman, 2010).

Как в экспериментальных моделях судорожной активности, так и при эпилепсии у человека продемонстрирована экспрессия в глии провоспалительных цитокинов, признака нейровоспаления (Bernardino et al., 2005; Vezzani et al., 2008). Экспериментальные данные, подтвержденные клиническими наблюдениями, позволяют предположить, что нейровоспаление может быть общим фактором, участвующим или предрасполагающим к развитию судорог и гибели клеток при разных формах эпилепсии различной этиологии. Медиаторы воспаления могут изменять возбудимость нейронов и влиять на выживание клеток путем активации транскрипционных и посттрансляционных внутриклеточных путей (Vezzani et al., 2008).

Еще одним характерным проявлением морфологических изменений ткани мозга при эпилепсии является постнатальный нейрогенез в герминативных областях мозга (Gulyaeva, 2010). Эпилепсия дает яркий пример aberrантного нейрогенеза, который лежит в основе aberrантной пластичности мозга и участвует в формировании нервных сетей эпилептического мозга. Несмотря на то что данные об изменении нейрогенеза при эпилепсии у человека и в эксперименте остаются проти-

воречивыми (Siebzehnruhl, Blumcke, 2008), очевидно, что судорожная активность влияет на выраженность и паттерн нейрогенеза, при этом эффект в значительной степени зависит от типа судорог (Hattiangady et al., 2004; Yang et al., 2008; Kuruba et al., 2009).

Используя пилокарпиновую модель эпилептического статуса, Дж.М. Парент с сотрудниками (Parent et al., 1997, 1998) показали, что продолжительные судорожные разряды стимулируют нейрогенез гранулярных клеток зубчатой извилины в зрелом мозге и впервые предположили, что пластичность гиппокампальных нервных сетей, связанная с эпилептогенезом, может быть следствием aberrantных связей, сформированных вновь образованными гранулярными клетками. Экспериментальный эпилептический статус стимулирует эндогенные клетки-предшественники нейронов, находящиеся в зубчатой извилине и субвентрикулярной зоне взрослых грызунов, и происходит образование большего числа гранулярных клеток зубчатой фасции и обонятельных интернейронов, соответственно (Parent et al., 1997; Parent, Valentin, 2002; Parent, Murphy, 2008). Е. Накагава с коллегами (Nakagawa et al., 2000) использовали две модели эпилепсии на крысах (введение каиновой кислоты и электрический kindling) и обнаружили, что вновь возникшие гранулярные клетки могут участвовать в реорганизации нейронных сетей, происходящей при эпилептогенезе. Сходное усиление нейрогенеза было отмечено при судорогах, вызванных электроконвульсивным шоком, т.е. усиление нейрогенеза может быть общим ответом на судорожную активность (Scott et al., 2000). При этом, по-видимому, ранние этапы эпилептогенеза отличаются по своему влиянию на интенсивность образования новых нейронов от хронической эпилепсии. В частности, было показано, что начальные этапы пентилентетразолового kindlingа могут сопровождаться снижением пролиферации клеток-предшественников в герминативных областях взрослого мозга, тогда как дальнейшее прогрессирование судорожной активности приводит к усилению нейрогенеза (Aniol et al., 2009, 2011). Дж. Парк с соавторами (Park et al., 2006) предполагают, что вызванный судорогами нейрогенез не является вторичным следствием гибели нейронов, а скорее представляет собой независимый эффект повторяющихся эпилептических судорог. Постнатальный нейрогенез при судорогах характеризуется рядом особенностей, отличающих его от нормального нейрогенеза во взрослом мозге. К их числу можно отнести атипичную миграцию гранулярных клеток в хилус зубчатой извилины, избыточное ветвление их аксонов (мшистых волокон) и образование возвратных коллатералей в молекулярный слой (спраутинг), изменение мембранных характеристик (Sharfman, 2002). Стоит отметить, что в первое время после встраивания в работающую нервную сеть молодые нейроны гранулярного слоя обладают пониженным порогом возбуждения, обусловленного помимо измененного набора мембранных каналов также и тем, что тормозные интернейроны еще не успевают образовать с ними связей (Kempermann, 2012). Увеличенная популяция молодых гранулярных нейронов при судорогах может, таким образом, быть субстратом для повышенной возбудимости гиппокампа и, в свою очередь, обуславливать эксайтотоксическую гибель нейронов, задействованных в длительной передаче возбуждения. Последующая гибель самих патологически измененных молодых нейронов и активация процессов нейровоспаления

в герминативной зоне гиппокампа может определять наблюдаемое при длительно текущей эпилепсии истощение пролиферативной популяции гранулярного слоя.

Таким образом, соотношение процессов нейродегенерации и эпилептогенеза не представляется таким простым, как это предполагается в парадигме эксайто-токсического повреждения. Существующие данные позволяют предположить, что нейродегенерация и связанные с ней процессы aberrантного нейрогенеза и нейровоспаления могут вносить свой вклад в прогрессирование судорожной активности при эпилепсии и участвовать в формировании патологически измененного эпилептического мозга. Одним из перспективных подходов для исследования возможного участия гибели нейронов в эпилептогенезе может быть исследование эффектов однократного («первого») судорожного приступа на моделях. Эта работа в настоящее время проводится авторами статьи и их коллегами в лаборатории функциональной биохимии нервной системы ИВНДиНФ РАН. В частности, показано, что даже однократный приступ вызывает медленно развивающиеся нарушения когнитивных функций у грызунов (Aniol et al., 2013), при этом происходит развитие воспалительных процессов в мозге, в частности активация микроглии. Достоверное выявление нарушений, вызванных однократным судорожным эпизодом, может дать ключ к пониманию патогенеза эпилептических расстройств.

Литература

- Aniol V.A., Яковлев А.А., Степаничев М.Ю., Лазарева Н.А., Гуляева Н.В. Развитие пентилентетразолового киндлинга у крыс сопровождается увеличением экспрессии даблкортина в гиппокампе // Нейрохимия. 2009. Вып. 26. № 3. С. 208-212.
- Попова М.С., Аниол В.А., Лазарева Н.А., Степаничев М.Ю., Гуляева Н.В. Нейродегенеративные изменения в полях гиппокампа крыс в ходе развития пентилентетразолового киндлинга // Морфология. 2012. Вып. 142. № 4. С. 25-30.
- Aniol V.A., Stepanichev M.Yu., Lazareva N.A., Gulyaeva N.V. An early decrease in cell proliferation after pentylentetrazole-induced seizures // Epilepsy Behav. 2011. Vol. 22. № 3. P. 433-441.
- Aniol V.A., Ivanova-Dyatlova A.Y., Keren O., Guekht A.B., Sarne Y., Gulyaeva N.V. A single pentylentetrazole-induced clonic-tonic seizure episode is accompanied by a slowly developing cognitive decline in rats // Epilepsy Behav. 2013. Vol. 26. № 2. P. 196-202.
- Annegers J.F. Epidemiology genetics of epilepsy // Neurol. Clin. 1994. Vol. 12. № 1. P. 15-29.
- Babb T.L., Brown W.J., Pretorius J., Davenport C., Lieb J.P., Crandall P.H. Temporal lobe volumetric cell densities in temporal lobe epilepsy // Epilepsia. 1984. Vol. 25. P. 729-740.
- Ben-Ari Y. Cell death and synaptic reorganizations produced by seizures // Epilepsia. 2001. Vol. 42. Suppl 3. P. 5-7.
- Ben-Ari Y. Epilepsies and neuronal plasticity: for better or for worse? // Dialogues Clin Neurosci. 2008. Vol. 10. P. 17-27.
- Ben-Ari Y., Tremblay E., Ottersen O.P., Meldrum B.S. The role of epileptic ctivity in hippocampal and «remote» cerebral lesions induced by kainic acid // Brain Res. 1980. Vol. 191. P. 79-97.
- Bengzon J., Kokaia Z., Elmer E., Nanobashvili A., Kokaia M., Lindvall O. Apoptosis and proliferation of dentate gyrus neurons after single and intermittent limbic seizures // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1997. Vol. 94. P. 10432-10437.
- Bengzon J., Mohapel P., Ekdahl C.T., Lindvall O. Neuronal apoptosis after brief and prolonged seizures // Prog. Brain Res. 2002. Vol. 135. P. 111-119.
- Berg A.T., Testa F.M., Levy S.R., Shinnar S. The epidemiology of epilepsy. Past, present and future // Neurol. Clin. 1996. Vol. 14. № 3. P. 383-398.

- Bernardino L., Ferreira R., Cristóvão A.J., Sales F., Malva J.O. Inflammation and neurogenesis in temporal lobe epilepsy // *Curr Drug Targets CNS Neurol. Disord.* 2005. Vol. 4. № 4. P. 349-360.
- Blümcke I., Kistner I., Clusmann H. et al. Towards a clinico-pathological classification of granule cell dispersion in human mesial temporal lobe epilepsies // *Acta Neuropathol.* 2009/ Vol. 117. P. 535-544.
- Briellmann R.S., Newton M.R., Wellard R.M., Jackson G.D. Hippocampal sclerosis following brief generalized seizures in adulthood // *Neurology.* 2001. Vol. 57. P. 315-317.
- Covolan L., Smith R.L., Mello L.E. Ultrastructural identification of dentate granule cell death from pilocarpine-induced seizures // *Epilepsy Res.* 2000. Vol. 41. P. 9-21.
- Dam A.M. Epilepsy and neuron loss in the hippocampus // *Epilepsia.* 1980. Vol. 21. P. 617-629.
- De Lanerolle N.C., Kim J.H., Robbins R.J., Spencer D.D. Hippocampal interneuron loss and plasticity in human temporal lobe epilepsy // *Brain Res.* 1989. Vol. 495. P. 387-395.
- De Lanerolle N.C., Brines M.L., Williamson A., Kim J.H., Spencer D.D. Neurotransmitters and their receptors in human temporal lobe epilepsy // *The Dentate Gyrus and Its Role in Seizures.* Eds. C.E. Ribak, C.M. Gall, I. Mody. Amsterdam: Elsevier Science Publishers B.V, 1992. P. 235-250.
- De Lanerolle N.C., Kim J.H., Brines M.L. Cellular and molecular alterations in partial epilepsy // *Clin Neurosci.* 1994. Vol. 2. P. 64-81.
- De Lanerolle N.C., Kim J.H., Williamson A et al. A retrospective analysis of hippocampal pathology in human temporal lobe epilepsy: Evidence for distinctive patient subcategories // *Epilepsia.* 2003. Vol. 44. P. 677-687.
- Duncan J.S. MRI studies. Do seizures damage the brain? // *Prog. Brain Res.* 2002. Vol. 35. P. 253-261.
- Evans M.C., Griffiths T., Meldrum B.S. Kainic acid seizures and the reversibility of calcium loading in vulnerable neurons in the hippocampus // *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 1984. Vol. 10. P. 285-302.
- Fahrner A., Kann G., Flubacher A. et al. Granule cell dispersion is not accompanied by enhanced neurogenesis in temporal lobe epilepsy patients // *Exptl. Neurol.* 2007. Vol. 203. P. 320-332.
- Franke H., Kittner H. Morphological alterations of neurons and astrocytes and changes in emotional behavior in pentylenetetrazol-kindled rats // *Pharmacol. Biochem. Behav.* 2001. Vol. 70. P. 291-303.
- Frantseva M.V., Velazquez J.L., Hwang P.A., Carlen P.L. Free radical production correlates with cell death in an in vitro model of epilepsy // *Eur. J. Neurosci.* 2000. Vol. 12. P. 1431-1439.
- Friedman W.J. Proneurotrophins, seizures, and neuronal apoptosis // *Neuroscientist.* 2010. Vol. 16. № 3. P. 244-252.
- Fuerst D., Shah J., Shah A., Watson C. Hippocampal sclerosis is a progressive disorder: a longitudinal volumetric MRI study // *Ann. Neurol.* 2003. Vol. 53. P. 413-416.
- Fujikawa D.G. Prolonged seizures and cellular injury: understanding the connection // *Epilepsy Behav.* 2005. Vol. 7. Suppl. 3. P. S3-S11.
- Guekht A., Gulyaeva N., Stepanenko A. et al. Neuronal binucleation and cyclin expression in human temporal lobe epilepsy // *AES 64th Annual Meeting & 3rd Biennial North American Regional Epilepsy Congress. Abstracts.* 2010. 2.007.
- Gulyaeva N.V. Aberrant neurogenesis in adult epileptic brain: compensatory or pathologic? // *Neurochem. J.* 2010. Vol. 4. P. 84-89.
- Haas C.A., Dudeck O., Kirsch M. et al. Role for reelin in the development of granule cells dispersion in temporal lobe epilepsy // *J. Neurosci.* 2002. Vol. 22. P. 5797-5802.
- Hattiangady B., Rao M.S., Shetty A.K. Chronic temporal lobe epilepsy is associated with severely declined dentate neurogenesis in the adult hippocampus // *Neurobiol. Dis.* 2004. Vol. 17. № 3. P. 473-490.
- Henshall D.C., Murphy B.M. Modulators of neuronal cell death in epilepsy // *Curr. Opin. Pharmacol.* 2008. Vol. 8. № 1. P. 75-81.
- Henshall D.C., Skradski S.L., Meller R. et al. Expression and differential processing of caspases 6 and 7 in relation to specific epileptiform EEG patterns following limbic seizures // *Neurobiol. Dis.* 2002. Vol. 10. P. 71-87.
- Herrup K., Yang Y. Cell cycle regulation in the postmitotic neuron: oxymoron or new biology? // *Nat. Rev. Neurosci.* 2007. Vol. 8. № 5. P. 368-738.
- Herrup K., Neve R., Ackerman S.L., Copani A. Divide and die: cell cycle events as triggers of nerve cell death // *J. Neurosci.* 2004. Vol. 24. № 42. P. 9232-9239.
- Isokawa M. Preservation of dendrites with the presence of reorganized mossy fiber collaterals in hippocampal dentate granule cells in patients with temporal lobe epilepsy // *Brain Res.* 1997. Vol. 744. P. 339-343.

- Kempermann G.* Youth culture in the adult brain // *Neuroscience*. 2012. Vol. 335. P. 1175-1176.
- Kim J.H.* Pathology of epilepsy // *Exp. Mol. Pathol.* 2001. Vol. 70. P. 345-367.
- Kim J.H., Guimaraes P.O., Shen M-Y., Masukawa L.M., Spencer D.D.* Hippocampal neuronal density in temporal lobe epilepsy with and without gliomas // *Acta Neuropathol.* 1990. Vol. 80. P. 41-45.
- Koeller H.B., Ross M.E., Glickstein S.B.* Cyclin D1 in excitatory neurons of the adult brain enhances kainate-induced neurotoxicity // *Neurobiol. Dis.* 2008. Vol. 31. № 2. P. 230-241.
- Kunz W.S.* The role of mitochondria in epileptogenesis // *Curr. Opin. Neurol.* 2002. Vol. 15. № 2. P. 179-184.
- Kuruba R., Hattiangady B., Shetty A.K.* Hippocampal neurogenesis and neural stem cells in temporal lobe epilepsy // *Epilepsy Behav.* 2009. Vol. 14. Suppl 1. P. 65-73.
- Lawson J.A., Vogrin S., Bleasel A.F., Cook M.J., Bye A.M.* Cerebral and cerebellar volume reduction in children with intractable epilepsy // *Epilepsia.* 2000. Vol. 41. P. 1456-1462.
- Lowenstein D.H.* Structural reorganization of hippocampal networks caused by seizure activity // *Int. Rev. Neurobiol.* 2001. Vol. 45. P. 209-236.
- Lukoyanov N.V., Sa M.J., Madeira M.D., Paula-Barbosa M.M.* Selective loss of hilar neurons and impairment of initial learning in rats after repeated administration of electroconvulsive shock seizures // *Exp. Brain Res.* 2004. Vol. 154. P. 192-200.
- Margerison J.H., Corsellis J.A.N.* Epilepsy and the temporal lobes // *Brain.* 1966. Vol. 89. P. 499-530.
- Meldrum B.S.* First Alfred Meyer Memorial Lecture. Epileptic brain damage: a consequence and a cause of seizures // *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 1997. Vol. 23. P. 185-201.
- Meldrum B.S.* Do preclinical seizure models preselect certain adverse effects of antiepileptic drugs // *Epilepsy Res.* 2002. Vol. 50. P. 33-40.
- Miller S.P., Li L.M., Cendes F., Tasch E., Andermann F., Dubeau F., Arnold D.L.* Medial temporal lobe neuronal damage in temporal and extratemporal lesional epilepsy // *Neurology.* 2000. Vol. 54. P. 1465-1470.
- Mitchell R.N., Cotran R.S.* Cell injury, death and adaptation // *Basic Pathology*. Eds. V. Kumar, R.S. Cotran, S.L. Robbins. Toronto: W.B. Saunders Company, 1997. P. 3-24.
- Nadler J.V., Cuthbertson G.J.* Kainic acid neurotoxicity toward hippocampal formation: dependence on specific excitatory pathways // *Brain Res.* 1980. Vol. 195. P. 47-56.
- Naegele J.R.* Neuroprotective strategies to avert seizure-induced neurodegeneration in epilepsy // *Epilepsia.* 2007. Vol. 48. Suppl. 2. P. 107-117.
- Nagy Z., Esiri M.M.* Neuronal cyclin expression in the hippocampus in temporal lobe epilepsy // *Exp. Neurol.* 1998. Vol. 150. № 2. P. 240-247.
- Nakagawa E., Aimi Y., Yasuhara O., Tooyama I., Shimada M., McGeer P.L., Kimura H.* Enhancement of progenitor cell division in the dentate gyrus triggered by initial limbic seizures in rat models of epilepsy // *Epilepsia.* 2000. Vol. 41. № 1. P. 10-18.
- Parent J.M., Murphy G.G.* Mechanisms and functional significance of aberrant seizure-induced hippocampal neurogenesis // *Epilepsia.* 2008. Vol. 49. Suppl. 5. P. 19-25.
- Parent J.M., Yu T.W., Leibowitz R.T. et al.* Dentate granule cell neurogenesis increased by seizures and contributes to aberrant network reorganization in the adult rat hippocampus // *J. Neurosci.* 1997. Vol. 17. № 10. P. 3727-3738.
- Parent J.M., Janumpalli S., McNamara J.O., Lowenstein D.H.* Increased dentate granule cell neurogenesis following amygdala kindling in the adult rat // *Neurosci. Lett.* 1998. Vol. 247. № 1. P. 9-12.
- Parent J.M., Valentin V.V., Lowenstein D.H.* Prolonged seizures increase proliferating neuroblasts in the adult rat subventricular zone-olfactory bulb pathway // *J. Neurosci.* 2002. Vol. 22. № 8. P. 3174-3188.
- Park J.H., Cho H., Kim H., Kim K.* Repeated brief epileptic seizures by pentylenetetrazole cause neurodegeneration and promote neurogenesis in discrete brain regions of freely moving adult rats // *Neuroscience.* 2006. Vol. 140. № 2. P. 673-684.
- Patel M.N.* Oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and epilepsy // *Free Radic. Res.* 2002. Vol. 36. № 11. P. 1139-1146.
- Pavlova T., Stepanichev M., Gulyaeva N.* Pentylenetetrazole kindling induces neuronal cyclin B1 expression in rat hippocampus // *Neurosci. Lett.* 2006a. Vol. 392. № 1-2. P. 154-158.
- Pavlova T.V., Yakovlev A.A., Stepanichev M.Yu., Gulyaeva N.V.* Pentylenetetrazol kindling in rats: Is neurodegeneration associated with manifestations of convulsive activity? // *Neurosci. Behav. Physiol.* 2006b. Vol. 36. P. 741-748.

- Pitkanen A., Nissinen J., Lukasiuk K. et al.* Association between the density of mossy fiber sprouting and seizure frequency in experimental and human temporal lobe epilepsy // *Epilepsia*. 2000. Vol. 41. № 6. P. S24-S29.
- Roux P.P., Colicos M.A., Barker P.A., Kennedy T.E.* p75 neurotrophin receptor expression is induced in apoptotic neurons after seizure // *J. Neurosci*. 1999. Vol. 19. P. 6887-6896.
- Scharfman H.E.* Epilepsy as an example of neural plasticity // *Neuroscientist*. 2002. Vol. 8. № 2. P. 154-173.
- Scott B.W., Wojtowicz J.M., Burnham W.M.* Neurogenesis in the dentate gyrus of the rat following electroconvulsive shock seizures // *Exp. Neurol*. 2000. Vol. 165. № 2. P. 231-236.
- Siebzehnrbul F.A., Blumcke I.* Neurogenesis in the human hippocampus and its relevance to temporal lobe epilepsies // *Epilepsia*. 2008. Vol. 49. Suppl. 5. P. 55-65.
- Sirven J.I.* Classifying seizures and epilepsy: a sunopsis // *Semin. Neurol*. 2002. Vol. 22. № 3. P. 237-246.
- Sloviter R.S.* Decreased hippocampal inhibition and a selective loss of interneurons in experimental epilepsy // *Science*. 1987. Vol. 235. P. 73-76.
- Sloviter R.S.* Permanently altered hippocampal structure, excitability, and inhibition after experimental status epilepticus in the rat: The «dormant basket cell» hypothesis and its possible relevance to temporal lobe epilepsy // *Hippocampus*. 1991. Vol. 1. P. 41-66.
- Sloviter R.S., Dean E., Sollas A.L., Goodman J.H.* Apoptosis and necrosis induced in different hippocampal neuron populations by repetitive perforant path stimulation in the rat // *J. Comp. Neurol*. 1996. Vol. 366. P. 516-533.
- Sutula T.P., Pitkanen A.* More evidence for seizure-induced neuron loss: is hippocampal sclerosis both cause and effect of epilepsy? // *Neurology*. 2001. Vol. 57. P. 169-170.
- Sutula T.P., Hagen J., Pitkanen A.* Do epileptic seizures damage the brain? // *Curr. Opin. Neurol*. 2003. Vol. 16. № 2. P. 189-195.
- Timsit S., Rivera S., Ouaghi P., Guischarde F. et al.* Increased cyclin D1 in vulnerable neurons in the hippocampus after ischaemia and epilepsy: a modulator of in vivo programmed cell death? // *Eur. J. Neurosci*. 1999. Vol. 11. № 1. P. 263-278.
- Vezzani A., Ravizza T., Balosso S., Aronica E.* Glia as a source of cytokines: implications for neuronal excitability and survival // *Epilepsia*. 2008. Vol. 49. Suppl. 2. P. 24-32.
- Wasterlain C.G., Niquet J., Thompson K.W. et al.* Seizure-induced neuronal death in the immature brain // *Prog. Brain Res*. 2002. Vol. 135. P. 335-53.
- Wasterlain C.G., Shirasaka Y.* Seizures, brain damage and brain development // *Brain Dev*. 1994. Vol. 16. № 4. P. 279-295.
- Yang F., Wang J.C., Han J.L., Zhao G., Jiang W.* Different effects of mild and severe seizures on hippocampal neurogenesis in adult rats // *Hippocampus*. 2008. Vol. 18. № 5. P. 460-468.
- Zaveri H.P., Duckrow R.B., de Lanerolle N.C., Spencer S.S.* Distinguishing subtypes of temporal lobe epilepsy with background hippocampal activity // *Epilepsia*. 2001. Vol. 42. P. 725-730.

Механизмы участия глутаматных рецепторов в патогенезе судорожных состояний и перспективы фармакологических воздействий

Л.Г. Магазаник, А.В. Зайцев, К.Х. Ким, Н.Я. Лукомская

Содержание

1. Введение
2. Общая структура ионотропных глутаматных рецепторов
 - 2.1. NMDA рецепторы
 - 2.2. AMPA рецепторы
3. Возможности и перспективы фармакологии ионотропных глутаматных рецепторов
4. Применение блокаторов ионотропных рецепторов при модели острых пентилентетразоловых судорог у крыс линии Вистар и крыс линии Крушинского–Молодкиной
 - 4.1. Противосудорожное действие антагонистов NMDA и кальций-проницаемых AMPA рецепторов при использовании модели максимального электрошока у крыс
 - 4.2. Морфофункциональные изменения в поле CA1 гиппокампа крыс при использовании пентилентетразоловой и литий-пилокарпиновой моделей судорожных состояний
 - 4.3. Применение блокаторов ионотропных рецепторов при пентилентетразоловом киндлинге
5. Заключение

1. Введение

Эпилепсия относится к группе наиболее распространенных нервных болезней человека (4–10 случаев на 10000 населения) (Forsgren et al., 2005; Sander, 2003). Эпилепсия создает существенную нагрузку как на больного, так и на общество, поскольку периодически возникающие судорожные приступы сопровождаются психическими нарушениями разной степени тяжести, отрицательно сказываются на когнитивных функциях, ведут к потере работоспособности и ранней смерти. Не менее одного припадка в течение жизни возникают у 5% населения, а у 20–30% больных эпилепсией заболевание является пожизненным. Все это приводит к тому, что экономические потери, связанные с эпилепсией, достигают 0,5% от общих затрат человечества на преодоление болезней (De Boer et al., 2008). Значительную

Сокращения: КМ – крысы линии Крушинского-Молодкиной; ПК – литий-пилокарпиновая модель; ПТЗ – пентилентетразол; ALS – амиотрофический боковой склероз; CI-AMPA – Ca-непроницаемые AMPA рецепторы; CP-AMPA – Ca-проницаемые AMPA рецепторы; FCD – фокальная корковая дисплазия; iGluR – ионотропные глутаматные рецепторы; TSC – туберозный склероз.

часть этих сумм составляет стоимость противоэpileптических лекарств, которые больной вынужден принимать на протяжении всей жизни.

Этиология, патогенез и клиника эpileпсии являются предметом огромного числа мультидисциплинарных исследований (около 150 000 ссылок на публикации содержатся в базе данных Pubmed). Одна из важнейших целей исследований состоит в выявлении механизмов развития эpileпсии и в создании эффективных лекарственных технологий, позволяющих ослабить судорожные проявления и снизить частоту их возникновения, поскольку каждый очередной припадок усугубляет дальнейшее течение болезни и повышает риск полной потери работоспособности больного.

Идеология поиска противоэpileптических средств состоит в выявлении молекулярных мишеней для потенциальных лекарств, которое становится возможным по мере накопления наших знаний о природе нарушений нервных функций, ведущих к эpileптизации мозга (Rogawski, Loscher, 2004). Одним из условий прогресса в этой области являются взаимосвязанные исследования по обоим направлениям. Синтез и тестирование нового эpileптического агента позволяют сразу же использовать его в качестве инструмента исследования молекулярных механизмов, патологические изменения которых приводят к возникновению судорожного синдрома (Striano, Striano, 2009).

Среди потенциальных мишеней для лекарственного воздействия рассматриваются ионотропные глутаматные рецепторы (iGluR), представляющие собой семейство управляемых глутаматом каналов (Dingledine et al., 1999, Traynelis et al., 2010). Главная функция глутаматных рецепторов – это участие в передаче возбуждающих стимулов в нервных сетях мозга. iGluR имеют олигомерное строение, что обеспечивает существование большого числа подтипов и изоформ рецепторов и тем самым участие в реализации множества важнейших функций нервной системы, таких как быстрая передача дискретных возбуждающих сигналов, синаптическая пластичность, обучение, память, образование схемы синаптических связей в процессе развития мозга, модуляция функций ансамбля синаптических рецепторов, различающихся по модальности и др. Обширная вовлеченность глутаматных рецепторов в нормальную деятельность мозга обуславливает количественные и качественные изменения их функции при возникновении патологических процессов, в частности, ведущих к появлению судорог и сопутствующих симптомов эpileпсии (Bowie, 2008). Главное внимание при дальнейшем изложении будет уделено роли iGluR в возникновении судорожных проявлений, поскольку они составляют основу эpileпсии и ее многочисленных подвидов (Urbanska et al., 1998; Rogawski, Loscher, 2004).

Нарушения глутаматергической передачи, обнаруживаемые при анализе патогенетических механизмов длинного списка неврологических нарушений, можно разделить на два основных вида. В качестве критерия подобного деления можно принять уровень механизма, на котором может быть выявлено нарушение функции iGluR. К первой, наиболее изученной, группе относятся непосредственные следствия гиперфункции глутамата, вызванные повышенной секрецией глутамата из пресинаптических терминалей, задержкой присутствия свободного глутамата в синаптической щели и в ближайшем внесинаптическом пространстве. Это может

не сопровождается патологическими изменениями молекулярной структуры самих рецепторов. В постсинаптических нейронах такая ситуация вызывает патологический комплекс, называемый эксайтотоксичностью (Rothman, Olney, 1987; Dong et al., 2009). Ключевым этапом развития комплекса является увеличенное поступление ионов кальция и цинка в цитозоль через каналы избыточно активируемых глутаматных рецепторов. Это дает начало дисфункции целого ряда внутриклеточных процессов, приводящих в итоге к апоптозу и гибели нейронов. Важнейшим из таких процессов можно считать активирующее действие повышенной концентрации кальция внутри клетки на протеазы, киназы, эндонуклеазы, липооксигеназы, фосфолипазы и другие внутриклеточные ферменты, что вкупе вызывает критические изменения метаболизма, нарушает работу митохондрий и синтез энергетического субстрата – АТФ. Оксидативный стресс и дисфункция митохондрий рассматриваются в качестве основных факторов гибели нейронов, вызванной частыми эпилептическими припадками (Chang, Yu, 2010). Участие в ряде подобных процессов сопутствующих изменений генетического аппарата нервной клетки приводит к долговременной и часто необратимой патологии – нейродегенеративным заболеваниям (Doble, 1999; Dong et al., 2009).

Ко второй группе механизмов участия ионотропных глутаматных рецепторов в патологических процессах следует отнести генетически обусловленные изменения их молекулярной структуры. В этих случаях роль глутаматных рецепторов может быть прослежена уже при анализе этиологии нервных заболеваний (Bowie, 2008).

Проблема предупреждения и лечения патологических следствий гипер- или гиподисфункции глутаматергической передачи может решаться только при использовании мультидисциплинарного подхода. Важным условием начала интенсивных усилий по разработке этой проблемы явились успехи в клонировании основных субъединиц iGluR (Hollmann et al., 1989; Hollmann, Heinemann, 1994). Это послужило исходной позицией для выяснения деталей молекулярного строения субъединиц, исследования связи между строением и механизмами функции iGluR, выявления их вовлеченности в конкретные синаптические связи в нервных сетях мозга как с помощью электрофизиологических подходов и методов, так и путем количественной оценки экспрессии субъединиц и ее связи с изменениями функции. В свою очередь, все это способствовало значительному увеличению арсенала новых синтезируемых органических соединений, взаимодействующих с iGluR и используемых в качестве инструментов исследования проблемы (Fletcher, Lodge, 1996; Bolshakov et al., 2000, 2003, 2005; Магазаник и др., 2000; Kew, Kemp, 2005; Paoletti, Neyton, 2007; Тихонов, Магазаник, 2010). Причем в отличие от предыдущего этапа развития фармакологии глутаматергической синаптической передачи трактовка результатов обрела структурную базу. Появились обоснованные молекулярные модели iGluR, при построении которых были использованы данные кристаллографии сначала калиевого, а затем и глутаматных каналов, и результаты детального исследования взаимодействия избирательных блокаторов с открытыми каналами глутаматных рецепторов AMPA и NMDA типов (Madden, 2002; Tikhonov, 2007; Sobolevsky et al., 2009; Sobolevsky, 2013). Стали широко применяться под-

ходы, позволяющие выявлять путем мутагенеза ключевые аминокислоты. Накапливающиеся знания о нормальном строении и функции глутаматных рецепторов служат необходимой основой для выявления их роли в патологических процессах, появления сведений об изменениях их субъединичного состава, уровня экспрессии, локализации в компонентах нервных сетей (главные нейроны, интернейроны, глиальные клетки). Особо следует отметить значение этих знаний для разработки фармакологии iGluR, создания лекарственных веществ, применяемых в клинической практике.

2. Общая структура ионотропных глутаматных рецепторов

Семейство ионотропных глутаматных рецепторов включает три основных субсемейства: NMDA, AMPA и каинатное, получивших название в соответствии с избирательными для каждого из них агонистами (Dingledine et al., 1999). В данной работе мы рассмотрим только NMDA и AMPA рецепторы. iGluR представляет собой гетеромерный белковый комплекс из 4 субъединиц, формирующих ионный канал. Набор субъединиц специфичен для каждого из субсемейств (Traynelis et al., 2010). Субъединицы iGluR имеют общий тип строения: это полипептидная цепь (>900 аминокислотных остатков в каждой), имеющая три трансмембранных домена и внутримембранную петлю. Положение этой петли позволяет отнести семейство iGluR к суперсемейству S-loop каналов, которое представлено в основном **Na, K и Ca каналами, в отличие от другого суперсемейства Cys-loop ионных каналов**, к которому принадлежит большинство ионотропных синаптических рецепторов (никотиновый холинорецептор, рецептор ГАМК, глициновый, серотониновый 5-HT₃ рецепторы). Внеклеточный N-конец полипептидной цепи формирует участок связывания глутамата, определяющий фармакологическую избирательность субсемейств. Ансамбль внутримембранных доменов формирует канал, ионную пору, прорывающую плазматическую фосфолипидную мембрану клетки. Строение и положение внутриклеточного С-конца определяет локализацию и продолжительность экспонирования рецептора в конкретных участках плазматической мембраны, благодаря его нековалентному взаимодействию с якорными и транспортными белками (scaffolding and trafficking proteins) (Traynelis et al., 2010).

2.1. NMDA рецепторы

Тетрамер NMDA рецептора состоит из пары GluN1 субъединиц и пары GluN2 субъединиц, относящихся к одному из 4 типов: GluN2A, GluN2B, GluN2C или GluN2D. **Одновременное взаимодействие комедиатора глицина с GluN1 и глутамата с GluN2 является по существу непременным условием активации iGluR и перехода канала NMDA рецептора в открытое состояние**, поскольку в отсутствие глицина активность глутамата падает на два порядка. Следующими по значимости

эффективными природными факторами, определяющими уникальные функциональные свойства NMDA рецепторов, можно считать (1) относительно высокую проницаемость для ионов Ca^{2+} и (2) потенциалзависимую блокаду открытого канала ионами магния (Traynelis et al., 2010). Зависимость амплитуды тока, протекающего через открытый канал активированного NMDA рецептора, от разности потенциала на мембране клетки в присутствии ионов магния во внеклеточной среде имеет выраженный нелинейный характер. В результате при потенциале на мембране около уровня потенциала покоя активация NMDA рецептора агонистами не приводит к току через канал, т.к. он заблокирован ионами магния. Только выраженная деполяризация нейрона способна устранить магниевую блокаду, открыть путь ионам Ca^{2+} в цитоплазму и запустить комплекс присущих ему физиологических и патологических процессов. Значимость этих особенностей NMDA рецептора для функции зависит от его субъединичного состава. Присутствие в тетрамере рецептора GluN2A или GluN2B обеспечивает более высокое сродство канала к ионам магния в области ионного фильтра, чем у рецепторов, содержащих GluN2C или в особенности GluN2D субъединицу (Kotermanski, Johnson, 2009). Сходная зависимость наблюдается в ряду GluN2 субъединиц при сравнении подверженности NMDA рецепторов процессу десенситизации: $A > B > C > D$. Эти различия в строении рецепторов сказываются на их функциональных особенностях. NMDA рецепторы, содержащие GluN2A, активируются при более глубокой деполяризации мембраны, а возникающие ВПСТ спадают существенно быстрее, чем в случае GluN2C или GluN2D. Распределение этих подтипов рецепторов в разных отделах нервной системы неравномерно, к тому же уровень экспрессии тех или иных GluN2 субъединиц может зависеть от изменений функционального состояния, в особенности вызванных патологическим процессом (Bowie, 2008).

Все ионные каналы плазматической мембраны, включая iGluR, могут являться объектами разнообразных модулирующих влияний как эндогенной, так и фармакологической природы. Молекулярными мишенями для модулирующих агентов служат специфические участки полипептидных цепей субъединиц iGluR. Существуют эндогенные факторы (спермин, ионы цинка, повышение концентрации протонов, стероиды), способные модулировать NMDA рецепторы, действуя на наружный фрагмент GluN2 субъединиц. Объектами эффективной модификации в результате фосфорилирования являются внутренние фрагменты субъединиц NMDA рецепторов. В этих процессах участвуют протеинкиназы PKC, PKA и *src*-киназы. В результате фосфорилирования–дефосфорилирования меняются такие свойства NMDA рецепторов, как участие в механизмах долговременной синаптической потенциации депрессии, десенситизации, формировании действующих рецепторов из набора субъединиц, их локализации и продолжительности экспонирования в определенных местах поверхности нейронов, поскольку взаимодействие с внутриклеточными белками подложки (scaffolding proteins) тоже регулируется путем фосфорилирования (Traynelis et al., 2010).

NMDA рецепторы играют важную роль в инициации судорог и их распространении. Этим объясняется эффективность блокаторов NMDA рецепторов в качес-

тве противосудорожных агентов как в экспериментах *in vitro*, так и *in vivo* (Kohl, Dannhardt, 2001; Ghasemi, Schachter, 2011; Rogawski, 2011). NMDA антагонисты с различным молекулярным механизмом действия (каналоблокаторы, неконкурентные и конкурентные антагонисты) позволяют предотвратить возникновение судорог при использовании разных моделей: электрошока (Parsons et al., 1995; Mazarati, Wasterlain, 1999), широкого набора хемоконвульсантов (Geter-Douglass, Witkin, 1999; Mares, Mikulecka, 2009; Ким и др., 2012), линейных крыс, генетически предрасположенных к судорогам (Ватаев и др., 2009; Лукомская и др., 2012).

2.2. AMPA рецепторы

Основная функция AMPA рецепторов состоит в генерировании быстрого ВПСП, амплитуда которого достаточна (за счет большого числа одновременно активируемых глутаматом рецепторов) для генерации потенциала действия. Подобно NMDA рецепторам они представлены тетрамерами, образованными двумя парами субъединиц из набора **GluA1, GluA2, GluA3 или GluA4**, но в отличие от NMDA рецепторов могут существовать и гомомерные AMPA рецепторы (кроме тетрамеров из одних GluA2 субъединиц). Все они имеют сходный с субъединицами NMDA общий план строения и топологию в мембране: внеклеточный домен, содержащий N-конец и формирующий участок связывания с глутаматом, три трансмембранных домена и внутримембранная петля. C-конец полипептидной цепи входит в состав внутриклеточного домена (Traynelis et al., 2010).

Важным структурным отличием GluA2 субъединицы от остальных является замена глутамина (Q) на аргинин (R) во внутримембранной петле, что приводит к появлению положительно заряженной группировки, экспонированной в просвет канала. Это существенным образом влияет на функциональные свойства AMPA рецепторов, содержащих пару **GluA2 субъединиц**. Они практически теряют кальциевую проницаемость, снижается их проводимость и предотвращается возможность их блокады как цитоплазматическими аминами при положительных значениях мембранного потенциала, так и органическими катионами (Cull-Candy et al., 2006). Тем не менее, глутаматные рецепторы, содержащие пару GluA2, преобладают в большинстве отделов мозга (Isaac et al., 2007) и большинство популяций нейронов (пирамидные нейроны коры и гиппокампа, клетки Пуркиньи мозжечка, гигантские нейроны стриатума, мотонейроны) в нормальных физиологических условиях экспрессирует только содержащие GluA2 AMPA рецепторы.

Важнейшим функциональным отличием AMPA рецепторов, лишенных GluA2, является выраженная, хотя и более низкая, чем у NMDA рецепторов, кальциевая проницаемость (Isaac et al., 2007). Таким образом, глутамат способен управлять входом ионов кальция в нейроны через два типа синаптических рецепторных каналов: NMDA (только в условиях деполяризации) и лишенные GluA2 Ca-проницаемые AMPA (CP-AMPA), проводимость которых не зависит от мембранного потенциала. Вторым по функциональной значимости отличием CP-AMPA от Ca-непрони-

цаемых AMPA (CI-AMPA) рецепторов можно считать их более высокую проводимость, т.е. для генерации ВПСП равной амплитуды активировуется меньшее число CP-AMPA, чем CI-AMPA рецепторов.

Как уже было отмечено выше, большинство популяций нейронов экспрессирует только CI-AMPA рецепторы, обеспечивающие передачу деполяризационных сигналов с короткими временами нарастания и спада. Эта задача не требует одновременного увеличения кальциевой проводимости, более того, массивное повышение внутриклеточной концентрации Ca^{2+} могло бы приводить к неблагоприятным последствиям. Необходимую дополнительную функцию регулируемого входа Ca^{2+} в этих нейронах выполняют NMDA рецепторы. Однако существуют нейроны, преимущественно экспрессирующие CP-AMPA рецепторы. Это прежде всего тормозные ГАМК-ергические интернейроны (Isaac et al., 2007; Liu, Zukin, 2007). CP-AMPA рецепторы сочетают способность участвовать в генерации ВПСП и тем самым в генерации потенциалов действия, и вместе с NMDA рецепторами обеспечивать кратковременное поступление ионов Ca^{2+} в цитоплазму (Wang, Gao, 2010). Образующийся кальциевый транзистент ограничен по амплитуде и длительности наличием в этих клетках повышенного содержания кальций-связывающих белков (парвальбумин, кальбиндин или кальретинин), выполняющих роль буфера (Markram et al., 2004).

Выявленные механизмы регуляции процесса экспрессии GluA2 субъединицы служат убедительным примером динамического характера субъединичного состава синаптических рецепторов (Isaac et al., 2007; Liu, Zukin, 2007). Обнаружено, что уровень экспрессии CP-AMPA рецепторов нейронами взрослых животных может меняться в зависимости от активности и функционального состояния синапсов. Так, блокада синаптической активности в культуре или переживающих срезах мозга в присутствии тетродотоксина, высокой концентрации ионов K^+ , блокаторов AMPA или NMDA рецепторов приводит к повышению экспрессии CP-AMPA рецепторов (Ju et al., 2004; Thiagarajan et al., 2005; Cull-Candy et al., 2006; Sutton et al., 2006), и наоборот, высокочастотная стимуляция снижает представительство CP-AMPA рецепторов в синапсах звездчатых клеток мозжечка (Liu, Cull-Candy, 2000, 2002). Получены данные, что при развитии долговременной потенциации в постсинаптическую мембрану первоначально встраиваются CP-AMPA рецепторы, которые в дальнейшем заменяются на CI-AMPA рецепторы (Plant et al., 2006). Процессы забывания также требуют специфического участия CP-AMPA рецепторов (Clem, Huganir, 2010). Таким образом, CP-AMPA рецепторы представляют собой динамичный пул, вовлеченный во множество нормально протекающих физиологических процессов.

При обсуждении проблемы, которой посвящен настоящий обзор, важны сведения о значительном изменении экспрессии GluA2 субъединицы, вызванной различными патологическими, в том числе и судорожными состояниями. Например, в пирамидных клетках гиппокампа, которые в норме содержат в основном CI-AMPA рецепторы, вскоре после наступления судорожного состояния массово появляются CP-AMPA рецепторы (Ekonomou et al., 2001; Rajasekaran et al., 2012). К этому приво-

дит убыль (downregulation) GluA2-содержащих рецепторов. Происходит индукция репрессора транскрипции, который запускает процесс деацетилирования гистонов, физически связанных с промотором GluA2. Возникает экспрессия новых рецепторов, уже лишенных GluA2 (Dingledine et al., 1999), что приводит к увеличенному поступлению Ca^{2+} в цитоплазму. Противоположное по знаку явление наблюдается при высокочастотной стимуляции синаптических входов в ГАМК-ергический интернейрон мозжечка, у которого в нормальных условия исходно высока плотность CP-AMPA рецепторов. Через некоторое время после периода такой стимуляции начинается их убыль, индуктором которой является повышение внутриклеточной концентрации Ca^{2+} (Liu, Cull-Candy, 2002; Cull-Candy et al., 2006).

Временная шкала патологических процессов, вызванных изменениями уровня экспрессии GluA2, у взрослых животных весьма широка: от часов до месяцев. Они могут начинаться с острых явлений, таких как ишемия или судорожные припадки. По мере исследования проблемы расширяется список нейродегенеративных заболеваний и нарушений развития мозга, в патогенезе которых заметную роль играют CP-AMPA рецепторы (см. обзоры: Pellegrini-Giampietro et al., 1997; Doble, 1999; Kwak, Weiss, 2006; Liu, Zukin, 2007; Bowie, 2008). К ним относятся разные по этиогенезу и проявлениям формы эпилепсии (детская, травматическая, туберозный склероз (TSC) фокальная корковая дисплазия (FCD), синдром Расмуссена и др.), болезни Альцгеймера и Паркинсона, шизофрения, амиотрофический боковой склероз (ALS), синдром аутизма, последствия инсульта, синдром ломкой X-хромосомы (Мартина-Белла), глиобластома, последствия наркомании и хронического алкоголизма. В большинстве перечисленных заболеваний изменения экспрессии GluA2 в ту или другую сторону и соответственно появление или убыль CP-AMPA рецепторов не могут рассматриваться как первичный или ведущий патогенетический фактор, однако важные функциональные следствия этих изменений должны приниматься во внимание исследователями в качестве возможного пути воздействия на течение самих заболеваний. В качестве одного из наиболее очевидных путей можно рассматривать избирательную фармакологическую блокаду каналов CP-AMPA рецепторов.

Одновременно возникает новое направление исследований. Необходимо не только находить функциональные следствия участия CP-AMPA рецепторов в патогенезе большого числа заболеваний нервной системы. Использование молекулярно-генетических подходов помогает выявлять патогенетические пути, которые приводят к увеличению популяции CP-AMPA рецепторов в определенных типах нейронов, у которых в нормальных физиологических условиях они содержатся в минорных количествах или полностью отсутствуют. Это может происходить за счет подавления экспрессии GluA2 субъединицы и тогда появляются AMPA рецепторы, сформированные только набором GluA1, GluA3 или GluA4. Механизмы процесса репрессии уже известны и ведутся поиски его индуктора. Очевидно, существует и другой патологический механизм. Это «недоредактирование» GluA2 субъединицы, у таких ущербных GluA2 не произошла замена глутамина на аргинин, что обнаруживается у больных боковым амиотрофическим синдромом (ALS) и при некоторых последствия инсульта (Kwak, Weiss, 2006).

3. Возможности и перспективы фармакологии ионотропных глутаматных рецепторов

Непосредственное участие ионотропных глутаматных рецепторов в патогенезе многих заболеваний ЦНС делает их привлекательной мишенью для избирательного фармакологического воздействия с целью предупреждения и купирования патологических процессов, в том числе и судорожных состояний (Kleinrok et al., 1995; Kohl, Dannhardt, 2001; Kew, Kemp, 2005; Ghasemi, Schachter, 2011; Dorandeu et al., 2013).

Очевидная множественность нозологических форм эпилепсии человека диктует необходимость использования и сопоставления разнообразных экспериментальных моделей судорожных состояний, вызываемых у животных (Loscher, 2011; Dhir, 2012; White, 2012). В роли конвульсантов, т.е. воздействий, провоцирующих транзиторное (судорожный припадок) или длительное рецидивирующее судорожное состояние, используются разные по механизму действия химические агенты (введение глутамата и его агонистов, пентилентетразола (ПТЗ), пилокарпина, ареколина, пикротоксина, снижение в среде концентрации магния) или электрическая стимуляция разных отделов мозга, электрошок, дозированная компрессия мозга. В зависимости от интенсивности и длительности воздействия возникают повышенная судорожная готовность и/или активный судорожный очаг, выявляемые с помощью неврологического наблюдения за экспериментальным животным, регистрации электрической активности в разных структурах и нервных сетях мозга и морфологического исследования.

С помощью моделей оценивается лечебный или профилактический эффект исследуемых противосудорожных веществ. Экспериментальные воздействия могут быть применены однократно в относительно большой дозе, с тем чтобы вызвать выраженный судорожный припадок, способный привести к отставленному летальному исходу. Либо то же воздействие, но пороговое или подпороговое по интенсивности, применяется многократно с достаточно длительными интервалами. В результате у животных повышается чувствительность к агенту, вызывающему судороги (киндлинг). Киндлинг имитирует состояние судорожной готовности, наблюдаемое у больных в период, предшествующий очередному эпилептическому припадку (см. обзоры: Coulter et al., 2002; Loscher, 2002, 2011; Morimoto et al., 2004). Одним из наиболее часто используемых агентов для моделирования киндлинга является ПТЗ. В основе его судорожного действия лежит угнетающее влияние на освобождение и постсинаптическое действие ГАМК (Corda et al., 1992; Huang et al., 2001; Dhir, 2012). При этом растормаживаются возбуждающие синаптические механизмы, опосредованные активацией глутаматных рецепторов. Существуют многочисленные сведения о способности антагонистов рецепторов NMDA типа подавлять развитие судорожных проявлений ПТЗ киндлинга у мышей и крыс (Loscher, 2002, 2011; Лукомская и др., 2005; Traynelis et al., 2010; Ghasemi, Schachter, 2011). При моделировании ПТЗ киндлинга обнаруживаются также морфологические и гистохимические изменения нейронов (Franke, Kittner, 2001; Wong et al., 2003; Павлова и др., 2005; Aniol et al., 2011; Попова и др., 2012). Пока не вполне ясно, являются ли

судороги непосредственной причиной этих изменений и всегда ли эти изменения свидетельствуют о дегенерации нейронов и их гибели.

4. Применение блокаторов ионотропных рецепторов при модели острых пентилентетразоловых судорог у крыс линии Вистар и крыс линии Крушинского–Молодкиной

Среди различных моделей эпилепсии значительный интерес представляет повышенная судорожная готовность, обусловленная генетическими факторами. Так, генерализация рефлекторной реакции на звуковой стимул свойственна 10–15% популяции лабораторных крыс линии Вистар (Семиохина и др., 2006). Путем селекции были получены инбредные линии крыс, обладающих высокой (достигающей 100%) аудиогенной судорожной готовностью, например крысы линий КМ (Крушинского–Молодкиной) (Семиохина и др., 2006), GEPR (Genetically Epilepsy-Prone Rat) (Consroe et al., 1979; Faingold, 1988), IGER (Ihara's Genetically Epileptic Rat) (Takahashi et al., 1997), WAR (Wistar Audiogenic Rat) (Garcia-Cairasco, 2002; Francois et al., 2008; Doretto et al., 2009). Эти крысы отвечают на звуковой стимул клонико-тоническим судорожным припадком, напоминающим приступ эпилепсии человека (Faingold, 1988; Семиохина и др., 2006).

В опытах на крысах линии Крушинского–Молодкиной (КМ) с генетической предрасположенностью к аудиогенным судорогам нами были проведены исследования активности блокаторов iGluR в качестве антиконвульсантов. С этой целью за 30–60 мин до подачи звукового раздражителя (синусоидальный тон, 8 кГц, 90 дБ) вводили 5 мг/кг в/м мемантина или ИЭМ-1921. Оценивали влияние на латентный период начального двигательного возбуждения, появление клонических судорог разной степени интенсивности и, наконец, тонических судорог с экстензией конечностей и хвоста, последовательно проявлявшихся в ответ на стандартный звуковой стимул. Максимальный блокирующий эффект по отношению к аудиогенным судорожным проявлениям наблюдался через 30 мин после введения ИЭМ-1921 в дозе 5 мг/кг: у 33,3% (количество животных – n=9) отмечалось полное отсутствие реакции на звук (0 баллов). Усредненная интенсивность припадков составляла $0,7 \pm 0,1$ балла (рис. 1), т.е. почти в 5 раз ниже, чем в контроле ($3,3 \pm 0,1$ балла). Введение крысам дикатионных неконкурентных антагонистов глутамата ИЭМ-1925 и ИЭМ-1754, способных блокировать не только каналы NMDA рецепторов, но и каналы CP-AMPA рецепторов, оказалось полностью неэффективным, несмотря на использование их в широком диапазоне доз. У части животных исследовали действие блокаторов iGluR на электрическую активность мозга в цикле бодрствование–сон и организацию сна. Крысам предварительно вживляли по стереотаксическим координатам электроды для регистрации активности сенсомоторной, зрительной и слуховой коры, гиппокампа, хвостатого ядра и медиального центрального ядра таламуса.

Была обнаружена интересная корреляция между влиянием блокаторов iGluR на параметры аудиогенных судорожных реакций и организацию сна у крыс линии

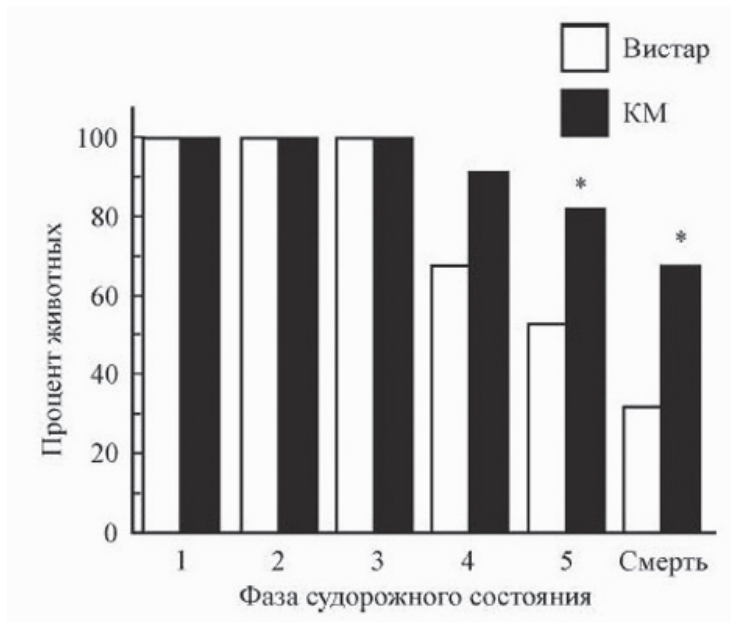


Рис. 1. Распределение крыс линий Вистар (n = 19) и Крушинского-Молодкиной (КМ, n=22) по фазам судорожного припадка, вызванного пентилентетразолом (коразол) 70 мг/кг. Звездочкой отмечены достоверные отличия между крысами линий Вистар и КМ

КМ. Выявленная синхронность и однонаправленность проявлений блокирующего действия блокаторов однозначно свидетельствуют о задействованности глутаматергических синапсов, обладающих NMDA-рецепторами, как в патогенезе аудиогенных эпилептиформных проявлений, так и регуляции функционирования сомногенных систем у крыс этой линии (Ватаев и др., 2009; Лукомская и др., 2012).

Известно, что крысы линии КМ могут на протяжении обычного для крыс линии Вистар периода жизни переносить частые аудиогенные клонико-тонические судорожные припадки. Представлялось интересным исследовать реакцию крыс линии КМ на действие ПТЗ, с тем чтобы оценить, обладают ли они устойчивостью или, наоборот, повышенной чувствительностью к конвульсогенным агентам.

Было проведено сравнение неврологических проявлений действия ПТЗ на крысах линии Вистар и КМ, т.е. выяснение вклада генетически обусловленной аудиогенной судорожной готовности, а также оценка способности блокаторов NMDA рецепторов мемантина и ИЭМ-1921 предупреждать действие ПТЗ у крыс линии КМ.

Экспериментальные судороги вызывали у крыс обеих линий внутривенным введением ПТЗ в дозе 70 мг/кг. Качественных различий в неврологической картине действия ПТЗ на крыс линий Вистар и КМ обнаружено не было. В то же время судорожная готовность, присущая крысам линии КМ, проявилась в том, что у них судорожные проявления были выражены достоверно сильнее, чем у крыс

линии Вистар, и что гибель животных при действии одной и той же дозы ПТЗ наблюдалась в 2,1 раза чаще (см. рис. 1).

Эти результаты послужили основой для проведения следующей части исследования. Ее целью было сопоставление способности двух неконкурентных блокаторов ионотропных глутаматных рецепторов NMDA типа мемантина и ИЭМ-1921 ослаблять судорожные проявления действия ПТЗ у крыс линии КМ. Была выбрана одинаковая доза блокаторов – 5 мг/кг. Блокаторы вводились внутримышечно за 30 мин до введения ПТЗ. Оба блокатора продемонстрировали способность ослаблять судорожную реакцию на введение ПТЗ, но при этом по большинству параметров действие мемантина было крайне слабым. Средняя интенсивность судорожной реакции была такой же, что и в контроле, отмечено лишь достоверное снижение общей длительности генерализованного судорожного припадка и тенденция к снижению гибели крыс после судорожных припадков. Профилактическое действие ИЭМ-1921 было гораздо более выраженным (рис. 2). Средняя интенсивность судорожного припадка уменьшилась почти на 2 балла, а общая длительность генерализованного припадка снизилась в 41 раз. ИЭМ-1921 полностью предотвращал гибель животных, тогда как в результате действия мемантина наблюдалась лишь тенденция к уменьшению смертности (68% в контроле и 50% при введении мемантина). Обращает на себя внимание тот факт, что ИЭМ-1921 проявил выраженный профилактический эффект по отношению к более «тяжелым» фазам судорожной реакции на ПТЗ, а именно – к клонико-тоническому судорожному припадку, оцениваемому 4–5 балами и в значительном числе случаев приводящему к гибели крыс (см. рис. 2). Вероятность появления миоклонических судорог и длительность этого периода практически не отличались от контрольных значений.

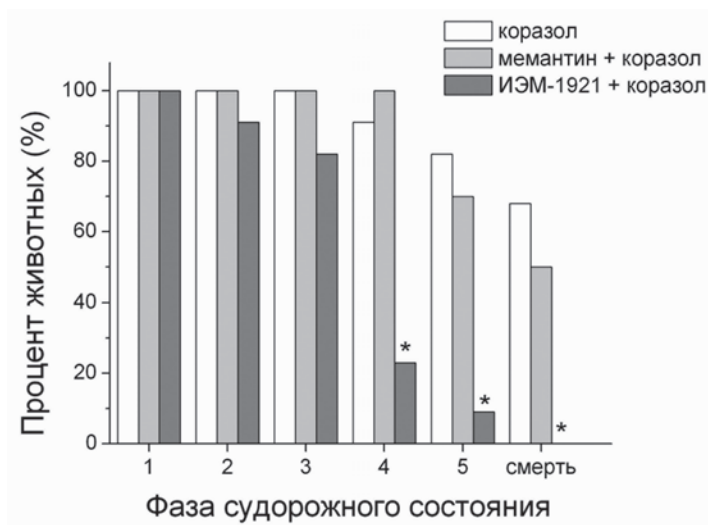


Рис. 2. Распределение крыс линии КМ по фазам судорожного припадка в контроле (n=22), при действии мемантина (n=10) и ИЭМ-1921 (n=22).

Звездочкой отмечены достоверные отличия между контрольной группой крыс и группой, получившей NMDA блокатор

Проведенное исследование на крысах линии Вистар и крысах линии КМ показало, что присущая крысам КМ высокая судорожная готовность значительно усиливает тяжесть судорожных припадков, вызываемых внутривентрикулярным введением ПТЗ. Это соответствует данным, полученным в опытах на крысах других линий, у которых повышена чувствительность к конвульсионному действию звука (Scarlatelli-Lima et al. 2003; Magalhaes et al., 2004; Russo et al., 2004). В наших опытах после введения ПТЗ у крыс линии КМ судороги наступали быстрее и у большей их части по сравнению с крысами линии Вистар достигались «тяжелые» фазы припадка (4 и 5 баллов) с появлением генерализованных клонико-тонических судорог и увеличением гибели (32% Вистар и 68% КМ).

Возникает вопрос, какова природа аддитивности судорожного состояния аудиогенных крыс линии КМ и конвульсионного действия ПТЗ? На уровне каких структур и патогенетических механизмов происходит это взаимодействие? Патогенез аудиогенных судорог у крыс линии КМ не выяснен во всех деталях. Более подробные сведения накоплены о патогенезе аудиогенных судорог у других линий крыс (Ribak, Morin, 1995; Faingold, 1999; Garcia-Cairasco, 2002). Есть основания считать, что в большинстве случаев источником наследственно закрепленной повышенной чувствительности к звуку являются слуховые ядра, в поддержании этого состояния важную роль играют нижние, а затем и верхние бугры четверохолмия, медиальное коленчатое тело и амигдала (Faingold, 1999; Feng, Faingold, 2002; Magalhaes et al., 2004; Семиохина и др., 2006). Кроме этого, у аудиогенных крыс была отмечена некоторая функциональная недостаточность ГАМК-ергической тормозной системы и усиление возбудимости нейронов гиппокампа (Verma-Ahuja et al., 1998, Drumond et al., 2011).

Электроэнцефалографические данные и данные фМРТ показывают, что в генезисе судорог, вызванных ПТЗ, важную роль играет активация передних ядер таламуса и их взаимодействие с корой (Mirski et al., 2003; Brevard et al., 2006). Кроме того, в реализацию миоклонических судорог вовлечены большинство лимбических структур, включая гиппокамп, которые имеют тесные связи с передними ядрами таламуса. ПТЗ вызывает гибель нейронов и глиальных клеток в гиппокампе (Fang, Lei, 2010), демиелинизацию в коре и гиппокампе (You et al., 2011).

Относительное сходство в проявлениях судорожного припадка, вызываемого самим звуковым раздражителем у крыс линии КМ, введением ПТЗ крысам линии Вистар, а также введением ПТЗ крысам линии КМ, может свидетельствовать о принципиальной общности молекулярных механизмов этих патологических реакций.

4.1. Противосудорожное действие антагонистов NMDA и кальций-проницаемых AMPA рецепторов при использовании модели максимального электрошока у крыс

В настоящее время выявлено, что антагонисты AMPA рецепторов обладают более широким спектром противосудорожной активности по сравнению с NMDA антагонистами, например, они более эффективны при киндлинге, чем при острых

судорожных припадках (Rogawski, 2011). В большинстве моделей эпилепсии оказываются эффективными как конкурентные, так и неконкурентные антагонисты AMPA рецепторов. Однако неконкурентные антагонисты имеют преимущество, поскольку их действие не ослабляется избыточной секрецией глутамата в возбуждающих синапсах (Yamaguchi et al., 1993). Противосудорожная активность особой группы неконкурентных антагонистов AMPA рецепторов – веществ, обеспечивающих блокаду открытого канала только одного из подтипов AMPA рецепторов, CP-AMPA рецепторов, до сих пор малоизучена, а полученные данные остаются противоречивыми. Например, выраженный противосудорожный эффект каналоблокаторов AMPA рецепторов этого типа ИЭМ-1925 и ИЭМ-1754 был показан на моделях эпилепсии, вызванных внутрижелудочковым введением агониста AMPA рецепторов каината (Лукомская и др. 2002). При ПТЗ модели эпилепсии максимальный защитный эффект при тонических судорогах наблюдался либо при очень малых дозах этих препаратов – 0,1–1 нМоль/кг, либо при достаточно больших (>10 мкМоль/кг для ИЭМ-1925), однако при любых концентрациях эти препараты были неэффективны против клонических судорог (Лукомская и др., 2002). Эти же блокаторы были неэффективны для предотвращения аудиогенных судорог у крыс линии Крушинского–Молодкиной (Лукомская и др., 2012). В части работ было выявлено, что комбинация антагонистов NMDA и AMPA рецепторов дает более выраженный противосудорожный эффект при использовании существенно меньших доз препаратов (Loscher et al., 1993; Loscher, Honack 1994; Лукомская и др., 2012), однако результаты совместного использования каналоблокаторов NMDA и AMPA рецепторов до сих пор фрагментарны. Поэтому нами были исследованы предполагаемые противосудорожные эффекты блокады CP-AMPA рецепторов, а также комбинации блокады CP-AMPA рецепторов с блокадой NMDA рецепторов. С этой целью оценивалась эффективность действия ИЭМ-1925 при совместном применении с каналоблокатором NMDA рецепторов ИЭМ-1921. Исследования велись на модели максимального электрошока (МЭШ-тест), которая ранее для этой цели не применялась.

В контрольных условиях электростимуляция через ушные электроды вызывала полную экстензию задних конечностей у 97% крыс с латентным периодом $3,2 \pm 0,1$ мс и длительностью $7,8 \pm 0,2$ мс ($n=102$). Предварительное введение каналоблокатора ИЭМ-1925 крысам в диапазоне доз 0,33; 1; 3,3 или 10 мг/кг, у которого выявлена в опытах *in vitro* способность блокировать как CP-AMP-рецепторы, так и NMDA рецепторы, либо введение ИЭМ-1754, селективного каналоблокатора CP-AMPA рецепторов, в дозах 1 или 10 мг/кг не защитило животных от появления интенсивных тонических судорог (рис. 3а), латентный период и длительность экстензии задних конечностей также не уменьшились. Таким образом, ни один из протестированных каналоблокаторов не был способен предотвратить развитие генерализованных тонических судорог, вызванных электрической стимуляцией.

Селективный каналоблокатор NMDA рецепторов ИЭМ-1921 вызывал выраженный дозозависимый противосудорожный эффект (рис. 3б). Дозы препарата 0,33 и 1 мг/кг не обеспечивали животным защиты, хотя и несколько уменьшали длительность тонической экстензии задних конечностей ($8,9 \pm 0,4$ с в контроле, до $7,9 \pm 0,3$ с

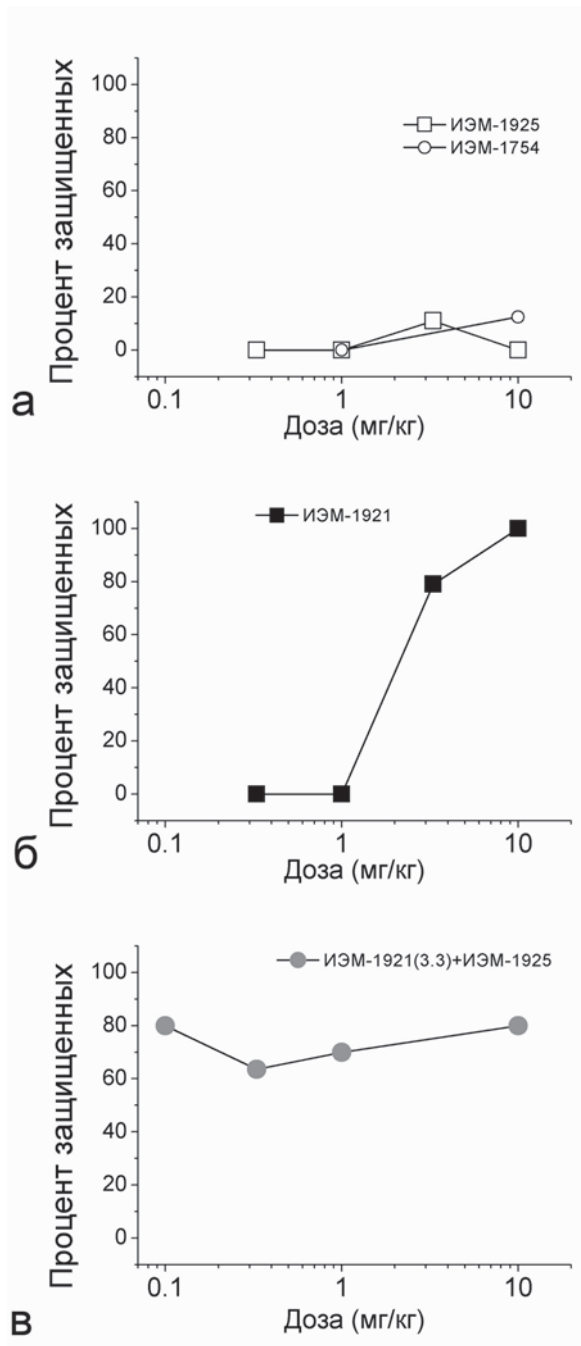


Рис. 3. Превентивный эффект каналоблокаторов Са-проницаемых AMPA рецепторов ИЭМ-1754 и ИЭМ-1925 (а), каналоблокатора NMDA рецепторов ИЭМ-1921 (б) и комбинации ИЭМ-1921 и ИЭМ-1925 (в) в зависимости от дозы

при введении ИЭМ-1921, $n=18$, $p<0,05$, парный t-тест для связанных выборок). При введении 3,3 мг/кг ИЭМ-1921 защищенными от генерализованных тонических судорог оказались 15 из 19 животных, а доза 10 мг/кг обеспечивала 100-процентную защиту. Согласно нашим данным, ЭД50 составила около 2 мг/кг. Эти результаты согласуются с ранее опубликованными данными на мышах, для которых ЭД50=7 мг/кг (Rogawski et al., 1989; Blake et al., 1992).

Также мы проверили противосудорожный эффект комбинации ИЭМ-1921 и ИЭМ-1925 при использовании электросудорожной модели. Во всех сериях опыта доза ИЭМ-1921 составила 3,3 мг/кг, при которой наблюдалась защита от тонических судорог у 79% животных (см. рис. 3б), это давало возможность оценить, как антиконвульсантный, так и проконвульсантный эффекты ИЭМ-1925. Доза добавляемого ИЭМ-1925 в разных сериях составила 0,1; 0,33; 1 и 10 мг/кг. Дополнительное введение ИЭМ-1925 ни в одной из доз значимо не повлияло на процент защищенных животных (рис. 3в). У защищенных от тонических судорог животных наблюдались либо кратковременные клонические судороги, как правило, без потери позы, либо дикий бег. Мы не обнаружили дозозависимого эффекта дополнительного введения ИЭМ-1925 на частоту проявления разных по силе судорожных ответов по сравнению с действием одного ИЭМ-1921. Таким образом, при использовании электросудорожной модели не наблюдалось изменений противосудорожного действия блокатора NMDA рецепторов при одновременном введении с блокатором CP-AMPA рецепторов. В то же время, среди антагонистов, неспецифических к подтипам AMPA рецепторов и обладающих разным механизмом взаимодействия с рецептором, были обнаружены вещества с высокой эффективностью при различных судорожных моделях, в том числе при МЭШ-тесте (Rogawski, 2011). Таким образом, для достижения противосудорожного эффекта, избирательной блокады только каналов CP-AMPA рецепторов недостаточно.

При введении каината в желудочки мозга крыс ИЭМ-1925 и ИЭМ-1754 эффективно предупреждали клонические судороги (ED50=6 и 24 нМоль/кг соответственно), что расценивается как результат блокады Ca-AMPA. В случае внутрижелудочкового введения NMDA эти антагонисты подавляли как «дикий бег», так и клонико-тонические судороги, но для этого требовались уже микромолярные дозы, способные блокировать также и NMDA рецепторы (Лукомская и др., 2002). При использовании ПТЗ модели было показано, что полуэффективная доза ИЭМ-1925 и ИЭМ-1754 для тонического компонента судорог составила 0,1 и 0,2 нМоль/кг соответственно, однако увеличение дозы выше 1 нМоль/кг приводило к парадоксальному снижению противосудорожной эффективности, противосудорожный эффект вновь проявлялся только при достижении микромолярных доз (Лукомская и др., 2005).

Существенные различия в эффективности ИЭМ-1925 и ИЭМ-1754 при разных моделях судорожных состояний усложняют интерпретацию результатов о вкладе CP-AMPA рецепторов в реализацию судорог. Однако следует учесть, что инициация судорог в разных моделях происходит по-разному, а нейронные механизмы реализации генерализованных судорог скорее схожи. Это способно объяснить, почему блокада CP-AMPA рецепторов может предотвратить инициацию лишь неко-

торых форм эпилептической активности. В пользу такой интерпретации свидетельствуют известные данные об особенностях распределения CP-AMPA рецепторов в ЦНС. У взрослых животных эти рецепторы обнаруживаются преимущественно в популяциях бесшипиковых нейронов (Cull-Candy et al., 2006), например, в тормозных ГАМК-ергических интернейронах коры, гигантских холинергических интернейронах стриатума и др. (McBain, Dingledine, 1993; Geiger et al., 1995; Buldakova et al., 1999; Zaitsev et al., 2011). В отличие от интернейронов, пирамидные клетки экспрессируют гораздо меньший процент CP-AMPA рецепторов (Cull-Candy et al., 2006) и потому возбуждающие входы в главные исполнительные нейроны коры, гиппокампа и др. оказываются практически нечувствительными к блокирующему действию исследованных нами каналоблокаторов (Zaitsev et al., 2011). Таким образом, можно предположить, что благодаря избирательной локализации CP-AMPA рецепторов их блокада приводит скорее не к общему снижению возбуждающей синаптической передачи в ЦНС, а к преимущественному ослаблению возбуждения тормозных интернейронов и тем самым может даже благоприятствовать судорожной активности. Ранее в экспериментах *in vitro* мы показали, что использование другого селективного блокатора CP-AMPA рецепторов – ИЭМ-1460 – вызывает ослабление возбуждающих входов в ГАМК-ергические тормозные интернейроны и соответственно ослабление тормозного влияния на исполнительные пирамидные нейроны. Уменьшение вклада этого дисинаптического торможения в функционировании префронтальной коры смещает баланс между торможением и возбуждением в коре в сторону возбуждения (Зайцев и др., 2012).

Важно отметить, что ИЭМ-1925 в опытах *in vitro* на изолированных нейронах при мембранном потенциале покоя и использовании безмагниевого раствора блокирует не только CP-AMPA рецепторы, но и NMDA рецепторы; при этом IC50 для NMDA рецепторов примерно соответствует этому показателю для ИЭМ-1921. В тестах максимального электрошока NMDA антагонисты, как правило, очень эффективны (Loscher, 2002), поэтому отсутствие противосудорожного эффекта ИЭМ-1925 в наших экспериментах поставило вопрос, действует ли ИЭМ-1925 в исследуемых концентрациях на NMDA рецепторы в условиях *in vivo*? Недавние исследования показали, что активность NMDA каналоблокаторов может существенно меняться в зависимости от присутствия ионов Mg^{2+} и уровня мембранного потенциала (Kotermanski, Johnson, 2009; Nikolaev et al., 2012). Так, в присутствии ионов Mg^{2+} и при деполяризации мембраны до 0 мВ, IC50 для ИЭМ-1925 возрастает до 110 ± 20 мкМоль/л, а для ИЭМ-1921 всего лишь до $3,5 \pm 0,4$ мкМоль/л (Nikolaev et al., 2012). Таким образом, в условиях, вероятно, близких к тем, что наблюдаются в мозге при судорожных состояниях, для достижения 50-процентного блока NMDA рецепторов требуется в 30 раз большая концентрация ИЭМ-1925, чем ИЭМ-1921. Отсутствие противосудорожного действия ИЭМ-1925 в наших экспериментах при МЭШ-тесте хорошо согласуется с этими результатами и косвенно подтверждает селективность ИЭМ-1925 к CP-AMPA рецепторам в диапазоне доз от 0,33 до 10 мг/кг.

В данном исследовании мы не обнаружили никаких дополнительных эффектов от введения разных доз ИЭМ-1925 на противосудорожное действие ИЭМ-1921. Ра-

нее было выявлено, что совместное использование малых доз ИЭМ-1925 (0,0001 мкМоль/кг) и ИЭМ-1921 (0,01 мкМоль/кг) существенно замедляет развитие ПТЗ киндлинга у мышей (Лукомская и др., 2005). Синергетическое противосудорожное действие комбинации антагониста NMDA рецепторов мемантина и низкой дозы конкурентного антагониста AMPA рецепторов CNQX было выявлено также при использовании модели электрошокового киндлинга (Loscher et al., 1993; Loscher, Hopack, 1994). Однако дополнительное использование ИЭМ-1925 не усиливало противосудорожное действие ИЭМ-1921 или мемантина в случае аудиогенных судорог у крыс линии Крушинского–Молодкиной (Лукомская и др., 2012).

4.2. Морфофункциональные изменения в поле CA1 гиппокампа крыс при использовании пентилентетразоловой и литий-пилокарпиновой моделей судорожных состояний

Как было описано ранее, фармакологические модели судорожных состояний, воспроизводимых на животных, очень разнообразны и используются для выяснения механизмов, лежащих в основе эпилептогенеза и реализации судорог (Лукомская и др., 2002, 2003, 2012; Loscher, 2011). Часть хемоконвульсантов, например блокатор ГАМК-ергической синаптической передачи ПТЗ, при однократном введении вызывает острый приступ судорог, что влечет за собой некоторые отставленные последствия, не сопровождающиеся возобновлением судорог (Erdogan et al., 2004; Aniol et al., 2011). Другие хемоконвульсанты, такие как агонист мускариновых рецепторов пилокарпин, сразу после введения вызывают у экспериментальных животных эпилептический статус, а после латентного периода, длящегося несколько дней или недель, у этих животных развиваются самопроизвольные судороги (Curia et al., 2008). Так как долговременные поведенческие последствия при использовании пентилентетразоловой (ПТЗ) и литий-пилокарпиновой (ПК) моделей различаются, то можно ожидать наличия специфических морфологических изменений. Однако данные о существовании морфологических различий при применении ПТЗ и ПК моделей до сих пор фрагментарны.

Необходимо различать обратимые изменения в нервной ткани, вызванные судорожным состоянием, и те ранние нарушения, которые ведут к долговременной эпилептизации мозга и могут быть использованы в качестве ранних биомаркеров эпилептогенеза (Engel et al., 2013). Зная специфические биомаркеры, можно использовать их в качестве индикаторов для оценки терапевтического потенциала новых противосудорожных препаратов, в особенности для предсказания их способности предотвращать эпилептогенез. Мы предположили, что при использовании ПТЗ модели морфофункциональные изменения могут иметь, в основном, транзиторный характер, тогда как изменения при ПК модели скорее должны свидетельствовать о перестройках, ведущих к эпилептизации мозга. Целью исследования стало сравнение морфофункциональных характеристик у контрольных и двух групп экспериментальных животных.

Исследование поля CA1 гиппокампа, окрашенного по методу Ниссля, у крыс контрольной группы (n=7), после ПТЗ судорог (n=12) и ПК судорог (n=8) выявило существенные морфологические различия между данными группами. В пирамидном слое гиппокампа крыс через 24 часа после судорог, вызванных ПТЗ, было обнаружено большое количество вытянутых, сморщенных гиперхромных нейронов, характеризующихся потерей тургора ($29,9 \pm 3,5\%$ от общего числа клеток, рис. 4г,д) по сравнению с контролем ($3,1 \pm 1,2\%$, рис. 4б,в). При этом плотность расположения клеток, измеренная по числу клеток на участке пирамидного слоя поля CA1 длиной 1000 мкм, после ПТЗ судорог не изменилась (рис. 5а).

После ПК судорог количество гиперхромных нейронов в гиппокампе крыс не отличалось от контроля ($2,6 \pm 0,5\%$, рис. 5в), однако плотность расположения нейронов пирамидного слоя уменьшилась по сравнению с контролем на 21% (см. рис. 5а). В пирамидном слое обнаружены единичные нейроны в состоянии хроматолиза, характеризующиеся повышенным тургором и лизисом нисслевских глыбок в цитоплазме (рис. 4е,ж). Вокруг таких нейронов, как правило, наблюдалось большое количество глиальных клеток. Нейроны в состоянии хроматолиза практически отсутствовали у крыс контрольной группы и после ПТЗ судорог.

Оценку жизнеспособности нейронов проводили с помощью двух показателей. Во-первых, с помощью иммунофлуоресцентного метода оценивалась экспрессия белка NeuN (Fox3) в нейронах гиппокампа, так как ранее было показано, что этот белок экспрессируется только в нормально функционирующих нейронах (Mullen et al., 1992; Lavezzi et al., 2013). Во-вторых, исследовали активность проапоптотической каспазы-3 в ткани гиппокампа. Было выявлено, что после ПТЗ судорог экспрессия белка NeuN в пирамидном слое поля CA1 гиппокампа наблюдалась во всех нейронах, включая гиперхромные клетки. Общее число NeuN-позитивных нейронов у таких животных не отличалось от такового в контроле (рис. 5б). После ПК судорог наблюдалось снижение числа NeuN-позитивных нейронов в пирамидном слое примерно на 15% (см. рис. 5б). Активность каспазы-3 в ткани гиппокампа не изменялась после ПТЗ судорог, однако возрастала на 60% после ПК (см. рис. 5г).

Полученные результаты свидетельствуют о том, что при ПТЗ модели не происходит гибели нейронов поля CA1 гиппокампа в первые сутки, тогда как при ПК модели убыль нейронов весьма существенна, и этот процесс, по-видимому, продолжается, так как активность каспазы-3 в ткани повышена. Важно отметить, что гиперхроматоз нейронов не является признаком их гибели, так как эти нейроны продолжают экспрессировать белок NeuN.

Судороги могут вызывать повышение внеклеточной концентрации глутамата (Smolders et al., 1997; Meurs et al., 2008; Szyndler et al., 2008), а избыточный глутамат в нервной ткани, в свою очередь, индуцирует увеличение содержания переносчика возбуждающих аминокислот EAAT1 (Duan et al., 1999; Sheldon, Robinson, 2007), поэтому было изучено, как изменяется содержание EAAT1 в ткани гиппокампа при ПТЗ и ПК моделях. В обеих моделях было обнаружено повышение содержания EAAT1 по сравнению с контролем примерно на 40% (рис. 5д).

В настоящей работе впервые выполнено сравнительное исследование комплекса морфофункциональных изменений в гиппокампе крыс при ПТЗ и ПК мо-

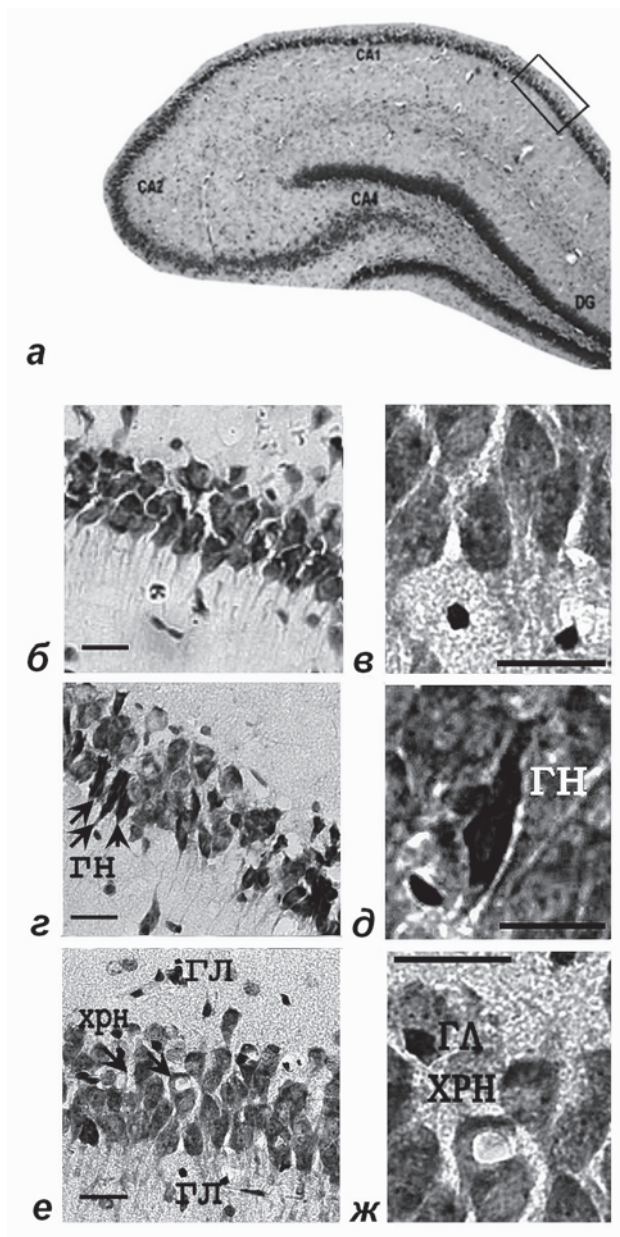


Рис. 4. Нервная ткань поля CA1 дорсального гиппокампа крыс в контроле (б, в) и через 24 часа после введения пентилентетразола (г, д) или пикокарпина (е, ж). Окраска по Нисслю, масштаб 30 мкм
 а – расположение полей гиппокампа крысы, CA1, CA2, CA4, DG – зубчатая извилина, рамкой отмечена область исследования, б – поле CA1 гиппокампа контрольной крысы, в – нейроны в ткани контрольной крысы при большем увеличении, г – гиперхромные нейроны (ГН) в пирамидном слое гиппокампа (отмечены стрелками), д – гиперхромный нейрон (ГН) при большем увеличении, е – нейроны в состоянии хроматолиза (ХРН) в пирамидном слое гиппокампа, ж – нейрон в состоянии хроматолиза (ХРН) и глиальные клетки (ГЛ) при большем увеличении

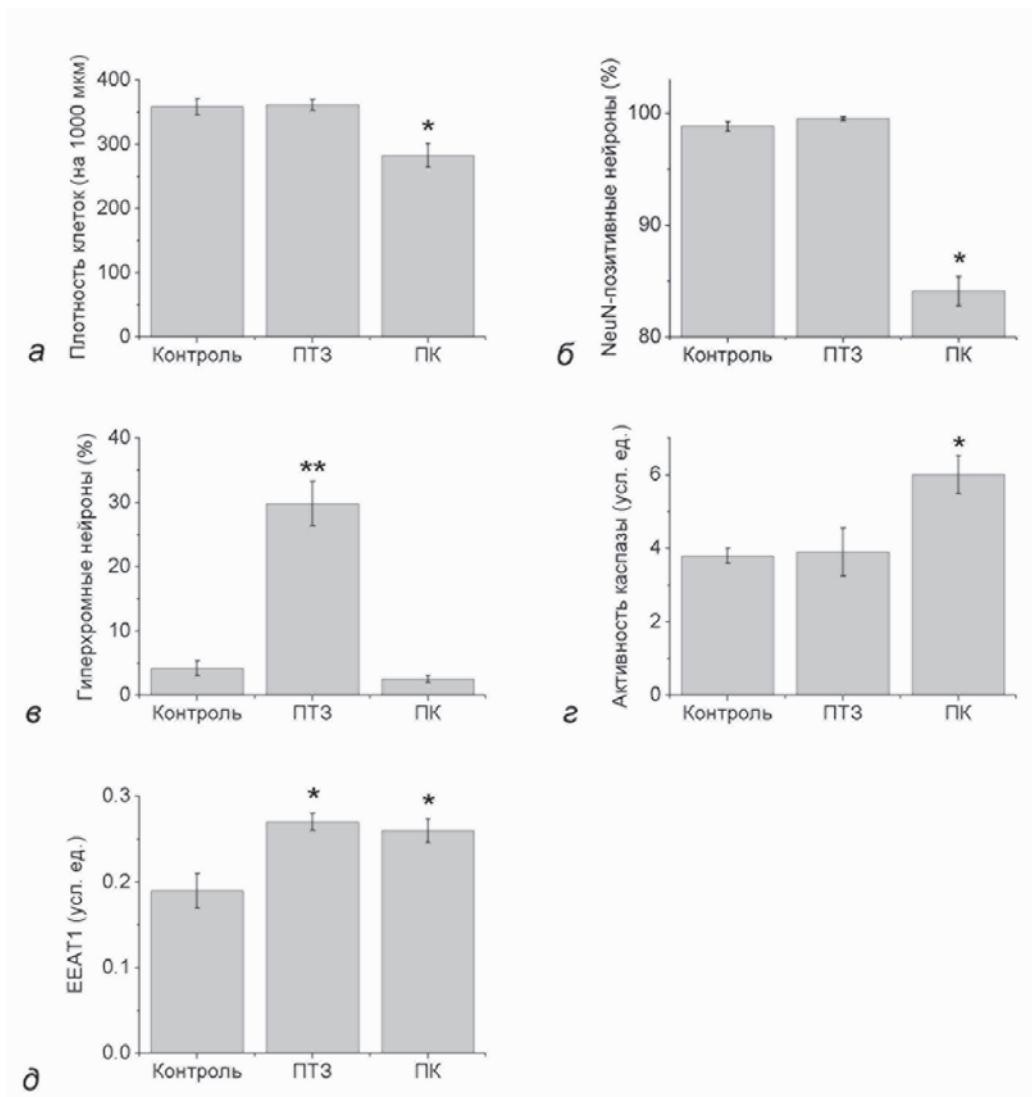


Рис. 5. Морфофункциональные характеристики нервной ткани поля CA1 гиппокампа у группы контрольных крыс (n=7) и крыс после однократного введения пентилентетразола (ПТЗ, n=12) или пилокарпина (ПК, n=8). Достоверность различий с контрольной группой: * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$

а – плотность расположения нейронов в пирамидном слое гиппокампа. По оси ординат – среднее количество нейронов на участке длиной 1000 мкм, б – процент **NeuN-позитивных нейронов от общего** числа нейронов, в – процент гиперхромных нейронов от общего числа нейронов, г – активность каспазы-3 в гомогенате ткани гиппокампа крыс. По оси ординат – разность оптической плотности перед инкубацией и через час после ее начала в условных единицах, д – содержание переносчика возбуждающих аминокислот EAAT1. По оси ординат – отношение оптической плотности полосы EAAT1 к оптической плотности актина

делях судорожных состояний с использованием единой методологии проведения экспериментов и обработки данных. Это позволяет считать, что найденные различия между экспериментальными группами обусловлены специфическими осо-

бенностями молекулярно-клеточных механизмов реализации судорожных состояний в этих моделях. Для сравнительного исследования нами была выбрана область СА1 гиппокампа, так как ранее в этой области были показаны существенные морфологические нарушения при ПК модели у крыс (Fujikawa, 1996). В этом отделе мозга наблюдается как гибель пирамидных клеток, так и отдельных типов интернейронов, интенсивный нейрогенез, изменения типов ветвления дендритных отростков нейронов, нарушения формирования нейронных сетей (Curia et al., 2008). По-видимому, все это ведет к появлению эпилептических очагов. Также следует отметить, что гиппокамп является одним из ключевых отделов мозга, участвующих в реализации судорожных состояний как при ПТЗ (Luttjohann et al., 2009), так и при ПК (Curia et al., 2008) моделях.

Проведенный анализ морфофункциональных изменений в зоне СА1 гиппокампа при судорожных состояниях показал, что изменения делятся на специфические либо для ПК, либо для ПТЗ модели и на те, которые наблюдаются при обеих моделях. Так, мы обнаружили, что в гиппокампе крыс при использовании ПК модели, в отличие от ПТЗ модели и контрольной группы, наблюдаются явные признаки нейродегенерации. Во-первых, уже через 24 часа происходит уменьшение плотности расположения нейронов примерно на 20%, во-вторых, среди оставшихся нейронов около 15% не экспрессируют белок NeuN, а снижение уровня экспрессии этого белка является надежным показателем гибели дифференцированных нейронов (Lavezzi et al., 2013). В-третьих, в ткани гиппокампа крыс при использовании ПК модели наблюдается повышение почти на 60% активности каспазы-3, которая является важным инициатором и регулятором клеточного апоптоза (D'Amelio et al., 2012). Таким образом, полученные данные показывают, что ранние нейродегенеративные изменения в зоне СА1 гиппокампа могут являться важной предпосылкой эпилептизации мозга.

Специфичным для ПТЗ модели было появление большого количества гиперхромных нейронов, тогда как такие нейроны практически полностью отсутствовали в гиппокампе крыс контрольной группы и при использовании ПК-модели. Появление гиперхромных нейронов было показано ранее при изучении электросудорожной и бикукуллиновой моделей эпилепсии (Sloviter 1983; Soderfeldt et al., 1983), а также при ПТЗ модели (Ahmed et al., 2005; Васильев и др., 2013), хотя в некоторых случаях однократное введение судорожных доз ПТЗ не вызывало появления гиперхромных нейронов (Aniol et al., 2011). Гиперхромные нейроны были найдены некоторыми авторами в гиппокампе и при использовании ПК модели (Fujikawa, 1996). В настоящее время гиперхромные нейроны со сниженным тургором обычно рассматриваются не как гибнущие клетки, а как нейроны с временными нарушениями жизнедеятельности, поскольку с большой степенью вероятности они могут восстановить свою функцию (Auer et al., 1985a,b; Csordas et al., 2003). Наши экспериментальные данные согласуются с этими представлениями, так как мы показали способность гиперхромных нейронов экспрессировать белок NeuN, что свидетельствует об их нормальной жизнеспособности. Можно считать, что появление гиперхромных нейронов не является необходимым и достаточным признаком начинающейся эпилептизации мозга.

Природа гиперхромных нейронов до сих пор не ясна, однако предполагается, что их происхождение может быть связано с длительной деполяризацией мембраны, вызванной в том числе избыточной активацией глутаматных рецепторов (Kherani, Auer, 2008). В наших экспериментах при использовании обеих моделей можно было ожидать повышения содержания глутамата в нервной ткани, вызванного судорожной активностью. Литературные данные свидетельствуют о том, что концентрация глутамата действительно повышается в данной области во время судорожной активности (Meurs et al., 2008; Szyndler et al., 2008; Kanamori, Ross, 2011), при этом концентрация глутамата, как правило, выше при судорогах, вызванных блокадой ГАМКергической передачи, то есть при растормаживании (Meurs et al., 2008). Показано, что ПТЗ является антагонистом ГАМК_A рецепторов ($IC_{50}=0,6$ мМоль/л) (Huang et al., 2001), поэтому, вероятно, различия в концентрации глутамата и динамике ее изменений при использовании ПК и ПТЗ моделей являются определяющими для появления гиперхромных нейронов.

О повышении концентрации глутамата в ткани гиппокампа при использовании обеих моделей косвенно свидетельствуют наши данные об увеличении экспрессии переносчика возбуждающих аминокислот EAAT1. Его содержание в глиальных клетках обычно компенсаторно возрастает в ответ на избыток глутамата во внеклеточной среде (Duan et al., 1999; Sheldon, Robinson, 2007; Doi et al., 2009).

Проведенное морфофункциональное сравнительное исследование поля CA1 гиппокампа крыс при использовании ПК и ПТЗ моделей таких сосояний позволило выявить корреляты обратимых изменений в нервной ткани, вызванных судорожным состоянием, таких как появление гиперхромных нейронов и повышенное содержание переносчика возбуждающих аминокислот EAAT1. Также выявлены признаки нейродегенерации при ПК модели: уменьшение плотности расположения клеток, снижение экспрессии белка NeuN, увеличение активности каспазы-3, вероятно, ведущие к долговременной эпилептизации мозга. Эти признаки можно использовать в качестве индикаторов (биомаркеров) для оценки терапевтического потенциала новых противосудорожных препаратов.

4.3. Применение блокаторов ионотропных рецепторов при пентилентеразоловом киндлинге

Целью настоящей части работы было исследование морфологических изменений в нейронах гиппокампа мышей, возникающих в результате киндлинга, и возможной корреляции между способностью блокаторов глутаматных рецепторов NMDA-типа мемантина, ИЭМ-1921 и ИЭМ-1958, предупреждать как судорожные проявления киндлинга, так и сопутствующие морфологические изменения (Васильев и др., 2013). Была использована модель ПТЗ киндлинга, т.е. состояния повышенной судорожной готовности, возникающей в ходе систематических (с интервалом в 2–3 дня) введений подпороговой дозы ПТЗ, блокатора ГАМК-ергической синаптической передачи (Corda et al., 1992; De Sarro et al., 2000; Dhir, 2012).

Исследование возможной корреляции между судорожными проявлениями ПТЗ киндлинга и структурными изменениями нейронов гиппокампа было проведено на пяти группах мышей: (1) интактные мыши; (2) контрольные мыши, которым с целью развития киндлинга по стандартной схеме вводили ПТЗ; (3) мыши, которым вводились 0,3 мг/кг ИЭМ 1921 + ПТЗ; (4) мыши, которым вводились 1 мг/кг ИЭМ-1958 + ПТЗ и (5) мыши, которым вводились 0,5 мг/кг мемантина + ПТЗ.

Первое введение ПТЗ мышам контрольной группы не вызывало судорожных реакций. Лишь слабые подергивания кончиков ушей и вибрисс были отмечены у части животных. Начиная со второго введения, у единичных мышей (10–20% животных) возникали слабо выраженные и непродолжительные клонические судороги. По мере увеличения порядкового номера последовательных введений такой же дозы ПТЗ процент мышей, проявивших судорожные припадки, нарастал, достигая максимума (70%) к 11–12-ому введению (рис. 6). К концу эксперимента у 70% мышей контрольной группы наблюдались клонико-тонические судороги (ср. балл 3,9), а 30% мышей оказались устойчивыми к действию ПТЗ и не судорожили на протяжении всего опыта (ср. балл 0). Общий средний балл у мышей контрольной группы ПТЗ киндлинга составил 2,7.

У экспериментальной группы мышей, которым на протяжении месяца за 30 мин до стандартной подпороговой дозы ПТЗ вводили 0,3 мг/кг ИЭМ-1921, развитие киндлинга существенно замедлилось. У 14 из 20 мышей, взятых в опыт, судорожная реакция полностью отсутствовала после первых 7 введений ПТЗ и постепенно появлялась, начиная с 8-ого введения, устойчивый ПТЗ-киндинг был достигнут лишь к концу эксперимента (12 введений ПТЗ + ИЭМ-1921). У 6 остальных мышей судорожные проявления отсутствовали до конца эксперимента. Средний балл ин-

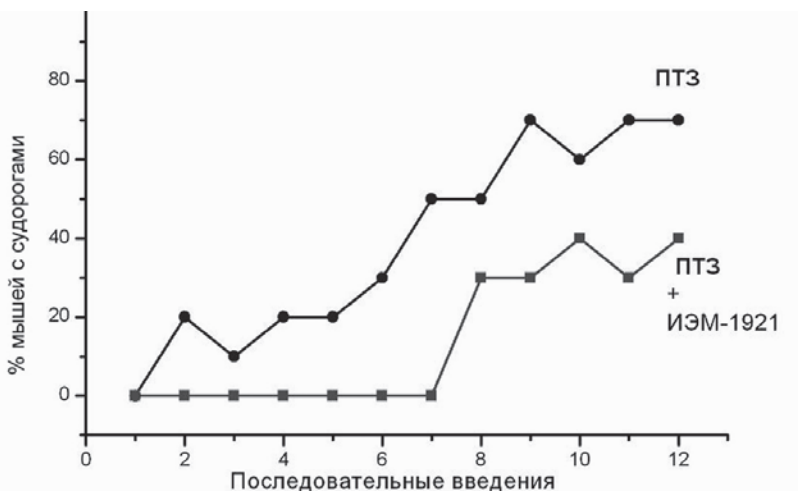


Рис. 6. Влияние блокатора NMDA рецепторов ИЭМ-1921(0.3 мг/кг) на развитие ПТЗ киндлинга у мышей

По оси ординат – процент судорожавших животных в 2 группах из 10 животных каждая. По оси абсцисс – нумерация последовательных введений (3 раза в неделю 35 мг/кг ПТЗ, в/п) – верхняя кривая (контроль); 35 мг/кг ПТЗ + 0,3 мг/кг ИЭМ-1921 (опыт)

тенсивности судорог в группе (ПТЗ+ИЭМ-1921) составил 0,7, т.е. в 3,9 раза ниже, чем в контрольной группе.

Используя аналогичную схему, было проведено исследование другого нового блокатора глутаматных рецепторов NMDA типа, ИЭМ-1958, производного адамантана. У 5 из 8 мышей этой серии ПТЗ киндлинг не развился до конца эксперимента. У остальных 3 мышей первые судорожные припадки силой 2–3 балла появились после 9-ого введения, т.е. профилактическое действие препарата оказалось весьма эффективным. Мемантин был использован в настоящем исследовании как препарат сравнения. При его введении в дозе 0,5 мг/кг у 5 мышей из 8 ПТЗ киндлинг не развился.

В контрольной группе животных киндлинг вызывал существенные структурные изменения пирамидных нейронов поля СА1 гиппокампа. Если у интактных животных в срезах гиппокампа было обнаружено только 0,15% гиперхромных нейронов (рис. 7а,б), то в контрольной группе мышей с выраженными проявлениями ПТЗ киндлинга (присутствие клонико-тонических судорог) были обнаружены выраженные патологические изменения (рис. 7в). В слое stratum pyramidale поля СА1 гиппокампа содержалось большое количество гиперхромных нейронов ($24,7 \pm 2,1\%$). У них наблюдались следующие изменения – потеря тургора, сморщивание и уменьшение размеров клеток, искривление дендритных отростков. Часть

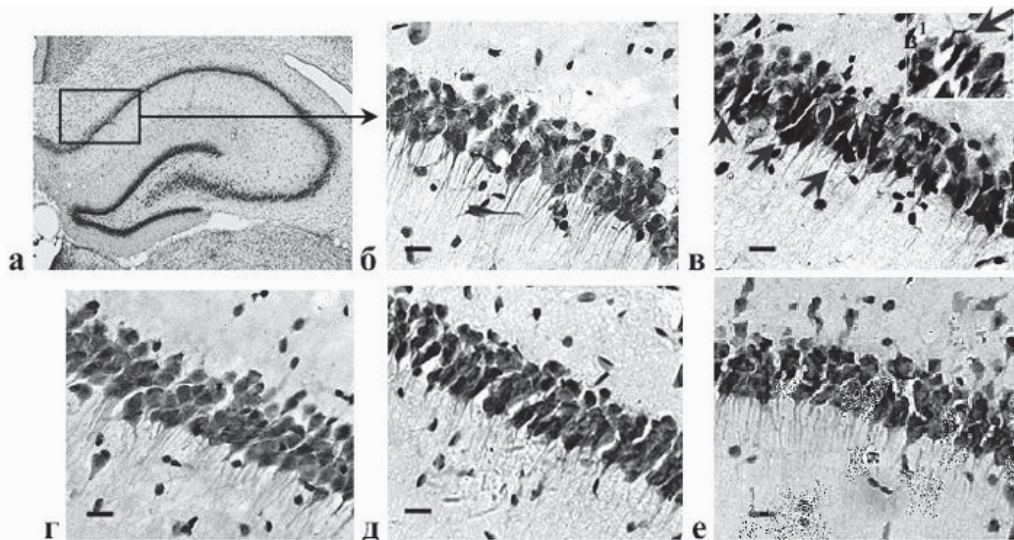


Рис. 7. Структурные изменения в нервной ткани поля СА1 гиппокампа у мышей, вызванные ПТЗ киндлингом. Масштаб 20 мкм

а – прямоугольником обозначен исследуемый участок поля СА1 гиппокампа, б – интактные мыши, нормальная структурная организация нейронов, в – в конце ПТЗ киндлинга. Стрелками показаны изменённые «по тёмному типу» сморщенные гиперхромные пирамидные нейроны с искривлёнными дендритными отростками, г – эффективное предупреждение развития ПТЗ киндлинга в присутствии 0,3 мг/кг ИЭМ-1921, д – то же, в присутствии 1 мг/кг ИЭМ-1958, е – то же, в присутствии 0,5 мг/кг мемантина

клеток принимала удлинненно-суженную форму. При исследовании подгруппы мышей, у которых несмотря на систематическое введение ПТЗ не развился типичный киндлинг, гиперхромные нейроны в срезах гиппокампа были единичны ($2,3 \pm 2,3\%$) (см. рис. 7).

Морфологические различия между животными с выраженным киндлингом и устойчивыми к киндлингу были найдены и в экспериментальных группах мышей, которым вводили блокаторы NMDA рецепторов. В мозге животных, устойчивых к киндлингу, не было обнаружено каких-либо патологических изменений нейронов, тогда как у подверженных киндлингу животных гиперхромные нейроны присутствовали. При сравнении нейропротекторного действия различных препаратов у животных с выраженными судорогами было выявлено, что ИЭМ-1921 слабо предотвращал появление гиперхромных нейронов ($24,0 \pm 5,6\%$), тогда как введение ИЭМ-1958 и мемантина существенно уменьшало их число ($6,6 \pm 0,9\%$ и $1,7\%$, соответственно).

Киндлинг является удобным экспериментальным приемом, поскольку постепенное нарастание патологического процесса дает возможность проследить последовательность и взаимосвязь его проявлений. Это позволяет использовать ПТЗ киндлинг в качестве адекватной модели как при оценке активности противосудорожных средств (Loscher, 1998, 2002; Coulter et al., 2002; Morimoto et al., 2004; Loscher, 2011), так и для выявления дегенеративных изменений нейронов мозга, вызванных судорогами (Holmes, 2002; Sutula et al., 2003; Wenk et al., 2006).

Совокупность полученных нами результатов свидетельствовала, что гиперхромные нейроны («темные клетки») появлялись в результате судорожных приступов, перенесенных животными в ходе развития ПТЗ киндлинга. Подобные изменения нейронов «по темному типу» обнаруживались при морфологическом анализе самых разнообразных патологических процессов в мозгу при ишемии (Jenkins et al., 1981; Kovessi et al., 2007), гипогликемии (Auer et al., 1985a,b), эпилепсии (Sloviter, 1983), избыточном действии возбуждающих медиаторов (Sloviter, Dempster, 1985; Kherani, Auer, 2008). Однако существующие мнения о природе этого феномена и даже о его причинно-следственной связи с патологией конкретных нейронов неоднозначны. Часть исследователей даже расценивает появление темных клеток как артефакт, вызванный нарушением условий содержания и фиксации ткани (Jortner, 2006). Тем не менее, проведение надлежащих контролей и получение надежных в каждом отдельном случае признаков связи между гиперхромностью нейронов и патологическим воздействием позволяет использовать этот критерий при оценке интенсивности процесса.

Следующим убедительным аргументом в пользу такой связи можно считать способность трех блокаторов глутаматных рецепторов NMDA типа мемантина, ИЭМ-1921 и ИЭМ-1958 предупреждать развитие не только судорожного компонента ПТЗ-киндинга, но и появление гиперхромных нейронов в гиппокампе. Молекулярный механизм взаимодействия использованных блокаторов с активируемыми глутаматом NMDA рецепторами подробно исследован (Bolshakov et al., 2000, 2003, 2005). Производные адамантана (мемантии и ИЭМ-1958) и фенилциклогексила (ИЭМ-1921) блокируют потенциалозависимым образом открытое состояние кана-

ла NMDA рецептора (Chen et al., 1992; Bolshakov et al., 2000, 2003, 2005; Тихонов, Магазаник, 2010), конкурируя при этом с ионами магния (Kotermanski, Johnson, 2009; Nikolaev et al., 2012). Блокаторы отличаются высокая степень селективности по отношению к открытым каналам глутаматных рецепторов NMDA типа (Bolshakov et al., 2003). Эти особенности молекулярного механизма блокады делают их хорошими инструментами исследования вовлеченности NMDA рецепторов в различные физиологические и патологические процессы.

Ранее нами было проведено сравнение противосудорожной активности мексантина и ИЭМ-1921 с использованием нескольких моделей в опытах на мышах: острые судорожные состояния, вызываемые внутрижелудочковым введением NMDA или каината (Лукомская и др., 2002), внутрибрюшинным введением ПТЗ (Лукомская и др., 2003), ареколина (Лукомская и др., 2007), ПТЗ киндилинг (Лукомская и др., 2005) и в опытах на крысах линии Крушинского–Молодкиной, генетически предрасположенных к аудиогенным судорогам (Ватаев и др., 2009; Ким и др., 2012; Лукомская и др., 2012). В настоящем исследовании возможной корреляции между противосудорожным и нейропротекторным действием неконкурентных блокаторов NMDA рецепторов были использованы их равноэффективные дозы в диапазоне ЭД40–ЭД55.

Результаты проведенных экспериментов выявили эту корреляцию. В контрольной группе систематическое введение ПТЗ вызывало у 70% мышей состояние киндлинга, что выражалось появлением судорожных ответов. При морфологическом исследовании срезов СА1 гиппокампа этих мышей обнаружено значительное число темных нейронов. Превентивное введение блокаторов NMDA рецепторов снижало долю мышей с развившимся ПТЗ киндлингом в среднем с 70% до 40%. Содержание измененных нейронов у 60% мышей экспериментальных групп, у которых ПТЗ киндлинг не развился и судороги не проявлялись, составило $0,1 \pm 0,06\%$, т.е. столько же, сколько в мозгу интактных мышей. Среди этих 60% могли быть и мыши, резистентные к действию ПТЗ изначально, а не вследствие профилактического действия блокаторов. Однако доля резистентных мышей в контрольной группе была в 2 раза меньше. Кроме того, появление судорожных припадков у опытных групп мышей по сравнению с контрольной было существенно задержано. Даже после 7-го введения ПТЗ ни у одной мыши еще не было судорог, тогда как в контроле они появились уже у 50% животных. Эти результаты позволяют считать, что блокада NMDA рецепторов способна не только замедлять и ослаблять развитие ПТЗ киндлинга, и, соответственно, судорожные реакции, но и предотвращать появление темных нейронов в гиппокампе.

По поводу причинно-следственной связи между судорогами и феноменом темных нейронов существуют противоречивые данные. Прежде всего, появляются ли темные клетки в мозгу крыс после однократного введения дозы 70–80 мг/кг ПТЗ, вызвавшей судороги (Ahmed et al., 2005), либо темные клетки могут быть обнаружены только в результате повторных введений ПТЗ (Aniol et al., 2011), причем как при исследовании мозга животных с выраженными судорожными проявлениями, так и при их видимом отсутствии (Павлова и др., 2005). Согласно результатам настоящего исследования ПТЗ киндлинга у мышей, предшествующий судоро-

рожный синдром является неременным условием обнаружения темных клеток в гиппокампе. В основе расхождения данных могут лежать различия в объектах (крысы, мыши), оценке интенсивности судорог и критериев морфологических изменений.

Мало известно о дальнейшей судьбе темных клеток после возникновения в мозгу патологического очага, эти сведения необходимы для более полного понимания их природы (Gallyas et al., 2005; Ooigawa et al., 2006; Kherani, Auer, 2008). В последнее время появляются результаты комплексных исследований процессов дегенерации зрелых нейронов и пролиферации молодых нейронов в ростовых областях нервной ткани (Jiang et al., 2004; Park et al., 2006; Tian et al., 2009; Aniol et al., 2011; Danzer, 2012). Работа в этом направлении способна пролить свет на общую проблему клеточных механизмов эпилепсии. Требуется также уточнения роль глутамата в последовательности процессов, приводящих к повреждениям мозговой ткани, вызванным судорожным синдромом, и, в частности, ограничивается ли она повышением входа ионов кальция в нейроны через открытые ионные каналы глутаматных рецепторов.

5. Заключение

К настоящему времени накоплено множество сведений о вовлеченности глутаматергической синаптической передачи в осуществление разных этапов патогенеза нервных болезней, в том числе и эпилепсии. Обнаружено и создано большое количество природных и синтезированных веществ, взаимодействующих с глутаматными рецепторами. Они с успехом используются в исследовательской практике в качестве инструментов. Однако до сих пор в арсенале врача можно найти лишь единицы разрешенных к применению лекарственных средств этого типа. Одной из основных причин являются нежелательные побочные эффекты предлагаемых лекарств, которые обнаруживаются уже в экспериментах на животных и делают невозможным их клиническое применение. Природа этого очевидна – блокада глутаматных рецепторов, активированных в патологическом очаге, сопровождается блокадой рецепторов, участвующих в реализации нормальных физиологических функций. Очевидно, что необходимы средства, которые бы обладали ощутимым преимуществом в патологическом очаге. Такими веществами в определенной мере являются неконкурентные антагонисты глутамата, эффективность которых может даже увеличиваться по мере роста числа активированных (открытых каналов) iGluR. Примером служат мемантин и большое число органических монокатионов. Тем не менее, в настоящее время при лечении эпилепсии мемантин и существующие подобные вещества не могут расцениваться как лекарства первого выбора. Для ввода блокаторов iGluR в клиническую практику необходимо повысить избирательность антагонистов, действующих на молекулярные формы глутаматных рецепторов, преобладающие в конкретных патологических очагах. Возможен подбор антагонистов, молекулярный механизм действия которых оказывается более эффективным в условиях патологии. Наконец, целесообразны поиски комбинаций

антагонистов глутаматных рецепторов с противоэпилептическими средствами, имеющими иной набор молекулярных мишеней.

Литература

- Васильев Д.С., Туманова Н.Л., Лаврентьева В.В. и др.* Способность блокаторов глутаматных рецепторов NMDA типа предупреждать развитие пентилентетразолового kindлинга и морфологические изменения пирамидных нейронов гиппокампа мышей // Рос. физиол. журнал им. И.М. Сеченова. 2013. Вып. 99. С. 1023-1034.
- Ватаев С.И., Жабко Е.П., Лукомская Н.Я. и др.* Влияние мепантина на судорожные реакции и организацию сна у крыс линии Крушинского-Молодкиной с наследственной предрасположенностью к аудиогенным судорогам // Рос. физиол. журнал им. И.М. Сеченова. 2009. Вып. 95. С. 802-812.
- Зайцев А.В., Ким К.Х., Магазаник Л.Г.* Роль кальций-проницаемых AMPA рецепторов в механизме дисинаптического торможения в префронтальной коре крысы // Биол мембраны. 2012. Вып. 29. С. 114-122.
- Ким К.Х., Зайцев А.В., Лаврентьева В.В. и др.* Влияние блокаторов ионотропных глутаматных рецепторов на вызванные пентилентетразолом судороги у крыс линии Крушинского-Молодкиной // Рос. физиол. журнал им. И.М. Сеченова. 2012. Vol. 98. P. 1520-1529.
- Лукомская Н.Я., Рукояткина Н.И., Горбунова Л.В. и др.* Сопоставление противосудорожной активности органических моно- и дикатионов с их способностью ингибировать NMDA и AMPA глутаматные рецепторы // Рос. физиол. журнал им. И.М. Сеченова. 2002. Вып. 88. С. 1161-1171.
- Лукомская Н.Я., Рукояткина Н.И., Горбунова Л.В. и др.* Исследование роли NMDA и AMPA глутаматных рецепторов в механизме коразоловых судорог у мышей // Рос. физиол. журнал им. И.М. Сеченова. 2003. Вып. 89. С. 292-301.
- Лукомская Н.Я., Лаврентьева В.В., Старшинова Л.А. и др.* Влияние блокаторов каналов ионотропных глутаматных рецепторов на развитие пентилентетразолового kindлинга у мышей // Рос. физиол. журнал им. И.М. Сеченова. 2005. Вып. 91. С. 1241-1251.
- Лукомская Н.Я., Лаврентьева В.В., Старшинова Л.А. и др.* Участие ионотропных глутаматных рецепторов в возникновении ареколинового тремора у мышей // Рос. физиол. журнал им. И.М. Сеченова. 2007. Вып. 93. С. 275-282.
- Лукомская Н.Я., Ватаев С.И., Жабко Е.П., Магазаник Л.Г.* Влияние блокаторов каналов ионотропных глутаматных рецепторов на аудиогенные судорожные реакции крыс линии Крушинского-Молодкиной // Рос. физиол. журнал им. И.М. Сеченова. 2012. Вып. 98. С. 449-460.
- Магазаник Л.Г., Большаков К.В., Булдакова С.Л. и др.* Структурные особенности ионотропных глутаматных рецепторов, выявляемые блокадой каналов // Рос. физиол. журнал им. И.М. Сеченова. 2000. Вып. 86. С. 1138-1150.
- Павлова Т.В., Яковлев А.А., Степаничев М.Ю., Гуляева Н.В.* Пентилентетразоловый kindлинг у крыс: связана ли нейродегенерация с проявлениями судорожной активности? // Рос. физиол. журнал им. И.М. Сеченова. 2005. Вып. 91. С. 764-765.
- Попова М.С., Аниол В.А., Лазарева Н.А. и др.* Нейродегенеративные изменения в полях гиппокампа крыс в ходе развития пентилентетразолового kindлинга // Морфология. 2012. Вып. 142. С. 25-30.
- Семюхина А.Ф., Федотова И.Б., Полетаева И.И.* Крысы линии Крушинского – Молодкиной: исследования аудиогенной эпилепсии, сосудистой патологии и поведения // ЖВНД. 2006. Вып. 56. С. 298-316.
- Тихонов Д.Б., Магазаник Л.Г.* Разнообразие механизмов блокады ионных каналов – путь к дизайну новых фармакологических агентов // Рос. физиол. журнал им. И.М. Сеченова. 2010. Вып. 96. С. 726-739.
- Ahmed M.M., Arif M., Chikuma T., Kato T.* Pentylentetrazol-induced seizures affect the levels of prolyl oligopeptidase, thimet oligopeptidase and glial proteins in rat brain regions, and attenuation by MK-801 pretreatment // Neurochem. Int. 2005. Vol. 47. P. 248-259.

- Aniol V.A., Stepanichev M.Y., Lazareva N.A., Gulyaeva N.V. An early decrease in cell proliferation after pentylenetetrazole-induced seizures // *Epilepsy Behav.* 2011. Vol. 22. P. 433-441.
- Auer R.N., Kalimo H., Olsson Y., Siesjo B.K. The temporal evolution of hypoglycemic brain damage. I. Light- and electron-microscopic findings in the rat cerebral cortex // *Acta. Neuropathol.* 1985a. Vol. 67. P. 13-24.
- Auer R.N., Kalimo H., Olsson Y., Siesjo B.K. The temporal evolution of hypoglycemic brain damage. II. Light- and electron-microscopic findings in the hippocampal gyrus and subiculum of the rat // *Acta. Neuropathol.* 1985b. Vol. 67. P. 25-36.
- Blake P.A., Yamaguchi S., Thurkauf A., Rogawski M.A. Anticonvulsant 1-phenylcycloalkylamines: two analogues with low motor toxicity when orally administered // *Epilepsia.* 1992. Vol. 33. P. 188-194.
- Bolshakov K.V., Tikhonov D.B., Gmiro V.E., Magazanik L.G. Different arrangement of hydrophobic and nucleophilic components of channel binding sites in N-methyl-D-aspartate and AMPA receptors of rat brain is revealed by channel blockade // *Neurosci. Lett.* 2000. Vol. 291. P. 101-104.
- Bolshakov K.V., Gmiro V.E., Tikhonov D.B., Magazanik L.G. Determinants of trapping block of N-methyl-d-aspartate receptor channels // *J. Neurochem.* 2003. Vol. 87. P. 56-65.
- Bolshakov K.V., Kim K.H., Potapjeva N.N. et al. Design of antagonists for NMDA and AMPA receptors // *Neuropharmacology.* 2005. Vol. 49. P. 144-155.
- Bowie D. Ionotropic glutamate receptors & CNS disorders // *CNS Neurol. Disord. Drug. Targets.* 2008. Vol. 7. P. 129-143.
- Brevard M.E., Kulkarni P., King J.A., Ferris C.F. Imaging the neural substrates involved in the genesis of pentylenetetrazol-induced seizures // *Epilepsia.* 2006. Vol. 47. P. 745-754.
- Buldakova S.L., Vorobjev V.S., Sharonova I.N. et al. Characterization of AMPA receptor populations in rat brain cells by the use of subunit-specific open channel blocking drug, IEM-1460 // *Brain Res.* 1999. Vol. 846. P. 52-58.
- Chang S.J., Yu B.C. Mitochondrial matters of the brain: mitochondrial dysfunction and oxidative status in epilepsy // *J. Bioenerg. Biomembr.* 2010. Vol. 42. P. 457-459.
- Chen H.S., Pellegrini J.W., Aggarwal S.K. et al. Open-channel block of N-methyl-D-aspartate (NMDA) responses by memantine: therapeutic advantage against NMDA receptor-mediated neurotoxicity // *J. Neurosci.* 1992. Vol. 12. P. 4427-4436.
- Clem R.L., Huganir R.L. Calcium-permeable AMPA receptor dynamics mediate fear memory erasure // *Science.* 2010. Vol. 330. P. 1108-1112.
- Consroe P., Picchioni A., Chin L. Audiogenic seizure susceptible rats // *Fed. Proc.* 1979. Vol. 38. P. 2411-2416.
- Corda M.G., Orlandi M., Lecca D., Giorgi O. Decrease in GABAergic function induced by pentylenetetrazol kindling in rats: antagonism by MK-801 // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1992. Vol. 262. P. 792-800.
- Coulter D.A., McIntyre D.C., Loscher W. Animal models of limbic epilepsies: what can they tell us? // *Brain Pathol.* 2002. Vol. 12. P. 240-256.
- Csordas A., Mazlo M., Gallyas F. Recovery versus death of «dark» (compacted) neurons in non-impaired parenchymal environment: light and electron microscopic observations // *Acta Neuropathol.* 2003. Vol. 106. P. 37-49.
- Cull-Candy S., Kelly L., Farrant M. Regulation of Ca²⁺-permeable AMPA receptors: synaptic plasticity and beyond // *Curr. Opin. Neurobiol.* 2006. Vol. 16. P. 288-297.
- Curia G., Longo D., Biagini G. et al. The pilocarpine model of temporal lobe epilepsy // *J. Neurosci. Methods.* 2008. Vol. 172. P. 143-157.
- D'Amelio M., Sheng M., Cecconi F. Caspase-3 in the central nervous system: beyond apoptosis // *Trends Neurosci.* 2012. Vol. 35. P. 700-709.
- Danzer S.C. Depression, stress, epilepsy and adult neurogenesis // *Exp. Neurol.* 2012. Vol. 233. P. 22-32.
- De Boer H.M., Mula M., Sander J.W. The global burden and stigma of epilepsy // *Epilepsy Behav.* 2008. Vol. 12. P. 540-546.
- De Sarro G., Palma E., Costa N. et al. Effects of compounds acting on GABA(B) receptors in the pentylenetetrazole kindling model of epilepsy in mice // *Neuropharmacology.* 2000. Vol. 39. P. 2147-2161.
- Dhir A. Pentylenetetrazol (PTZ) kindling model of epilepsy // *Curr. Protoc. Neurosci.* 2012. Chapter 9. Unit 9.37.

- Dingledine R., Borges K., Bowie D., Traynelis S.F. The glutamate receptor ion channels // *Pharmacol. Rev.* 1999. Vol. 51. P. 7-61.
- Doble A. The role of excitotoxicity in neurodegenerative disease: implications for therapy // *Pharmacol. Ther.* 1999. Vol. 81. P. 163-221.
- Doi T., Ueda Y., Nagatomo K., Willmore L.J. Role of glutamate and GABA transporters in development of pentylenetetrazol-kindling // *Neurochem. Res.* 2009. Vol. 34. P. 1324-1331.
- Dong X.-x., Wang Y., Qin Z.-h. Molecular mechanisms of excitotoxicity and their relevance to pathogenesis of neurodegenerative diseases // *Acta. Pharmacologica Sinica.* 2009. Vol. 30. P. 379-387.
- Dorandeu F., Dhote F., Barbier L. et al. Treatment of Status Epilepticus with Ketamine, Are we There yet? // *CNS Neurosci. Ther.* 2013. Vol. 19. P. 411-427.
- Doretto M.C., Cortes-de-Oliveira J.A., Rossetti F., Garcia-Cairasco N. Role of the superior colliculus in the expression of acute and kindled audiogenic seizures in Wistar audiogenic rats // *Epilepsia.* 2009. Vol. 50. P. 2563-2574.
- Drumond L.E., Kushmerick C., Guidine P.A. et al. Reduced hippocampal GABAergic function in Wistar audiogenic rats // *Braz. J. Med. Biol. Res.* 2011. Vol. 44. P. 1054-1059.
- Duan S., Anderson C.M., Stein B.A., Swanson R.A. Glutamate induces rapid upregulation of astrocyte glutamate transport and cell-surface expression of GLAST // *J. Neurosci.* 1999. Vol. 19. P. 10193-10200.
- Ekonomou A., Smith A.L., Angelatou F. Changes in AMPA receptor binding and subunit messenger RNA expression in hippocampus and cortex in the pentylenetetrazole-induced 'kindling' model of epilepsy // *Brain Res. Mol. Brain. Res.* 2001. Vol. 95. P. 27-35.
- Engel J., Jr., Pitkanen A., Loeb J.A. et al. Epilepsy biomarkers // *Epilepsia.* 2013. Vol. 54. Suppl. 4. P. 61-69.
- Erdogan F., Golgeli A., Arman F., Ersoy A.O. The effects of pentylenetetrazole-induced status epilepticus on behavior, emotional memory, and learning in rats // *Epilepsy Behav.* 2004. Vol. 5. P. 388-393.
- Faingold C.L. The genetically epilepsy-prone rat // *Gen Pharmacol.* 1988. Vol. 19. P. 331-338.
- Faingold C.L. Neuronal networks in the genetically epilepsy-prone rat // *Adv. Neurol.* 1999. Vol. 79. P. 311-321.
- Fang F., Lei H. Increased hippocampal T2 in a rat model of pentylenetetrazol-induced kindling correlates with seizure scores // *J. Neurol. Sci.* 2010. Vol. 292. P. 16-23.
- Feng H.J., Faingold C.L. Repeated generalized audiogenic seizures induce plastic changes on acoustically evoked neuronal firing in the amygdala // *Brain Res.* 2002. Vol. 932. P. 61-69.
- Fletcher E.J., Lodge D. New developments in the molecular pharmacology of alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionate and kainate receptors // *Pharmacol. Ther.* 1996. Vol. 70. P. 65-89.
- Forsgren L., Beghi E., Oun A., Sillanpaa M. The epidemiology of epilepsy in Europe - a systematic review // *Eur. J. Neurol.* 2005. Vol. 12. P. 245-253.
- Francois J., Boehler A., Nehlig A. Effects of carisbamate (RWJ-333369) in two models of genetically determined generalized epilepsy, the GAERS and the audiogenic Wistar AS // *Epilepsia.* 2008. Vol. 49. P. 393-399.
- Franke H., Kittner H. Morphological alterations of neurons and astrocytes and changes in emotional behavior in pentylenetetrazol-kindled rats // *Pharmacol. Biochem. Behav.* 2001. Vol. 70. P. 291-303.
- Fujikawa D.G. The temporal evolution of neuronal damage from pilocarpine-induced status epilepticus // *Brain Res.* 1996. Vol. 725. P. 11-22.
- Gallyas F., Csordas A., Schwarcz A., Mazlo M. «Dark» (compacted) neurons may not die through the necrotic pathway // *Exp. Brain Res.* 2005. Vol. 160. P. 473-486.
- Garcia-Cairasco N. A critical review on the participation of inferior colliculus in acoustic-motor and acoustic-limbic networks involved in the expression of acute and kindled audiogenic seizures // *Hear Res.* 2002. Vol. 168. P. 208-222.
- Geiger J.R., Melcher T., Koh D.S. et al. Relative abundance of subunit mRNAs determines gating and Ca²⁺ permeability of AMPA receptors in principal neurons and interneurons in rat CNS // *Neuron.* 1995. Vol. 15. P. 193-204.
- Geter-Douglass B., Witkin J.M. Behavioral effects and anticonvulsant efficacies of low-affinity, uncompetitive NMDA antagonists in mice // *Psychopharmacology (Berl).* 1999. Vol. 146. P. 280-289.
- Ghasemi M., Schachter S.C. The NMDA receptor complex as a therapeutic target in epilepsy: a review // *Epilepsy Behav.* 2011. Vol. 22. P. 617-640.
- Hollmann M., Heinemann S. Cloned glutamate receptors // *Annu. Rev. Neurosci.* 1994. Vol. 17. P. 31-108.

- Hollmann M., O'Shea-Greenfield A., Rogers S.W., Heinemann S. Cloning by functional expression of a member of the glutamate receptor family // *Nature*. 1989. Vol. 342. P. 643-648.
- Holmes G.L. Seizure-induced neuronal injury: animal data // *Neurology*. 2002. Vol. 59. P. S3-6.
- Huang R.Q., Bell-Horner C.L., Dibas M.I. et al. Pentylentetrazole-induced inhibition of recombinant gamma-aminobutyric acid type A (GABA(A)) receptors: mechanism and site of action // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2001. Vol. 298. P. 986-995.
- Isaac J.T., Ashby M.C., McBain C.J. The role of the GluR2 subunit in AMPA receptor function and synaptic plasticity // *Neuron*. 2007. Vol. 54. P. 859-871.
- Jenkins L.W., Povlishock J.T., Lewelt W. et al. The role of postischemic recirculation in the development of ischemic neuronal injury following complete cerebral ischemia // *Acta Neuropathol.* 1981. Vol. 55. P. 205-220.
- Jiang W., Wolfe K., Xiao L. et al. Iontropic glutamate receptor antagonists inhibit the proliferation of granule cell precursors in the adult brain after seizures induced by pentylentetrazol // *Brain Res.* 2004. Vol. 1020. P. 154-160.
- Jortner B.S. The return of the dark neuron. A histological artifact complicating contemporary neurotoxicologic evaluation // *Neurotoxicology*. 2006. Vol. 27. P. 628-634.
- Ju W., Morishita W., Tsui J. et al. Activity-dependent regulation of dendritic synthesis and trafficking of AMPA receptors // *Nat. Neurosci.* 2004. Vol. 7. P. 244-253.
- Kanamori K., Ross B.D. Chronic electrographic seizure reduces glutamine and elevates glutamate in the extracellular fluid of rat brain // *Brain Res.* 2011. Vol. 1371. P. 180-191.
- Kew J.N., Kemp J.A. Iontropic and metabotropic glutamate receptor structure and pharmacology // *Psychopharmacology (Berl)*. 2005. Vol. 179. P. 4-29.
- Kherani Z.S., Auer R.N. Pharmacologic analysis of the mechanism of dark neuron production in cerebral cortex // *Acta Neuropathol.* 2008. Vol. 116. P. 447-452.
- Kleinrok Z., Turski W.A., Czuczwar S.J. Excitatory amino acid antagonists and the anticonvulsive activity of conventional antiepileptic drugs // *Pol. J. Pharmacol.* 1995. Vol. 47. P. 247-252.
- Kohl B.K., Dannhardt G. The NMDA receptor complex: a promising target for novel antiepileptic strategies // *Curr. Med. Chem.* 2001. Vol. 8. P. 1275-1289.
- Kotermanski S.E., Johnson J.W. Mg²⁺ imparts NMDA receptor subtype selectivity to the Alzheimer's drug memantine // *J. Neurosci.* 2009. Vol. 29. P. 2774-2779.
- Kovesdi E., Pal J., Gallyas F. The fate of «dark» neurons produced by transient focal cerebral ischemia in a non-necrotic and non-excitotoxic environment: neurobiological aspects // *Brain Res.* 2007. Vol. 1147. P. 272-283.
- Kwak S., Weiss J.H. Calcium-permeable AMPA channels in neurodegenerative disease and ischemia // *Curr. Opin. Neurobiol.* 2006. Vol. 16. P. 281-287.
- Lavezzi A.M., Corna M.F., Matturri L. Neuronal nuclear antigen (NeuN): a useful marker of neuronal immaturity in sudden unexplained perinatal death // *J. Neurol. Sci.* 2013. Vol. 329. P. 45-50.
- Liu S.Q., Cull-Candy S.G. Synaptic activity at calcium-permeable AMPA receptors induces a switch in receptor subtype // *Nature*. 2000. Vol. 405. P. 454-458.
- Liu S.J., Cull-Candy S.G. Activity-dependent change in AMPA receptor properties in cerebellar stellate cells // *J. Neurosci.* 2002. Vol. 22. P. 3881-3889.
- Liu S.J., Zukin R.S. Ca²⁺-permeable AMPA receptors in synaptic plasticity and neuronal death // *Trends Neurosci.* 2007. Vol. 30. P. 126-134.
- Loscher W. Pharmacology of glutamate receptor antagonists in the kindling model of epilepsy // *Prog. Neurobiol.* 1998. Vol. 54. P. 721-741.
- Loscher W. Animal models of epilepsy for the development of antiepileptogenic and disease-modifying drugs. A comparison of the pharmacology of kindling and post-status epilepticus models of temporal lobe epilepsy // *Epilepsy Res.* 2002. Vol. 50. P. 105-123.
- Loscher W. Critical review of current animal models of seizures and epilepsy used in the discovery and development of new antiepileptic drugs // *Seizure*. 2011. Vol. 20. P. 359-368.
- Loscher W., Honack D. Over-additive anticonvulsant effect of memantine and NBQX in kindled rats // *Eur. J. Pharmacol.* 1994. Vol. 259. P. R3-5.

- Loscher W., Rundfeldt C., Honack D.* Low doses of NMDA receptor antagonists synergistically increase the anticonvulsant effect of the AMPA receptor antagonist NBQX in the kindling model of epilepsy // *Eur. J. Neurosci.* 1993. Vol. 5. P. 1545-1550.
- Luttjohann A., Fabene P.F., van Luijckelaar G.* A revised Racine's scale for PTZ-induced seizures in rats // *Physiol. Behav.* 2009. Vol. 98. P. 579-586.
- Madden D.R.* The structure and function of glutamate receptor ion channels // *Nat. Rev. Neurosci.* 2002. Vol. 3. P. 91-101.
- Magalhaes L.H., Garcia-Cairasco N., Massensini A.R. et al.* Evidence for augmented brainstem activated forebrain seizures in Wistar Audiogenic Rats subjected to transauricular electroshock // *Neurosci. Lett.* 2004. Vol. 369. P. 19-23.
- Mares P., Mikulecka A.* Different effects of two N-methyl-D-aspartate receptor antagonists on seizures, spontaneous behavior, and motor performance in immature rats // *Epilepsy Behav.* 2009. Vol. 14. P. 32-39.
- Markram H., Toledo-Rodriguez M., Wang Y. et al.* Interneurons of the neocortical inhibitory system // *Nat. Rev. Neurosci.* 2004. Vol. 5. P. 793-807.
- Mazarati A.M., Wasterlain C.G.* N-methyl-D-aspartate receptor antagonists abolish the maintenance phase of self-sustaining status epilepticus in rat // *Neurosci. Lett.* 1999. Vol. 265. P. 187-190.
- McBain C.J., Dingledine R.* Heterogeneity of synaptic glutamate receptors on CA3 stratum radiatum interneurons of rat hippocampus // *J. Physiol.* 1993. Vol. 462. P. 373-392.
- Meurs A., Clinckers R., Ebinger G. et al.* Seizure activity and changes in hippocampal extracellular glutamate, GABA, dopamine and serotonin // *Epilepsy Res.* 2008. Vol. 78. P. 50-59.
- Mirski M.A., Tsai Y.C., Rossell L.A. et al.* Anterior thalamic mediation of experimental seizures: selective EEG spectral coherence // *Epilepsia.* 2003. Vol. 44. P. 355-365.
- Morimoto K., Fahnstock M., Racine R.J.* Kindling and status epilepticus models of epilepsy: rewiring the brain // *Prog. Neurobiol.* 2004. Vol. 73. P. 1-60.
- Mullen R.J., Buck C.R., Smith A.M.* NeuN, a neuronal specific nuclear protein in vertebrates // *Development.* 1992. Vol. 116. P. 201-211.
- Nikolaev M.V., Magazanik L.G., Tikhonov D.B.* Influence of external magnesium ions on the NMDA receptor channel block by different types of organic cations // *Neuropharmacology.* 2012. Vol. 62. P. 2078-2085.
- Ooigawa H., Nawashiro H., Fukui S. et al.* The fate of Nissl-stained dark neurons following traumatic brain injury in rats: difference between neocortex and hippocampus regarding survival rate // *Acta. Neuropathol.* 2006. Vol. 112. P. 471-481.
- Paoletti P., Neyton J.* NMDA receptor subunits: function and pharmacology // *Curr. Opin. Pharmacol.* 2007. Vol. 7. P. 39-47.
- Park J.H., Cho H., Kim H., Kim K.* Repeated brief epileptic seizures by pentylenetetrazole cause neurodegeneration and promote neurogenesis in discrete brain regions of freely moving adult rats // *Neuroscience.* 2006. Vol. 140. P. 673-684.
- Parsons C.G., Quack G., Bresink I. et al.* Comparison of the potency, kinetics and voltage-dependency of a series of uncompetitive NMDA receptor antagonists in vitro with anticonvulsive and motor impairment activity in vivo // *Neuropharmacology.* 1995. Vol. 34. P. 1239-1258.
- Pellegrini-Giampietro D.E., Gorter J.A., Bennett M.V.L., Zukin R.S.* The GluR2 (GluR-B) hypothesis: Ca²⁺-permeable AMPA receptors in neurological disorders // *Trends in Neurosciences.* 1997. Vol. 20. P. 464-470.
- Plant K., Pelkey K.A., Bortolotto Z.A. et al.* Transient incorporation of native GluR2-lacking AMPA receptors during hippocampal long-term potentiation // *Nature Neuroscience.* 2006. Vol. 9. P. 602-604.
- Rajasekaran K., Todorovic M., Kapur J.* Calcium-permeable AMPA receptors are expressed in a rodent model of status epilepticus // *Ann. Neurol.* 2012. Vol. 72. P. 91-102.
- Ribak C.E., Morin C.L.* The role of the inferior colliculus in a genetic model of audiogenic seizures // *Anat. Embryol. (Berl).* 1995. Vol. 191. P. 279-295.
- Rogawski M.A.* Revisiting AMPA receptors as an antiepileptic drug target // *Epilepsy Curr.* 2011. Vol. 11. P. 56-63.
- Rogawski M.A., Loscher W.* The neurobiology of antiepileptic drugs // *Nat. Rev. Neurosci.* 2004. Vol. 5. P. 553-564.

- Rogawski M.A., Thurkauf A., Yamaguchi S. et al. Anticonvulsant activities of 1-phenylcyclohexylamine and its conformationally restricted analog 1,1-pentamethylenetetrahydroisoquinoline // *J. Pharmacol. Experiment. Therapeutics*. 1989. Vol. 249. P. 708-712.
- Rothman S.M., Olney J.W. Excitotoxicity and the NMDA receptor // *Trends in Neurosciences*. 1987. Vol. 10. P. 299-302.
- Russo E., Constanti A., Ferreri G. et al. Nifedipine affects the anticonvulsant activity of topiramate in various animal models of epilepsy // *Neuropharmacology*. 2004. Vol. 46. P. 865-878.
- Sander J.W. The epidemiology of epilepsy revisited // *Curr. Opin. Neurol.* 2003. Vol. 16. P. 165-170.
- Scarlattelli-Lima A.V., Magalhaes L.H., Doretto M.C., Moraes M.F. Assessment of the seizure susceptibility of Wistar Audiogenic rat to electroshock, pentylenetetrazole and pilocarpine // *Brain Res.* 2003. Vol. 960. P. 184-189.
- Sheldon A.L., Robinson M.B. The role of glutamate transporters in neurodegenerative diseases and potential opportunities for intervention // *Neurochem. Int.* 2007. Vol. 51. P. 333-355.
- Sloviter R.S. «Epileptic» brain damage in rats induced by sustained electrical stimulation of the perforant path. I. Acute electrophysiological and light microscopic studies // *Brain Res. Bull.* 1983. Vol. 10. P. 675-697.
- Sloviter R.S., Dempster D.W. «Epileptic» brain damage is replicated qualitatively in the rat hippocampus by central injection of glutamate or aspartate but not by GABA or acetylcholine // *Brain Res. Bull.* 1985. Vol. 15. P. 39-60.
- Smolders I., Khan G.M., Manil J. et al. NMDA receptor-mediated pilocarpine-induced seizures: characterization in freely moving rats by microdialysis // *Br. J. Pharmacol.* 1997. Vol. 121. P. 1171-1179.
- Sobolevsky A.I. Structure and Gating of Tetrameric Glutamate Receptors // *J. Physiol.* 2013. Vol. P.
- Sobolevsky A.I., Rosconi M.P., Gouaux E. X-ray structure, symmetry and mechanism of an AMPA-subtype glutamate receptor // *Nature*. 2009. Vol. 462. P. 745-756.
- Soderfeldt B., Kalimo H., Olsson Y., Siesjo B.K. Bicuculline-induced epileptic brain injury. Transient and persistent cell changes in rat cerebral cortex in the early recovery period // *Acta. Neuropathol.* 1983. Vol. 62. P. 87-95.
- Striano P., Striano S. New and investigational antiepileptic drugs // *Expert Opin. Investig. Drugs*. 2009. Vol. 18. P. 1875-1884.
- Sutton M.A., Ito H.T., Cressy P. et al. Miniature neurotransmission stabilizes synaptic function via tonic suppression of local dendritic protein synthesis // *Cell*. 2006. Vol. 125. P. 785-799.
- Sutula T.P., Hagen J., Pitkanen A. Do epileptic seizures damage the brain? // *Curr. Opin. Neurol.* 2003. Vol. 16. P. 189-195.
- Szyndler J., Maciejak P., Turzynska D. et al. Changes in the concentration of amino acids in the hippocampus of pentylenetetrazole-kindled rats // *Neurosci. Lett.* 2008. Vol. 439. P. 245-249.
- Takahashi Y., Sadamatsu M., Kanai H. et al. Changes of immunoreactive neuropeptide Y, somatostatin and corticotropin-releasing factor (CRF) in the brain of a novel epileptic mutant rat, Ihara's genetically epileptic rat (IGER) // *Brain Res.* 1997. Vol. 776. P. 255-260.
- Thiagarajan T.C., Lindskog M., T sien R.W. Adaptation to synaptic inactivity in hippocampal neurons // *Neuron*. 2005. Vol. 47. P. 725-737.
- Tian F.F., Zeng C., Guo T.H. et al. Mossy fiber sprouting, hippocampal damage and spontaneous recurrent seizures in pentylenetetrazole kindling rat model // *Acta. Neurol. Belg.* 2009. Vol. 109. P. 298-304.
- Tikhonov D.B. Ion channels of glutamate receptors: structural modeling // *Mol. Membr. Biol.* 2007. Vol. 24. P. 135-147.
- Traynelis S.F., Wollmuth L.P., McBain C.J. et al. Glutamate receptor ion channels: structure, regulation, and function // *Pharmacol. Rev.* 2010. Vol. 62. P. 405-496.
- Urbanska E.M., Czuczwar S.J., Kleinrok Z., Turski W.A. Excitatory amino acids in epilepsy // *Restor. Neurol. Neurosci.* 1998. Vol. 13. P. 25-39.
- Verma-Ahuja S., Evans M.S., Espinosa J.A. Evidence of increased excitability in GEPR hippocampus preceding development of seizure susceptibility // *Epilepsy Res.* 1998. Vol. 31. P. 161-173.
- Wang H.X., Gao W.J. Development of calcium-permeable AMPA receptors and their correlation with NMDA receptors in fast-spiking interneurons of rat prefrontal cortex // *J. Physiol.* 2010. Vol. 588. P. 2823-2838.

- Wenk G.L., Parsons C.G., Danysz W.* Potential role of N-methyl-D-aspartate receptors as executors of neurodegeneration resulting from diverse insults: focus on memantine // *Behav. Pharmacol.* 2006. Vol. 17. P. 411-424.
- White H.S.* Animal models for evaluating antiepileptogenesis // *Jasper's Basic Mechanisms of the Epilepsies.* Eds. J.L. Noebels et al. Bethesda (MD). 2012.
- Wong M., Wozniak D.F., Yamada K.A.* An animal model of generalized nonconvulsive status epilepticus: immediate characteristics and long-term effects // *Exp. Neurol.* 2003. Vol. 183. P. 87-99.
- Yamaguchi S., Donevan S.D., Rogawski M.A.* Anticonvulsant activity of AMPA/kainate antagonists: comparison of GYKI 52466 and NBOB in maximal electroshock and chemoconvulsant seizure models // *Epilepsy Res.* 1993. Vol. 15. P. 179-184.
- You Y., Bai H., Wang C. et al.* Myelin damage of hippocampus and cerebral cortex in rat pentylenetetrazol model // *Brain Res.* 2011. Vol. 1381. P. 208-216.
- Zaitsev A.V., Kim K.K., Fedorova I.M. et al.* Specific mechanism of use-dependent channel block of calcium-permeable AMPA receptors provides activity-dependent inhibition of glutamatergic neurotransmission // *J. Physiol.* 2011. Vol. 589. P. 1587-1601.

Электрическая стимуляция спинного мозга – эффективный способ регуляции локомоторных функций

*Т.Р. Мошонкина, И.Н. Богачева, Н.А. Щербакова,
А.Н. Макаровский, Ю.П. Герасименко*

Содержание

1. Введение
2. Биофизические основы электрической стимуляции спинного мозга
3. Применение метода эпидуральной электростимуляции спинного мозга в терапии спинного мозга
4. Исследование механизмов инициации локомоторной активности при эпидуральной стимуляции спинного мозга
5. Неинвазивная стимуляция спинного мозга для вызова шагательных движений
6. Заключение

1. Введение

Потеря способности человека к самостоятельному передвижению в результате травмы или заболевания позвоночника является одной из самых драматичных ситуаций. Частота повреждений позвоночника составляет 3,5 на 10 тыс. городского населения и имеет тенденцию к росту. Считается, что это обусловлено увеличением бытового, автотранспортного, производственного травматизма, техногенных и стихийных катастроф (Тома и др., 2010). Более половины переломов позвоночника сопровождаются повреждением спинного мозга, по современным данным, эта цифра достигает 80% (Цивьян, 1971). Выход на инвалидность после осложненной травмы составляет от 75 до 80% (Усиков, Усиков, 1992). Проблема оказания помощи больным данной категории выходит на государственный уровень. Спинальные пациенты, как правило, нуждаются в пожизненной медицинской и социальной реабилитации.

В последние десятилетия были сделаны научные открытия, дающие надежду на возможность восстановления спинного мозга: в спинном мозге были определены места, электрическая стимуляция которых приводит к появлению локомоторных движений и восстановлению функции поддержки веса тела (Dimitrijevic et al., 1998; Gerasimenko et al., 2001, 2008; Ichiyama et al., 2005). Было сформулировано понятие о генераторе шагательных движений (ГШД).

На основании полученных данных о наличии ГШД у человека был разработан и опробован метод электрической стимуляции спинного мозга (ЭССМ) для ком-

Сокращения: ГШД – генератор шагательных движений; ККФ – кросскорреляционная функция; ПВСТ – последствия вертебро-спинальной травмы; ЦНС – центральная нервная система; ЧССМ – чрескожная стимуляция спинного мозга; ЭМГ – электромиография; ЭССМ – эпидуральная стимуляция спинного мозга; ASIA – American Spinal Injury Association.

плексного лечения пациентов со спинномозговыми расстройствами при туберкулезном спондилите и последствиях вертебро-спинальной травмы (Макаровский и др., 1999; Шапков и др., 1999; Шапкина и др., 2003). ЭССМ в 85,8% случаев приводила к улучшению состояния больных, в то время как хирургическое вмешательство в отсутствие электрической стимуляции – лишь в 58,5% (Макаровский, 2004). Исследования механизма действия электрической стимуляции на состояние пациентов показали, что восстановление функций спинного мозга происходило за счет купирования явлений парабиоза, ремиелинизации структур спинного мозга, активации структур спинального ГШД; ЭССМ приводила к улучшению кровоснабжения нижних конечностей (Макаровский, 2004).

Для разработки системы реабилитационного лечения вертебро-спинальной патологии важное значение имеют сведения о локомоторных способностях спинного мозга. Необходимо не только экспериментально оценить возможности восстановления двигательной активности после травмы спинного мозга, но и выяснить, на какие системы спинного мозга и каким образом нужно воздействовать, чтобы процесс реабилитации протекал успешно. Очевидно, что такого рода исследования можно провести только в лабораторных условиях и только на экспериментальных животных.

2. Биофизические основы электрической стимуляции спинного мозга

Для картирования спинного мозга человека в клинике используют катетер-электрод (рис. 1). Как правило, применяется биполярная стимуляция спинного мозга. Регистрация ЭМГ-активности осуществляется кожными поверхностными электродами, расположенными над мышцами: *m. quadriceps*, *m. adductor*, *m. hamstrings*, *m. tibialis anterior* и *m. triceps surae* обеих ног.

Перерыв нисходящих влияний тестируется при эпидуральной электрической стимуляции шейного утолщения спинного мозга и регистрацией вызванных потенциалов спинного мозга ниже уровня поражения. Отсутствие вызванных потенциалов ниже уровня поражения при стимуляции шейного утолщения с интенсив-

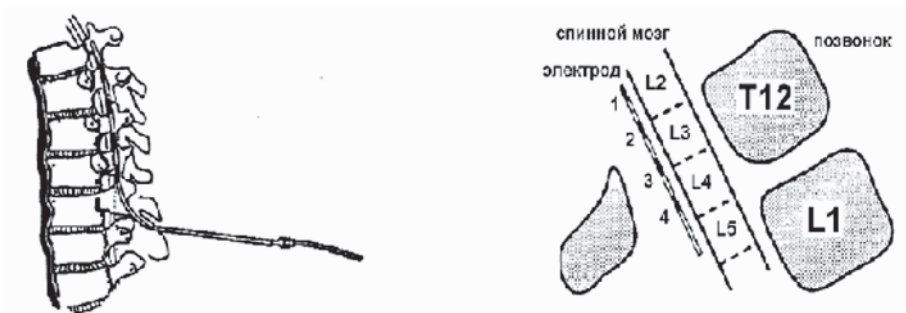


Рис. 1. Схемы имплантации катетер-электрода и его расположение в эпидуральном пространстве на задней поверхности спинного мозга. Цит. по (Макаровский, 2004)

ностью, максимально переносимой пациентом, свидетельствует о полном блоке проведения возбуждения по проводящим системам спинного мозга. Прекращение восходящих влияний устанавливается только в случае отсутствия вызванных корковых потенциалов на ЭССМ поясничного утолщения ниже уровня поражения или периферических нервов.

По электрическим свойствам структуры спинного мозга и окружающие его ткани весьма неоднородны. Имеются области с высокой проводимостью, например цереброспинальная жидкость, и области с низкой проводимостью, такие как жировая и костная ткань, а также анизотропные области, к которым относятся проводящие системы и белое вещество спинного мозга. Распределение электрических токов и, соответственно, деполяризация определенных структур будет зависеть от локализации электродов и параметров стимулирующего воздействия. Первоначально полагали, что при расположении электрода на дорсальной поверхности спинного мозга происходит деполяризация волокон восходящих трактов. Однако позже было установлено, что смещение электрода даже на один миллиметр может играть решающую роль в активации тех или иных структур спинного мозга (Young, 1978; Law, 1983). Эксперименты, проведенные на обезьянах, показали, что незначительное изменение позиции электрода и параметров стимуляции может деполяризовать напрямую или трансинаптически множество путей в дорсальном и вентральном квадрантах спинного мозга (Bantli et al., 1975).

Принято считать, что при эпидуральной стимуляции возбуждаются волокна дорсальных корешков, активируемые на уровне стимулирующего электрода, мотонейроны и проприоспинальные интернейронные структуры. По мнению Б. Кобурна (Coburn, 1985), при эпидуральной стимуляции в первую очередь будут деполяризовываться самые низкопороговые волокна дорсальных столбов и волокна дорсальных корешков (рис. 2). Сравнительный анализ вызванных потенциалов коры головного мозга на стимуляцию грудного и шейного отделов спинного мозга показал, что в основе их возникновения лежит деполяризация дорсальных столбов и спинальных корешков (Beric et al., 1966). Согласно модельным данным, при высокой интенсивности стимуляции электрические токи могут непосредственно активировать мотонейроны и дендриты (Hause, 1975). Многие авторы придают важное значение форме стимулирующего импульса для селективной активации определенных структур спинного мозга, но специальных экспериментальных исследований по этому вопросу не проводилось.

При расположении электрода на дорсальной поверхности спинного мозга кроме восходящих систем, деполяризация которых будет происходить в первую очередь, в активацию могут также вовлекаться дорсальные спинозжечковые пути и проприоспинальная система дорсолатеральных канатиков. Тот факт, что стимуляция спинного мозга является эффективной в снижении спастичности только у пациентов с сохраненными нисходящими и восходящими системами, указывает на активацию спинозжечковой петли при эпидуральном воздействии. Этот спинозжечковый вход будет оказывать влияние на нейроны мозжечка, которые, в свою очередь, будут воздействовать на вестибулоспинальные, ретикулоспинальные и руброспинальные тракты (Arshavsky et al., 1983).

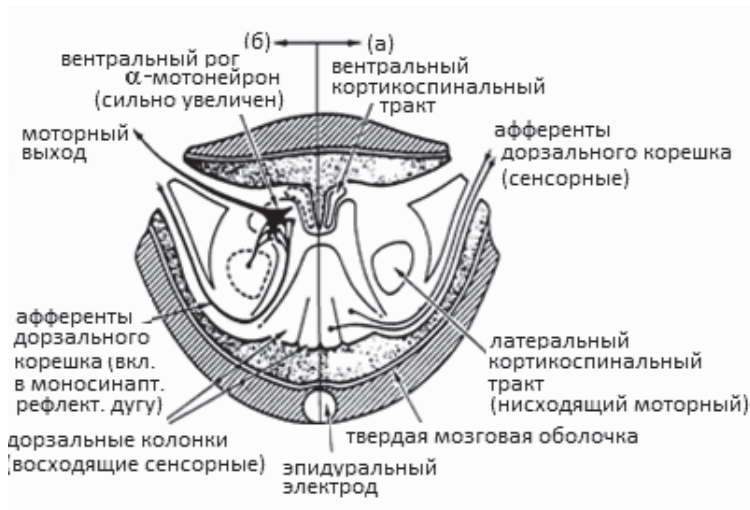


Рис. 2. Схема расположения электрода в эпидуральном пространстве спинного мозга. Цит. по (Coburn, 1985)

Стимуляция спинного мозга у хронически спинальных пациентов будет действовать на нейрональные механизмы, сохраненные после травмы. В условиях хронической спинализации совершенно неясным остается вопрос о том, какие спинальные элементы будут активироваться при эпидуральной стимуляции в случаях полного поперечного поражения спинного мозга и дегенерации нисходящих систем спинного мозга. По выражению М. Димитриевица (Dimitrijevic, Faganel, 1985), конечный результат ЭССМ будет зависеть от взаимодействия между нейрофизиологическими характеристиками эффектов стимуляции и от нейропатофизиологических свойств пораженного участка.

Эффективность эпидуральной стимуляции зависит от размеров и позиции электродов и от относительного сопротивления белого и серого вещества, цереброспинальной жидкости и окружающих тканей (Ranck, 1975; Swiontek et al., 1976). Как известно, максимум электрического поля фокусируется под катодом, и это поле активирует окружающие аксоны в зависимости от их величины и ориентации (Ranck, 1975). В морфологических исследованиях был установлен диапазон диаметров волокон спинного мозга, показано, что самые крупные волокна локализованы в дорсолатеральном и вентральном канатиках (Ohnishi et al., 1976). На основании этого можно предполагать, что эпидуральные электроды должны активировать в первую очередь волокна в дорсальных и дорсолатеральных столбах, а также в дорсальных корешках. Б. Кобурн и В.К. Син (Coburn, Sin, 1985) промоделировали электрические поля и плотности тока, возникающие в спинном мозге при ЭССМ с учетом электрической анизотропности спинного мозга. По их данным, электрическое поле сфокусировано в дорсальных столбах под стимулирующим электродом, прогрессивно уменьшаясь в вентральном направлении. На рис. 2 представлена схема,

заимствованная из работы Б. Кобурна. Предполагается, что первыми при ЭССМ активируются миелиновые волокна большого диаметра афферентов, входящих в спинной мозг через дорсальный корешок и идущие в поперечном направлении, затем продольно ориентированные миелиновые волокна дорсальных столбов, и наконец, восходящие или нисходящие миелиновые волокна дорсолатеральных столбов.

Дж.П. Хантер и П. Эшби (Hunter, Asby, 1994) проанализировали активность отдельных двигательных единиц мышц голени при ЭССМ; был сделан вывод о том, что эпидуральная стимуляция, активируя первичные афференты в дорсальных столбах, оказывает антидромное моносинаптическое влияние на мотонейроны поясничного утолщения. Имеется еще ряд работ, посвященных мониторингу потенциалов при ЭССМ, показывающие участие моторных трактов в их генезе (Levy, York, 1983; Machida et al., 1985; Gerasimenko, Makarovsky, 1996). Предположение о ведущей роли дорсальных корешков в генезе рефлекторных ответов при эпидуральной стимуляции может быть подвергнуто сомнению по следующим причинам. Теоретически возможно предположить, что ортодромная активация нисходящих проекций Ia афферентов с уровня T11-T12 может распространяться к мотонейронам в пределах 5–6 сегментов. При ЭССМ наблюдаются довольно сильные тонические сокращения межреберных мышц и мышц живота, что указывает на активацию дорсальных корешков данного сегмента. Насколько эффективным является этот вход для мотонейронов мышц голени, иннервирующихся из L5-S1 спинальных сегментов, сказать довольно трудно, так как известно, что гетерогенное облегчение даже между синергистами у человека выражено слабо (Bayoumi, Ashby, 1989), поэтому представляется маловероятным, что афференты Ia дорсальных корешков с уровня L1–L2 будут иметь сильные проекции к мотонейронам уровня S1.

В этом смысле более вероятным, по-видимому, является точка зрения об антидромной активации Ia афферентов в дорсальных столбах. Во-первых, имеются данные о том, что у кошки первичные афференты от мышц задней конечности идут в восходящем направлении до синаптического контакта со столбами Кларка на протяжении 4–12 сегментов спинного мозга (Lloyd, McIntyre, 1950), поэтому первичные афференты в обязательном порядке будут находиться под стимулирующим электродом. Во-вторых, показано, что у человека имеются сильные связи гомонимных Ia афферентов со всеми мотонейронами мышц нижних конечностей (Bayoumi, Ashby, 1989), и, вероятно, этим обстоятельством объясняются эффекты схожести процессов восстановления возбудимости при парном тестировании ЭССМ и при парной стимуляции периферических нервов, активирующих Ia афференты (Mailis, Ashby, 1990), а также приблизительно одинаковое подавление ответов, вызванных ЭССМ, и моносинаптических рефлексов при вибрации.

Что касается систем, входящих в состав дорсолатеральных канатиков, которые также могут активироваться при эпидуральной стимуляции, то прежде всего надо указать на то, что при условии спинальной патологии нисходящие кортикоспинальные и ретикулоспинальные тракты не будут оказывать влияния на мотонейроны поясничного утолщения вследствие их дегенерации. Влияние проприоспинальных систем также нельзя отнести к определяющим, так как длинные восходящие и нисходящие проприоспинальные аксоны идут в составе вентрального канатика, и по-

этому их вклад может быть незначительным. Дорсальная половина латеральных канатиков содержит только короткие проприоспинальные нейроны и представляется маловероятным, что моносинаптические рефлекторные ответы в мышцах при ЭССМ опосредуются их активацией.

Таким образом, ЭССМ вызывает рефлекторные ответы в мышцах ног, которые по своей природе являются моносинаптическими рефлексам. Эти рефлексы, по-видимому, возникают вследствие антидромной активации Ia афферентов в дорсальных столбах.

3. Применение метода эпидуральной электростимуляции спинного мозга в терапии спинного мозга

Первое клиническое применение ЭССМ было осуществлено в 1967 г. для контроля за болевым синдромом («gate control») (Sheal et al., 1967). Впоследствии этот метод стал применяться для восстановления функций тазовых органов (Sedan et al., 1974), улучшения периферического кровотока (Meglio et al., 1981), снижения спастичности (Barolat et al., 1988), повышения двигательной активности у больных с рассеянным склерозом (Tallis et al., 1983) и **восстановления координации движений** (Dimitrijevic, Faganel, 1985; Gerasimenko et al., 1992).

Кроме реабилитационного лечения ЭССМ достаточно эффективно используется и в клинических исследованиях (Медведев и др., 1990). Было установлено, что ЭССМ подавляет моносинаптические рефлексы (Illis et al., 1976; Siegfried, 1992), и облегчает первичную афферентную деполяризацию (Shimoji et al., 1982). Начиная с 70-х годов прошлого века электростимуляция спинного мозга является известным способом лечения хронического болевого синдрома (Lazorthes, Verdie, 2005; Исагулян, 2006; Нинель и др., 2006; Шабалов, 2004а). Так, в недавнем исследовании (Зеелигер, Мельник, 2009) был описан положительный эффект применения ЭССМ для лечения хронических болевых синдромов на большой выборке пациентов (88 наблюдений). В течение примерно 4 лет после имплантации стимулятора изучали изменение болевых ощущений. Одним из основных выводов исследования является то, что операцию можно предлагать больному, только если в ходе тестовой стимуляции интенсивность боли сокращается более чем на 50% от исходного показателя.

ЭССМ, как было показано, эффективна при лечении спастичности мышц нижних конечностей разной этиологии. Спастические синдромы нижних конечностей часто являются последствиями травм спинного мозга. Чрезмерное повышение мышечного тонуса, сопровождающееся мышечными спазмами, нарушает произвольные движения, формирует патологические позы, приводит к формированию контрактур, вывихов в суставах и болевого синдрома. А.В. Кук и С.П. Вайнштейн (Cook, Weinstein, 1973) первыми показали, что электростимуляция спинного мозга снижает спастичность. Дж. Зигфрид с соавторами (Siegfried et al., 1977) **отмечали улучшение двигательных функций** на протяжении 1–5 лет в группе больных со спастическими синдромами. Дж.М. Уоц (Waltz, 1982) получил в результате электростимуляции исчезновение или значительное уменьшение болезненных спазмов и спастичности приводящих мышц у всех больных.

Целью исследования М. Пинтер с соавторами (Pinter et al., 2000) было выявить эффект ЭССМ на спастичность нижних конечностей у пациентов с травмой спинного мозга. Исследование проведено на восьми пациентах, сравнивали уровень спастичности до и во время ЭССМ по стандартным клиническим тестам и по результатам поверхностной электромиографии во время пассивной флексии и экстензии в коленном суставе. Получено, что ЭССМ является эффективным методом контроля спастичности у пациентов с последствиями травмы спинного мозга. Авторы считают, что электроды должны располагаться на верхних сегментах поясничного отдела спинного мозга (L1, L2, L3), частота стимуляции 50–100 Гц, параметры стимуляции должны корректироваться клиническими показателями, амплитуда стимуляции должна быть разной для разного положения тела пациента.

Высокочастотная ЭССМ применяется в НИИ нейрохирургии им. акад. Н.Н. Бурденко РАМН как метод для лечения спастичности (Шабалов и др., 2004, 2005). Была показана эффективность этого метода в коррекции спастического синдрома, вызванного травмой спинного мозга в шейном отделе. Два эпидуральных электрода были имплантированы на уровень Th10-Th12. Электромиография регистрировалась до операции и в катамнезе. Уровень спастичности значительно снизился после первых сеансов электростимуляции. Срок наблюдения за больным составил 15 месяцев. Показано, что для поддержания мышечного тонуса на уровне нормы больному требуется 1 сеанс ЭССМ в 3 дня. Клинические данные коррелируют с динамикой ЭМГ.

Показаны возможности ЭССМ и в комплексном лечении пострадавших с позвоночно-спинномозговой травмой в остром и отдаленном периодах травматической болезни спинного мозга (Тома и др., 2010). Авторами представлен анализ результатов лечения 356 пострадавших с позвоночно-спинномозговой травмой в возрасте от 16 лет до 71 года, проведенного на протяжении 10 лет. Повреждения шейного отдела наблюдались у 40,7% пострадавших, грудного – у 16,6%, грудопоясничного – у 25%, поясничного – у 17,7%. Параметры электростимуляции на протяжении лечения корректировали в зависимости от результатов электро-нейромиографического мониторинга и степени поражения спинного мозга. В результате проведенного электроимпульсного воздействия на спинной мозг в остром периоде травмы у 80,9% пострадавших удалось добиться положительных исходов, что на 11,7% лучше, чем в группе сравнения, и наиболее полно восстановить утраченные функции спинного мозга более чем у половины пациентов с последствиями позвоночно-спинномозговой травмы.

В публикации (Цымбалюк, Яминский, 2011) представлены результаты применения ЭССМ в лечении больных с застарелым повреждением шейных сегментов спинного мозга. Проанализированы результаты лечения 59 больных, мужчин и женщин в возрасте от 9 до 50 лет. В исследование были включены пациенты, оперированные в позднем периоде травматической болезни спинного мозга (3 месяца после травмы и более). Изучено влияние ЭССМ на восстановление движений, коррекцию болевого синдрома и спастичности, улучшение контроля функции мочевого пузыря в зависимости от длительности существования травмы спинного мозга и ее тяжести. Восстановление и улучшение движений в верхних конечностях отмечено у 94,9% больных, восстановление движений в нижних конечностях – у 10,2%, их улучшение – у 11,9%. Функция ходьбы восстановлена у 8,5% больных, улучшилась – у 3,4%. Хорошие результаты от-

носителем коррекции невропатического болевого синдрома достигнуты у 6 больных из 7, спастичности – у 9 больных из 11, улучшение функции мочевого пузыря отметили 39 из 59. Результаты восстановления функций спинного мозга при использовании метода эпидуральной электростимуляции прямо пропорциональны тяжести и длительности существования его повреждения.

Е.Ю. Шапкина использует ЭССМ как компонент сложной методики нейрореабилитации больных с вертеброгенными миелопатиями (Шапкина, 2007), включающей в себя также проприоспинальную стимуляцию, динамическую тренировку вертикальной позы, тредмил-терапию, тетрапедальную ходьбу и лечебную гимнастику. Автор сообщает о том, что за период наблюдений при исходно полных плегиях восстановление разной степени компенсации локомоторных возможностей достигнуто у 71% пациентов, при неполных плегиях улучшение двигательных функций наблюдалось у всех пациентов.

Длительный опыт применения ЭССМ на обширной группе больных с нейро-ортопедическими проблемами, воспалительными заболеваниями и травмами позвоночника обобщен в публикациях А.Н. Макаровского с соавторами (Макаровский и др., 1999, 2010, 2012а,б; Макаровский, 2004). В публикациях проанализированы результаты ЭССМ, полученные в период с 1986 по 2012 г. на более чем 500 спинальных больных в возрасте от 3 до 70 лет с тяжестью неврологических нарушений А-В-С по шкале ASIA (American Spinal Injury Association)¹. С целью отработки конкретных приемов, методик, параметров в различные периоды времени выделялись целевые группы больных. Среди них – разработка методов лечения больных с нарушением функций мочевого пузыря, двигательных и сенсорных расстройств, лечения спастического синдрома, эпидурального лекарственного электрофореза и другие. Для ЭССМ больным на дорсальную поверхность твердой мозговой оболочки в области шейного, поясничного утолщений, конского хвоста спинного мозга пункционно имплантировались от двух до шести электродов. Оптимальная локализация электродов и алгоритм их использования определялись в соответствии с методическими рекомендациями МЗРФ (Макаровский и др., 1998), разработанными в период исследований, и зависели от уровня поражения структур спинного мозга. Авторы детально проанализировали этапы применения ЭССМ. На первом этапе лечения для пациентов с выраженными спинномозговыми расстройствами ASIA тип А-В-С (парез, плегия, поперечное поражение спинного мозга) эпидуральная стимуляция осуществлялась на уровне шейного и поясничного утолщений в течение 30–40 дней ежедневно (по 30–180 минут 1–2 раза в день с частотой 0,3–1 Гц и 12,67–77 Гц). Такое воздействие способствует, прежде всего, снятию явлений парабиоза, стимуляции спинальной и периферической гемодинамики, улучшению функционального состояния проводящих систем спинного мозга. На втором этапе восстановительного лечения авторы считают целесообразным применение эпидурально-мышечной стимуляции в течение двух-трех месяцев. Для этого используется подача одиночных или двойных прямоугольных биполярных электрических стимулов, прикладываемых последовательно к шейному утолщению, в зону поражения, к пояс-

¹ Исследования проведены на базе ФГБУ «СПб НИИФ» МЗ РФ.

ничному утолщению спинного мозга и его конскому хвосту. Далее последовательно возбуждаются передние, боковые или задние группы мышц бедер, а затем голеней пачками стимулов, вызывающих координированные мышечные сокращения. Таким образом, осуществляется вызов нисходящей по двигательным трактам к исполнительному аппарату конечностей волны возбуждения, имитирующей «бегущую волну». У пациентов с последствиями вертебро-спинальной травмы (ПВСТ) первичный положительный эффект отмечен в среднем спустя 2–3 месяца. Больные туберкулезным спондилитом имели практически одинаковые сроки улучшения, но в сравнении с группой ПВСТ более ранние. Третий этап, амбулаторный период лечения, связан с курсами поддерживающей ЭССМ. Для этого электроды имплантируются на уровнях C5-7, Th10-Th12 и L1-5, вовлекая в лечебный процесс как шейное и поясничное утолщения спинного мозга, так и его конский хвост.

Авторы проанализировали влияние частоты ЭССМ на эффективность воздействия. Показано, что антиспастическим, анальгезирующим действием обладает как воздействие в диапазоне 12,67–77 Гц, так и 0,3–0,5 Гц. Сочетанное длительное воздействие с частотой 0,5–1 и 12,67 Гц у больных с умеренно выраженным спастическим синдромом, а также при вялых парезах или плеггии, способствует улучшению периферического кровообращения конечностей, активации и расширению объема произвольных движений, восстановлению функций мочевого пузыря (общий эффект лечения расстройств функции тазовых органов в различных группах спинальных больных составил 60–74% на фоне воздействий 0,5–1 Гц и 67–77 Гц на конский хвост и поясничное утолщение), потенции (более 40% опрошенных), позитивные изменения психоэмоционального фона (более 80% наблюдений). В 5% случаев placebo-эффект оказался положительным.

В целом эти выводы согласуются с результатами, полученным другими авторами в других клиниках. Диапазон используемых частот находится в промежутке от 1 до 130 Гц. Ни в одной из приведенных публикаций нет обоснования использования той или иной частоты и длительности стимуляции. Интенсивность стимуляции, как правило, либо была жестко задана без какого-либо обоснования, либо авторы определяли амплитуду стимулирующего тока по мере переносимости электрического тока пациентами. Длительность курса ЭССМ также не определена однозначно. По данным цитированных авторов, эффективность ЭССМ для конкретного больного определяется в течение первых 10–14 дней курса. В случае, если была выявлена положительная динамика в ответ ЭССМ, то она проявлялась на протяжении всего курса, который составлял от 3 недель до 4 лет. С абсолютной уверенностью можно считать, что ЭССМ в приведенном диапазоне безопасна для человека.

Среди публикаций, посвященных применению ЭССМ в восстановительной терапии, находится публикация С. Харкема с соавторами (Harkema et al., 2011). Описан случай пациента с клинически полным перерывом спинного мозга. При электрической стимуляции L1–S1 сегментов спинного мозга (5–40 Гц) в сочетании с локомоторными тренировками на беговой дорожке в условиях внешней поддержки веса тела на протяжении 7 месяцев привели к тому, что пациент на фоне непрерывной ЭССМ был способен самостоятельно стоять и облегчать выполнение шагательных движений с внешней поддержкой по движущейся ленте тренажера, кроме того у пациента появлялась возможность выполнять произвольные движе-

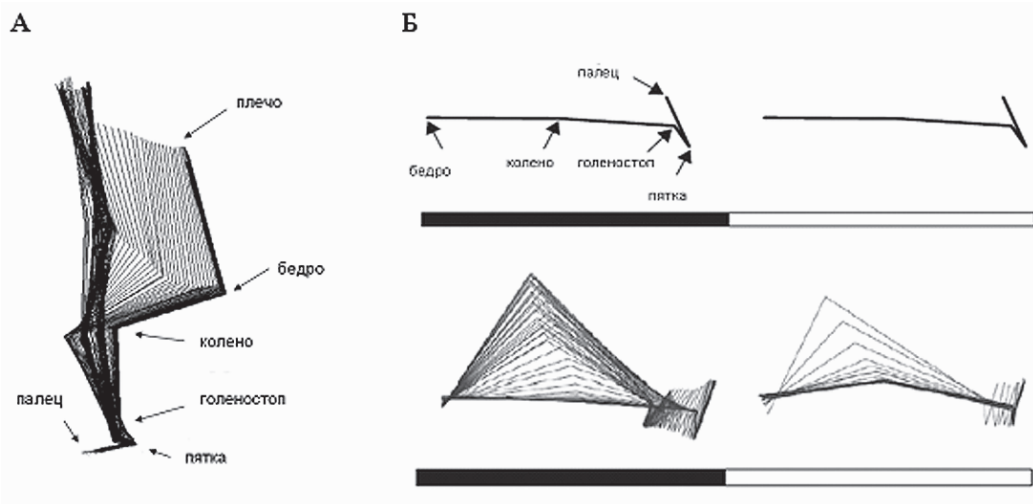


Рис. 3. Реконструкция произвольных движений пациента

А – переход из положения «сидя» в положение «стоя» без внешней поддержки веса тела во время стимуляции сегментов L4-S1. Б – левая нога пациента в положении «лежа», вверху – без стимуляции, внизу – стимуляция сегментов L4-S1, **черная полоска – команда «согнуть ногу», белая полоска – команда «расслабить ногу».** Цит. по (Harkema et al., 2011)

ния в различных суставах ног (рис. 3). Возможность восстановления произвольных движений при стимуляции спинного мозга у пациентов с клинически полным поражением спинного мозга также показана в недавно опубликованной работе (Angeli et al., 2014).

Положительный эффект сочетания ЭССМ с локомоторными тренировками подтверждает исследование Т.Р. Мошонкиной с соавторами (2012). Было проведено сравнительное исследование двигательной активности, вызванной ЭССМ одного и двух сегментов спинного мозга у спинальных пациентов. Клинические исследования проведены на четырех пациентах обоего пола с патологией шейного, грудного, поясничного отделов. Показано, что одновременная стимуляция люмбальных (L2-L4) и сакральных (S2) сегментов облегчает возникновение двигательных паттернов ЭМГ активности мышц ног. В случае сочетания ЭССМ с локомоторными тренировками в ЭМГ возникают двигательные паттерны, характеризующих шагание в норме, и тоническая активность мышц, необходимая для поддержания равновесия тела.

Таким образом, ЭССМ эффективна при терапии хронических болевых синдромов, спастичности и в комплексном лечении патологии спинного мозга разной этиологии. Побочные действия ЭССМ в указанном диапазоне не описаны. Локализация стимулирующих электродов определяется уровнем поражения; эффективная частота ЭССМ находится в диапазоне 1–130 Гц, курс ЭССМ от 3 недель до 4 лет. Параметры ЭССМ все авторы, практикующие врачи, подбирали эмпирически, не обосновывая их клиническими или лабораторными исследованиями.

4. Исследование механизмов инициации локомоторной активности при эпидуральной стимуляции спинного мозга

Как было отмечено выше, параметры восстановительной ЭССМ подбирают эмпирически. На выбор параметров ЭССМ, необходимых пациенту с конкретной патологией, требуется время, в то время как многие авторы отмечают, что эффективность ЭССМ тем выше, чем быстрее после операции она была начата (Тома и др., 2010; Макаровский и др., 2012а). Таким образом, исследования, проведенные на животных с повреждениями спинного мозга, моделирующими патологию, должны предшествовать применению ЭССМ в лечебных мероприятиях, выбор параметров ЭССМ должен быть объективно обоснован.

ЭССМ, используемая в клинических целях, получила неожиданное развитие в контексте изучения локомоции, после того как было показано, что приложение эпидуральной стимуляции к задней поверхности спинного мозга на уровне сегмента L2 может вызывать у спинальных больных ритмические движения ног (Dimitrijevic et al., 1998; Sharkova, Schomburg, 2000; Герасименко, 2002). Этот феномен, породивший много споров об адекватности данного метода для активации ГШД у человека, ставит необходимость проведения экспериментов на интактном спинном мозге и выяснения механизмов влияния ЭССМ на двигательные функции спинного мозга. Такая возможность была реализована на модели мезэнцефалической кошки. Основное преимущество данной модели состоит в сохранности мезэнцефалической локомоторной области ствола головного мозга и отсутствии спонтанной локомоторной активности, обусловленной гипоталамической локомоторной областью, мешающей изучению стимуляционных воздействий (Шик и др., 1966).

На модели децеребрированной кошки проводилось картирование дорсальной поверхности спинного мозга для определения наиболее эффективного сегмента для вызова локомоторной активности (Лавров, 2002; Герасименко и др., 2003; Мусиенко, 2005). Последовательно стимулировали L3-L7 сегменты спинного мозга. Использовали импульсы тока длительностью 0,5 мс, амплитудой от 0–100 мкА и частотой следования импульсов 0,5–100 Гц. Картирование спинного мозга проводилось в росто-каудальном и медиолатеральном направлениях. При стимуляции L2 сегмента у всех животных вызывалась только тоническая активность в мышцах задних конечностей. Стимуляция сегмента L3 могла вызывать локомоторную активность, однако она возникала после довольно длительной фазы тонического сокращения мышц (15–20 с). Наиболее легко локомоция вызывалась при расположении электрода на уровне L4-5 сегмента.

При стимуляции этих сегментов локомоторная активность появлялась практически без фазы тонической активации мышц, а порог вызова локомоции был наиболее низким. Стимуляция более каудальных сегментов L6, L7 не приводила к появлению ритмической активности, вызывая только тоническую активацию мышц задних конечностей. Сравнительный анализ зоны L3 и L4 для запуска локомоторной активности выявил следующие особенности. Оказалось, что если время формирования ритмической активности в проксимальных мышцах (*m. quadriceps* и *m. semitendinosus*) при стимуляции этих локусов практически не отличалось, то в дистальных мышцах (*m. tibialis ant.* и *m. gastrocnemius*) латентный период появления ритмики укорачивался приблизительно

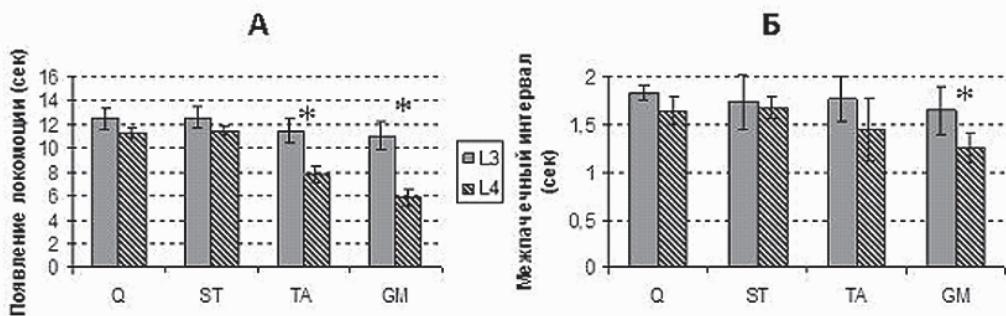


Рис. 4. Гистограммы зависимости времени появления ритмической активности в мышцах от уровня стимуляции спинного мозга (А), величины средних интервалов между соседними ЭМГ пачками для мышц нижних конечностей (Б), показаны доверительные интервалы ($p=0,05$). Q – m. quadriceps, ST – m. semitendinosus, TA – m. tibialis anterior, GM – m. gastrocnemius

в два раза при стимуляции L4 в сравнении с L3 (рис. 4). При этом частота следования пачек ЭМГ активности в данных мышцах была выше по сравнению с ритмической активностью, опосредуемой стимуляцией вышележащего сегмента L3 (рис. 4Б).

Дополнительным аргументом в пользу большей эффективности области сегмента L4 в инициации локомоторной активности служат данные об эффектах последствия стимуляции. Если после прекращения эпидуральной стимуляции на уровне L3, локомоторная активность продолжала продуцироваться еще в течение 3–4 с, то после прекращения стимуляции на уровне L4 сегмента, длительность ее последствия была в 2–3 раза больше (рис. 5). Феномен продолжения локомоторной активности после выключения стимуляции свидетельствует о циклической активации внутриспинальной нейронной сети, входящей в состав ГЩД.

Дополнительные аргументы в пользу ведущей роли сегментов L4-L5 в формировании шагательного паттерна были получены при проведении дополнительной математической обработки (Богачева и др., 2005; Богачева, 2006). При помощи преобразования Гильберта были построены огибающие сигналов ЭМГ, поскольку именно огибающие отражают мышечные усилия (Андреева, Хуторская, 1987). При сравнении кросскорреляционных функций (ККФ) ЭМГ с сигналами стимула было установлено, что в случаях стимуляции сегментов L2, L3, L6 наблюдаются значимые пики на ККФ, частота появления которых точно соответствует частоте стимуляции, а в случае L4, когда возможно появление локомоции, пики на ККФ на частоте стимуляции становятся незначимыми и возникает гармоника 0,9–1,0 Гц, соответствующая частоте шагания. Кросскорреляционный анализ связи сигналов ЭМГ с сигналами стимула показывает, что эта связь, значимая для случаев со стимуляцией сегментов L2 и L6, ослабевает в случае L4 (рис. 6). Это означает, что возникающая локомоторная активность при стимуляции L4-L5 сегментов осуществляется не по типу стимул–ответ, а за счет генерации собственного внутриспинального ритма, опосредованного активацией генератора шагательных движений.

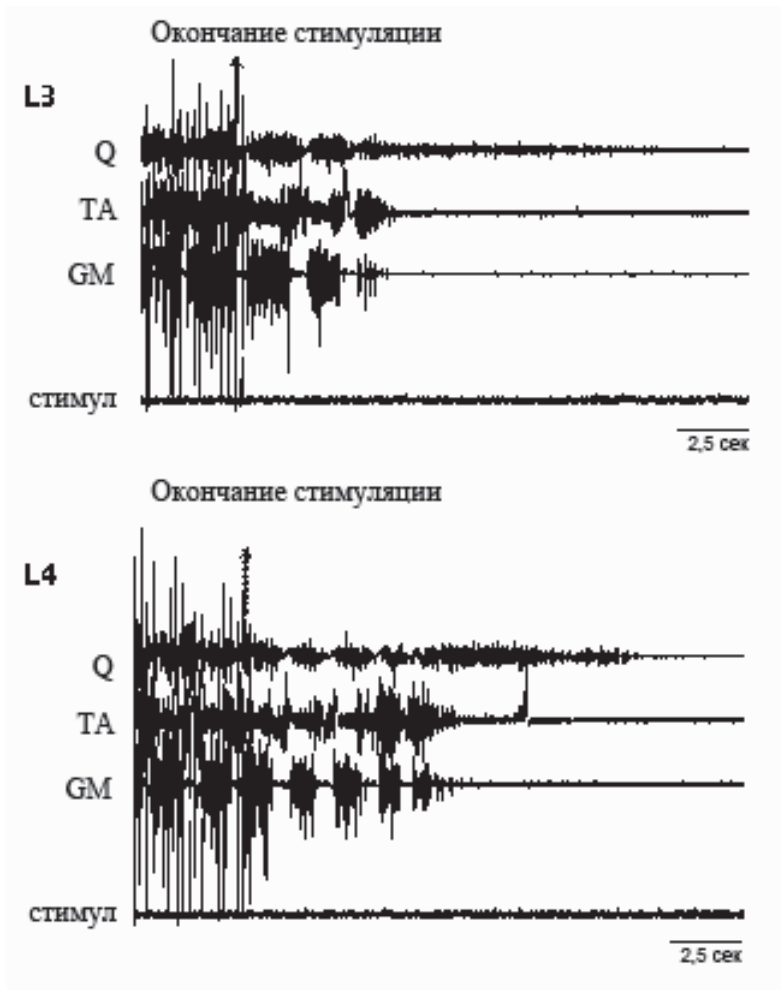


Рис. 5. «Эффект последействия» при эпидуральной стимуляции на уровне сегментов L3 и L4. Обозначения те же, что на рис. 4

Итак, наиболее эффективной зоной для вызова локомоторной активности является область, расположенная на уровне L4 сегмента. Далее было исследовано, на какие параметры стимулирующих воздействий оптимально отвечает система.

Эффект частоты стимуляции исследовали в серии экспериментов с использованием фиксированной интенсивности стимулирующего воздействия, равной двум порогам, для рефлекторных ответов мышц задних конечностей на стимулы, прикладываемые к дорсальной поверхности спинного мозга на уровне L4. Было установлено, что формирование локомоторной активности происходит при частоте стимуляции 5–10 Гц. При более низкой частоте (1–2 Гц) локомоторная активность не вызывается, как правило, на каждый стимул формируются отдельные ответы. Вместе с тем было отмечено, что даже на одиночную стимуляцию рефлекторные ответы в мышцах-антагонистах возникают

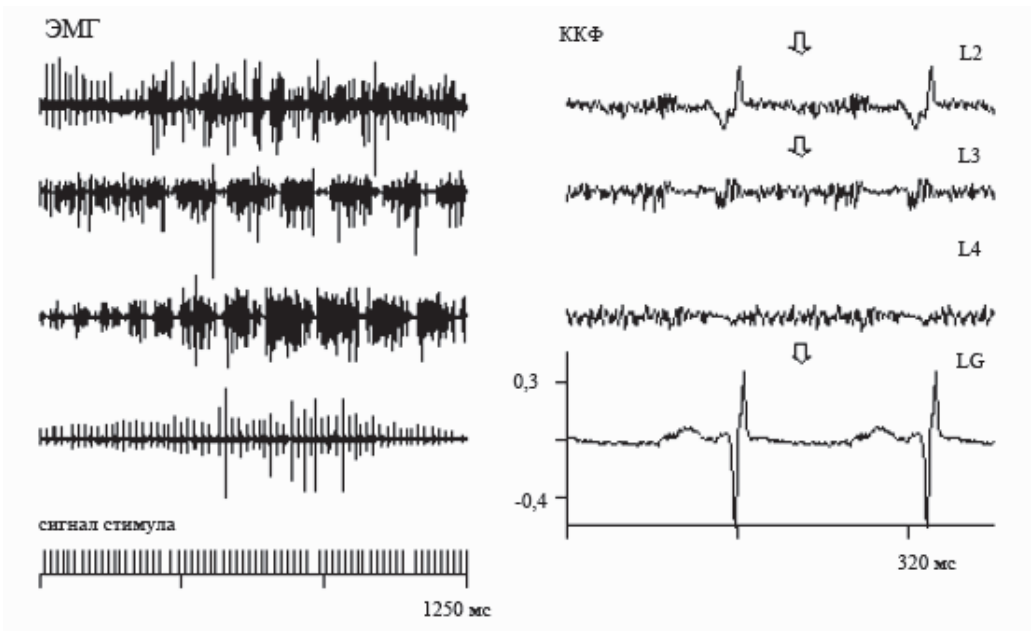


Рис. 6. Слева паттерны ЭМГ-активности, зарегистрированные при эпидуральной стимуляции сегментов L2, L3, L4, L6. Справа кросскорреляционные функции (ККФ) паттернов активности и сигналов стимула.

Стрелки – значимые пики, соответствующие частоте стимуляции

реципрокно. Это говорит о том, что при низкочастотной стимуляции можно подобрать параметры стимуляции, вызывающие локомоторную активность. При использовании частоты стимуляции свыше 20 Гц локомоторная активность быстро угасает и для ее поддержания требуется повышение интенсивности стимула (рис. 7). Тот факт, что эф-

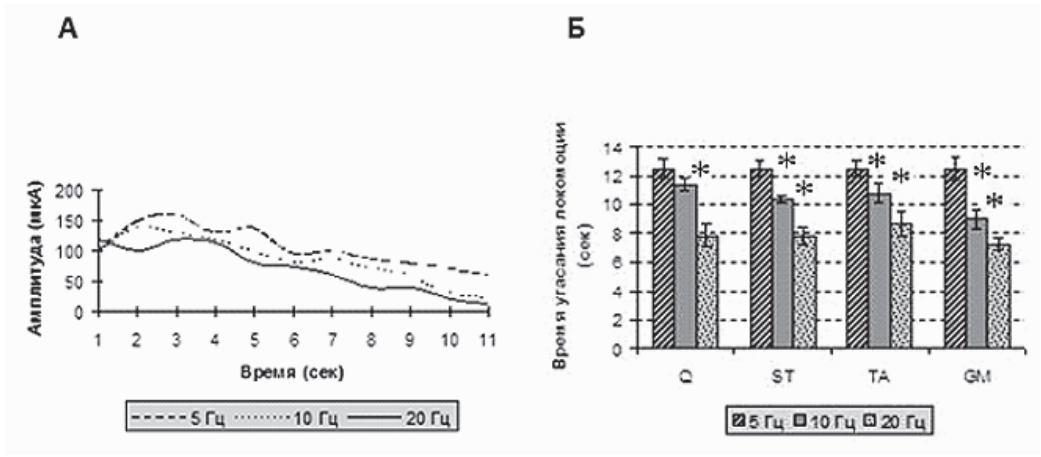


Рис. 7. А – изменение амплитуды пачечной активности для *m. gastrocnemius* при различных частотах эпидуральной стимуляции сегмента L4. Б – длительность угасания ритмической активности при разных частотах эпидуральной стимуляции

фekt последствия выражен значительно сильнее при стимуляции 5 Гц, также доказывает, что данная частота стимуляции является более эффективной для активации ГШД.

Рассмотрение автокорреляционных функций ЭМГ, зарегистрированных при различных частотах стимуляции (1–20 Гц), выявляет в случае стимуляции 5 Гц четко выраженную частоту, отвечающую частоте шагания, а связь со стимулом в этом случае становится незначимой (рис. 8). Это свидетельствует об эффективности данной частоты в запуске ГШД, продуцирующего шагательный паттерн в присутствии ему ритме.

Ю.П. Герасименко с соавторами (Gerasimenko et al., 2008), анализируя случаи применения ЭССМ в клинике, делают вывод о том, что за последнее десятилетие был достигнут значительный прогресс в использовании ЭССМ для восстановления функции поддержки веса тела и передвижения у пациентов с тяжелыми повреждениями спинного мозга, не способных самостоятельно стоять и ходить. Этот прогресс обусловлен, главным образом, достижениями, полученными в экспериментах с лабораторными животными, имеющими полное пересечение спинного мозга на среднем грудном уровне и у людей с полным перерывом спинного мозга. Рис. 9, взятый из упомянутого обзора, иллюстрирует сходство локомоторных нейронных сетей (ГШД) у человека и животных.

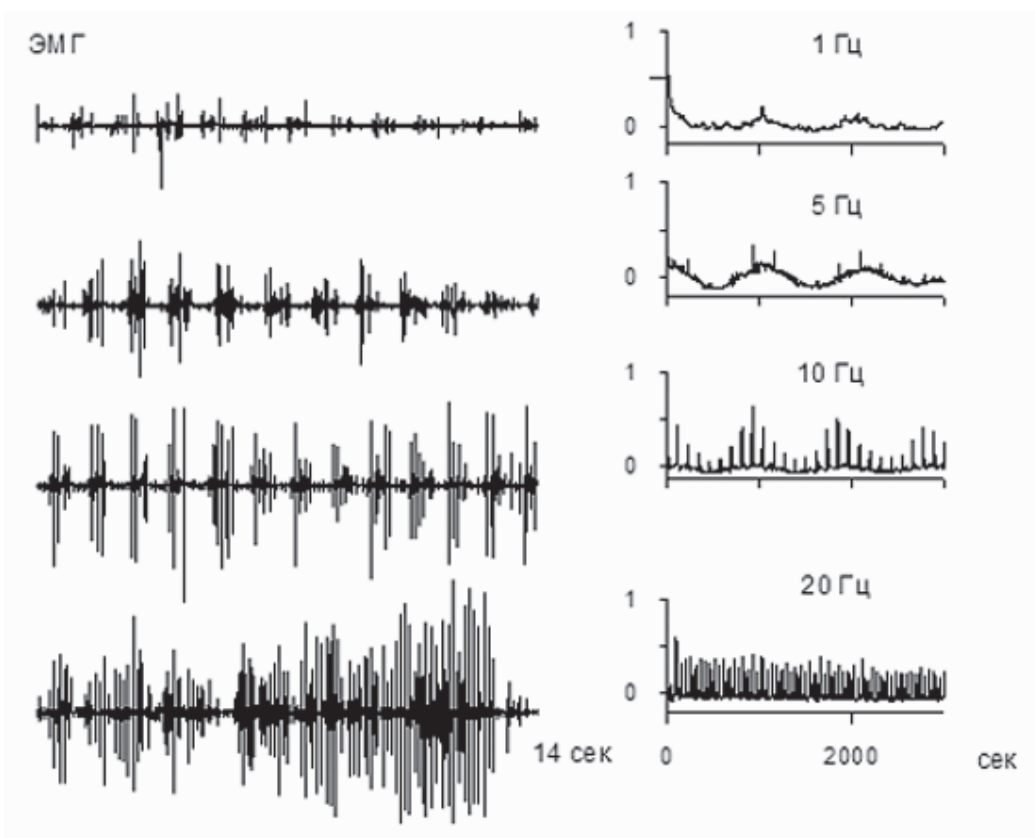


Рис. 8. Паттерны ЭМГ-активности при различных частотах эпидуральной стимуляции сегмента L4 (слева) и их автокорреляционные функции (справа)

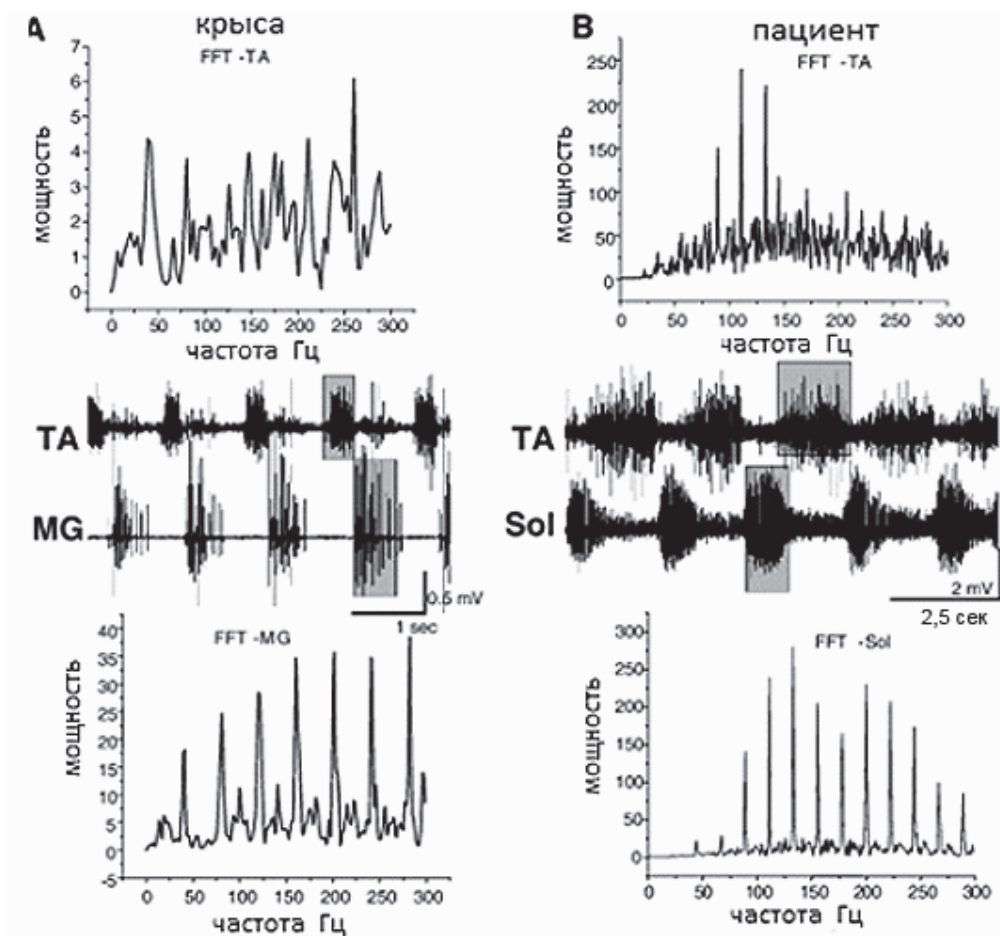


Рис. 9. Спектральные характеристики мышц сгибателя (TA) и разгибателя (MG) у спинальной крысы (A) и мышц сгибателя (TA) и разгибателя (Sol) ноги пациента с полным перерывом спинного мозга (B) во время шагоподобной активности, вызванной ЭССМ (S1, 40 Гц для крысы и L2, 25 Гц для человека)

Спектральный анализ получен быстрым Фурье-преобразованием. Цит. по (Gerasimenko et al., 2008)

С тех пор появились новые исследования, позволившие определить структуры спинного мозга, стимуляция которых инициирует поддержку веса тела. В условиях гравитационного поля земли ходьба, как и другие произвольные движения, не могут осуществляться только за счет ритмичных движений конечностей. Поддержка веса тела, позы является обязательным компонентом активных движений. Позная компонента локомоции также утрачивается в отсутствие супраспинальных влияний.

Одним из достижений последних лет является то, что в спинном мозге были определены места, электрическая стимуляция которых приводит к появлению функции поддержки веса тела, эти локусы находятся в сакральном отделе спинного мозга (рис. 10).

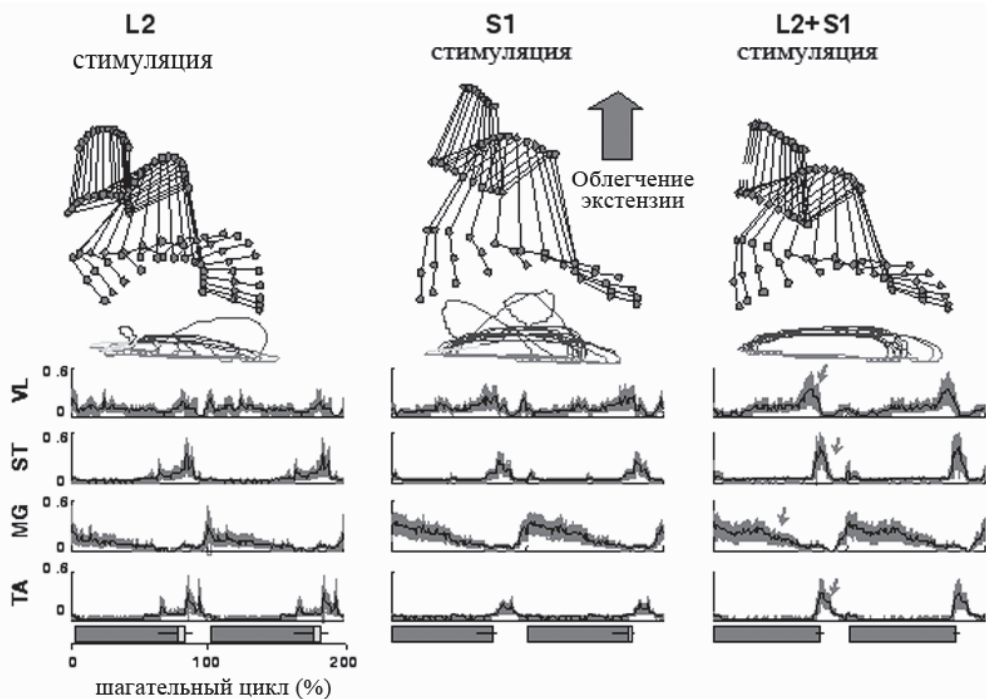


Рис. 10. Эффект одновременной эпидуральной стимуляции L2 и S1 сегментов спинного мозга крысы, спинализированных на уровне Th9

Вверху – реконструкция движений суставов задней конечности по видеозаписи, временные срезы. Средний ряд – реконструкция траектории движений стопы, демонстрирует положение стопы во время фазы опоры и фазы переноса. Нижний ряд – суммарные интегрированные электромиографические записи четырех мышц задней конечности: VL – vastus lateralis; ST – semitendinosus; MG – medial gastrocnemius; TA – tibialis anterior

Стрелками показаны пачки ЭМГ-активности, возникающие при одновременной стимуляции L2+S1. Внизу – продолжительность шагательного цикла с фазой опоры (серый) и фазой переноса (белый). Цит. по (Courtine et al., 2009)

В экспериментах на взрослых крысах, хронически спинализированных на нижнегрудном уровне (Th9), исследовались эффекты одновременной электрической эпидуральной стимуляции нескольких сегментов спинного мозга для инициации локомоторного поведения. Селективная электрическая стимуляция с частотой 40 Гц поясничного L2 сегмента, в котором локализован генератор шагательных движений, вызывала шагательную ритмику в задних конечностях. Как было сказано выше, сегмент спинного мозга L2, **хоть и не является оптимальным для вызова локомоции на модели децеребрированной кошки** (интактный спинной мозг), но при его стимуляции также может быть вызвана ходьба. То же можно сказать и про высокие частоты стимуляции. 5 Гц – это та частота, при которой ритмические локомоторные движения вызываются наименьшими токами, однако и высокие частоты могут вызывать локомоцию при больших амплитудах стимула. На экспериментальной модели крысы с хронической перерезкой спинного мозга частота 40 Гц и сегмент L2 оказались оптимальными для вызова локомо-

ции. Однако вызванные шагоподобные движения осуществлялись с волочением стопы и без поддержки веса тела (отсутствовала фаза опоры). Электрическая стимуляция с частотой 40 Гц области локализации моторных пулов мышц-разгибателей (крестцовый S1 сегмент) вызывала ритмическую активность в задних конечностях с преимущественной активацией экстензорных мышц (разгибателей) и появление выраженной фазы опоры. Одновременная стимуляция L2 и S1 сегментов значительно улучшала качество шагательных движений. Крысы демонстрировали хорошо координированную локомоторную активность с правильной постановкой стопы (см. рис. 9) (Courtine et al., 2009).

Позднее на крысах с полной перерезкой спинного мозга было показано, что уже через неделю после перерезки мозга при стимуляции L2 и S1 сегментов и одновременном фармакологическом воздействии (активация серотониновых рецепторов) животные способны были шагать по движущейся ленте тренажера, самостоятельно поддерживая вес тела; при этом кинематические характеристики суставов конечностей практически не отличаются от этих характеристик у нормальных животных (Герасименко и др., 2011а,б).

Таким образом, можно считать доказанным, что электрическая стимуляция поясничного отдела спинного мозга является неспецифическим активатором локомоторных генераторов. Исследования, проведенные на экспериментальных животных, показали, что структурами спинного мозга, оптимальными для вызова локомоции, являются сегменты L2-L4, для поддержания веса тела – сегменты S1-S2. Частота ЭССМ 5 Гц является эффективной для вызова движений на модели децеребрированной кошки (интактный спинной мозг в отсутствие супраспинальных влияний). Частота ЭССМ 40 Гц эффективна для вызова локомоции и поддержки веса тела на модели спинальной крысы (полный перерыв спинного мозга в нижегрудной области).

5. Неинвазивная стимуляция спинного мозга для вызова шагательных движений

Методически ЭССМ состоит в том, что на твердую мозговую оболочку (*dura mater*) спинного мозга помещают электроды, соединенные проводами со стимулятором и потом по определенной программе осуществляют стимуляцию. Стимуляция называется эпидуральной по локализации электродов. Круг технических проблем, связанных с реализацией ЭССМ у людей, обширен. С одной стороны, трудоемкость и стоимость ЭССМ как медицинской процедуры велика, с другой стороны, существуют пациенты, которым ЭССМ показана по клиническим показателям, но невозможно провести эту процедуру из-за сопутствующих заболеваний и/или социальных причин. Таким образом, необходимо найти неинвазивные способы стимуляции спинного мозга.

Известно, что транскраниальная электромагнитная стимуляция способна глубоко проникать и активировать нейроны в различных участках головного мозга (Hallett, 2000). Было предложено использовать это свойство магнитной стимуляции и попытаться активировать шагательный генератор у здорового человека при помощи электромагнитной стимуляции спинного мозга. Сущность нового способа стимуляции спинного мозга состоит в электромагнитном воздействии на спинной мозг в области

Т11-Т12 грудных позвонков человека, лежащего на боку, с ногами, подвешенными на рамах-качелях; стимуляция переменным электромагнитным полем с магнитной индукцией 2,0–2,5 Тл, с частотой 3–5 Гц, в течение 10–20 с, индуктором, наложенным на кожу над заданными позвонками, вызывает движение ног (рис. 11) (Герасименко и др., 2010).

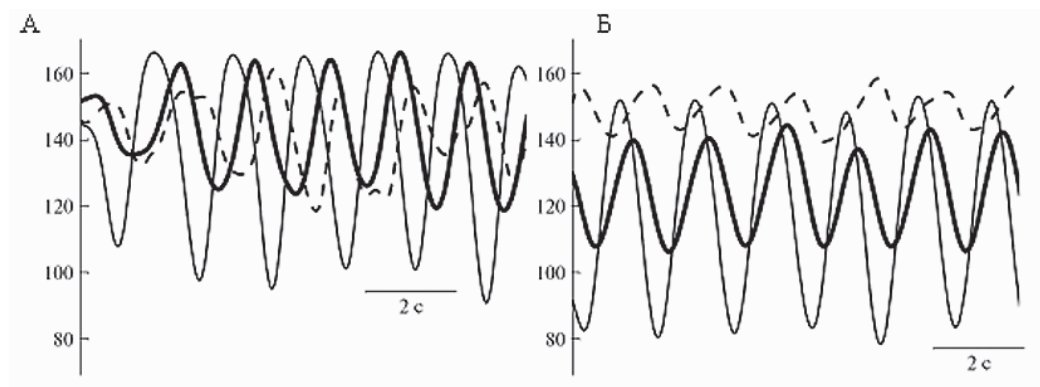


Рис. 11. Движения суставов правой ноги человека, вызванные электромагнитной стимуляцией (А) и произвольные движения (Б)

Показаны изменения углов в тазобедренном (толстая линия), коленном (тонкая линия) и голеностопном (пунктирная линия) суставах. Положительные углы соответствуют сгибанию в суставе. По оси ординат – шкала в угловых градусах. Цит. по (Городничев и др., 2010)

Исследования были проведены на здоровых испытуемых (Городничев и др., 2010). Из 65 обследованных здоровых испытуемых только у 7 человек можно было вызвать произвольные движения. Эти движения можно охарактеризовать как шагательные движения, для них характерно ритмичное чередование сгибаний и разгибаний в суставах, движения в противофазе в тазобедренном и голеностопном суставах, движения в противофазе в коленном суставе правой и левой ноги. При плацебо-тестировании (испытуемый слышал звуковые щелчки, сопровождающие магнитную стимуляцию, но электромагнитное воздействие отсутствовало) шагательные движения не вызывались – это доказывает, что движения, вызванные электромагнитной стимуляцией у здоровых испытуемых, были произвольными.

Еще одним доказательством возможности активации спинальных генераторов с помощью электромагнитного воздействия являются результаты исследований на экспериментальной модели децеребрированной кошки (Муслиенко и др., 2013). Магнитная стимуляция шейного утолщения с частотой 3–5 Гц вызывала шагательные движения у 100% животных, в то время как стимуляция поясничного утолщения – лишь у 30% животных. Движения задних конечностей при магнитной стимуляции были сопоставимы с движениями, вызываемыми ЭССМ поясничного утолщения: наблюдается хорошая ходьба, перемещения суставов координированы, а записи электрической активности мышц доказывают, что вызванные движения были шагательными. Следует отметить, что при магнитной стимуляции и шейного и поясничного отделов в ходьбу вовлекались

все четыре конечности (квадрипедальная ходьба), при ЭССМ в ходьбу вовлекались только задние конечности.

Таким образом, существует неинвазивный доступ к локомоторным спинальным нейрональным сетям у человека и животных с помощью электромагнитной стимуляции структур спинного мозга; электромагнитная стимуляция способна инициировать произвольные, автоматические по своей природе шагательные движения у человека. Однако этот способ стимуляции не во всех случаях приводит к активации шагательного генератора (10% успешных случаев в исследованиях на здоровых испытуемых, 30% – на лабораторных животных). Еще одно ограничение электромагнитной стимуляции спинного мозга относится к техническим возможностям стимулятора. Один из самых мощных современных магнитных стимуляторов, используемых в клинике (Magstim Rapid, UK), позволяет задать только короткую экспозицию стимулирующего воздействия. При параметрах магнитной стимуляции, необходимых для запуска шагания (частота 5 Гц, интенсивность 1,5 Тл), электромагнитный индуктор позволяет осуществлять воздействия не дольше 15 с. Таким образом, электромагнитная стимуляция спинного мозга – возможный способ неинвазивной стимуляции спинного мозга, однако имеющий целый ряд недостатков. При электромагнитной стимуляции поясничного утолщения движения вызывали только у одного испытуемого из десяти. Невозможно обеспечить локальную стимуляцию единственного сегмента спинного мозга и, кроме того, современная техника может обеспечить воздействие не дольше 15 с, в то время как для достижения эффекта необходимы сеансы длительностью не менее 2 мин.

Недавно был продемонстрирован другой неинвазивный способ стимуляции спинного мозга. В работе (Du et al., 2010) были опубликованы результаты исследования рефлексов спинного мозга, вызванных чрескожной стимуляцией спинного мозга (ЧССМ) здоровых испытуемых и пациентов с поражениями на уровне шейного или грудного отделов спинного мозга. Накожно, между остистыми отростками Th11 и Th12 размещали активный электрод, пассивные электроды располагали на гребнях подвздошных костей. Стимулы представляли собой одиночные монофазные прямоугольники длительностью 1 мс. Интенсивность стимула, как пишут авторы, подбирали такую, которая вызывала рефлекторные ответы во всех регистрируемых мышцах в положении стоя (пациентам обеспечивали поддержку веса тела), эта величина зависела от комплекции человека. В группе здоровых добровольцев эта величина составила 9,5–66 мА, в группе пациентов – 26,8–83 мА. В статье показаны результаты исследования рефлексов спинного мозга, вызванных ЧССМ, полученные на большой группе испытуемых: 9 здоровых (мужчины и женщины) и 9 пациентов (мужчины). Так как авторы не пишут о том, что были испытуемые, у которых ЧССМ не вызывала рефлексов спинного мозга, можно считать, что ЧССМ обладает 100-процентной эффективностью.

Наши собственные исследования на здоровых добровольцах показали, что ЧССМ в области Th11-Th12 позвонков с частотой 5–40 Гц вызывает ритмические движения ног. Однако такая стимуляция малоэффективна и плохо воспроизводима из-за болезненности стимулов: пороговые значения амплитуды стимулов для вызова движений больше или совпадают с порогом кожной болевой чувствительности. В этой серии экспериментов были использованы стимулы, такие же, как применяются при ЭССМ, такие же,

как были использованы для регистрации рефлексов в цитированной выше публикации (Dy et al., 2010), прямоугольные, монополярные.

В 50-х годах прошлого столетия стала популярной электрическая стимуляция с применением переменного тока в киллогерцовом диапазоне (Ward, Shkuratova, 2002; Ward, 2009). Такое воздействие обеспечивало глубокую стимуляцию мышц и нервов. Коц с коллегами подобрали режим стимуляции, приводящий к увеличению мышечной силы до 40%, и использовали его в подготовке элитных спортсменов. Было показано, что оптимальным является режим 10/50/10 (10 с стимуляции, 50 с перерыв, 10 мин стимуляции) при частоте 2,5 кГц (Коц, Хвилон, 1971; Андрианова и др., 1971). Чрескожная стимуляция нервов токами высокой частоты обеспечивает хороший результат в случае острой и хронической боли разного происхождения. Метод клинически доказан, используется в повседневной практике физиотерапевтами, другими специалистами и известными атлетами по всему миру (Long-Sun, 2005; Mello et al., 2011).

Стимуляция спинного мозга прямоугольными биполярными стимулами в виде меандров с несущей частотой 10 кГц (Васильев и др., 1997) была апробирована на здоровых испытуемых-добровольцах. Оказалось, что такие стимулы безболезненны в исследуемом диапазоне и вызывают произвольные шагательные движения (Городничев и др., 2012; Герасименко и др., 2013).

В экспериментах с ЧССМ человека размещали в положении лежа на боку, с ногами, подвешенными в рамках-качелях; электроды накладывали на кожу над позвонками (Т11–Т12). Движения вызывали прямоугольными биполярными стимулами длительностью 0,5–1 мс, заполненными несущей частотой 10 кГц, с интенсивностью стимуляции от 30 до 100 мА. Частота стимуляции составляла 1–40 Гц, длительность воздействия 10–30 с. Эффективными для вызова шагательных движений оказались частоты от 5 до 40 Гц. В записях электрической активности мышц, сделанных во время вызванных произвольных движений, хорошо заметны чередование сокращений одноименных мышц правой и левой ног, а также чередование активности мышц-антагонистов бедра и голени (прямая и двуглавая мышцы бедра, большеберцовая и икроножная мышцы голени), как и при произвольных шагательных движениях (рис. 12).

Непроизвольные движения ног, вызываемые ЧССМ, полностью соответствовали характеристикам шагательных движений. Как хорошо видно на кривых, отражающих изменения углов в тазобедренном, коленном и голеностопном суставах, движения в этих суставах, как произвольные, так и вызванные ЧССМ, сгибания и разгибания в суставах правой и левой ног также проходили со сдвигом фаз (см. рис. 12). При высокой частоте стимуляции (30–40 Гц) амплитуда вызванных шагательных движений, как правило, была больше, чем при меньших частотах, хотя длительность шагательного цикла по сравнению с низкочастотной стимуляцией (5 Гц) изменялась незначительно. Такой широкий диапазон частот, эффективных для вызова шагания, вероятно, может обуславливаться функциональным состоянием интактного спинного мозга и его проводящих путей. У спинальных пациентов, например, эффективная частота для вызова шагательных движений при эпидуральной стимуляции находится в диапазоне 30–40 Гц (см. выше).

Были проведены экспериментальные исследования эффективности неинвазивной многоканальной чрескожной электростимуляции спинного мозга в регуляции

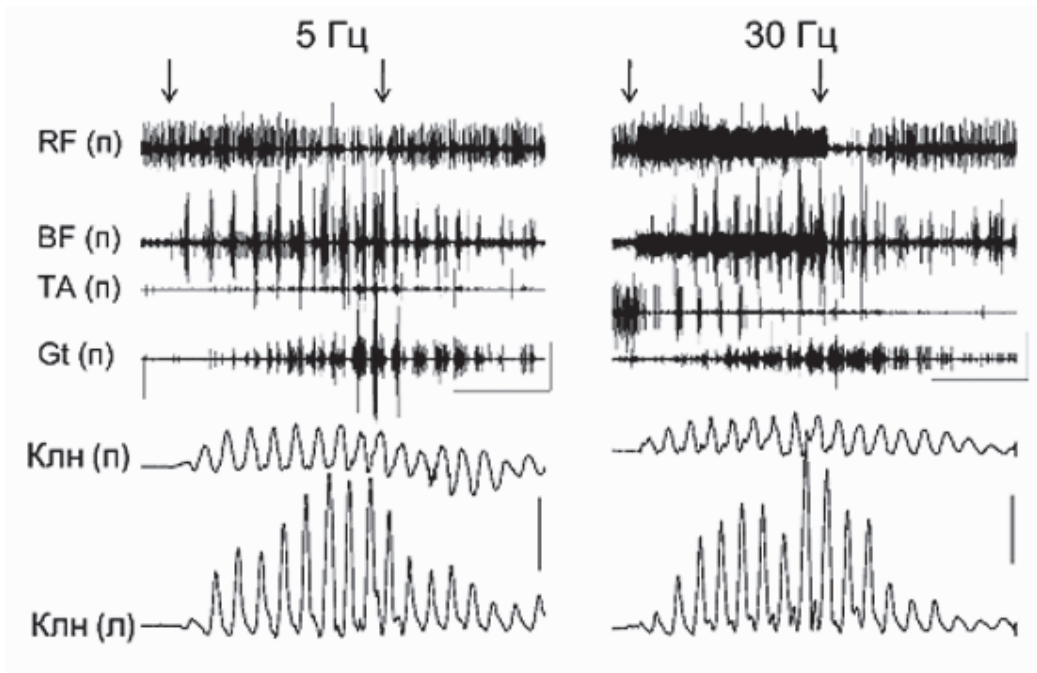


Рис. 12. Электрическая активность мышц ног и движения в суставах ног при ЧССМ с частотами 5 и 30 Гц. ЭМГ-записи мышц бедра и голени правой ноги и гониограммы коленных суставов правой и левой ног

Стрелки вверх – начало и конец стимуляции; горизонтальная и вертикальная метки рядом с ЭМГ – 10 с и 0,5 мВ, соответственно; вертикальная метка справа от гониограмм – 200 мВ. Клн – колено; RF – m. rectus femoris; BF – m. biceps femoris; TA – tibialis anterior; Gt – gastrocnemius; (п) – справа; (л) – слева

шагательных движений. Проводили ЧССМ на одном уровне, поочередно стимулируя спинной мозг в области C5, T11, L2 позвонков; стимулировали два уровня спинного мозга (T11+C5 или T11+L2); стимулировали три уровня спинного мозга, начиная с уровня T11, потом последовательно добавляли стимуляцию L2 и C5. Заметно два факта.

Во-первых, многоканальная стимуляция спинного мозга увеличивает амплитуду вызванных движений. Так как синхронизация каналов стимулятора была организована таким образом, чтобы стимулы по каждому из каналов следовали с минимальной задержкой друг относительно друга, то этот эффект не может быть следствием суммарного увеличения стимулирующего тока при одновременном воздействии, а, по всей видимости, является следствием одновременной активации разных нейронных сетей спинного мозга. Кроме того, увеличение амплитуды движений при одновременной стимуляции поясничного и шейного отделов по сравнению с одиночной стимуляцией поясничного отдела даже у тех испытуемых, у которых стимуляция шейного отдела не вызывала движений, говорит о том, что при мультисегментарной стимуляции спинного мозга происходит не линейное сложение результатов отдельных видов воздействия, а преумножение результатов, синергия.

Во-вторых, мультисегментарная стимуляция спинного мозга приводит к увеличению вероятности вовлечения в движение голеностопного сустава. При стимуляции одного или двух уровней голеностопный сустав принимает участие в вызванном движении с вероятностью 0–50%. При тройной стимуляции голеностопный сустав был вовлечен в движение в 100% случаев, в половине случаев амплитуда движений в голеностопном суставе была больше, чем при двойной стимуляции.

Рис. 13 иллюстрирует описанные эффекты мультисегментарной стимуляции на примере результатов, полученных методом электромиографии, и при регистрации изменений углов в коленных суставах обеих ног с помощью гониометров. Справа представлены стик-диаграммы, рассчитанные на основе данных, полученных при анализе результатов видеорегистрации движений. Заметно нарастание амплитуды движений в суставах при многоканальной стимуляции, а также увеличение активности мышц при увеличении количества стимулируемых сегментов спинного мозга.

Полученные результаты позволяют сделать заключение о возможности целенаправленного управления шагательными движениями, вызванными ЧССМ, при стимуляции разных отделов спинного мозга поочередно или синхронно.

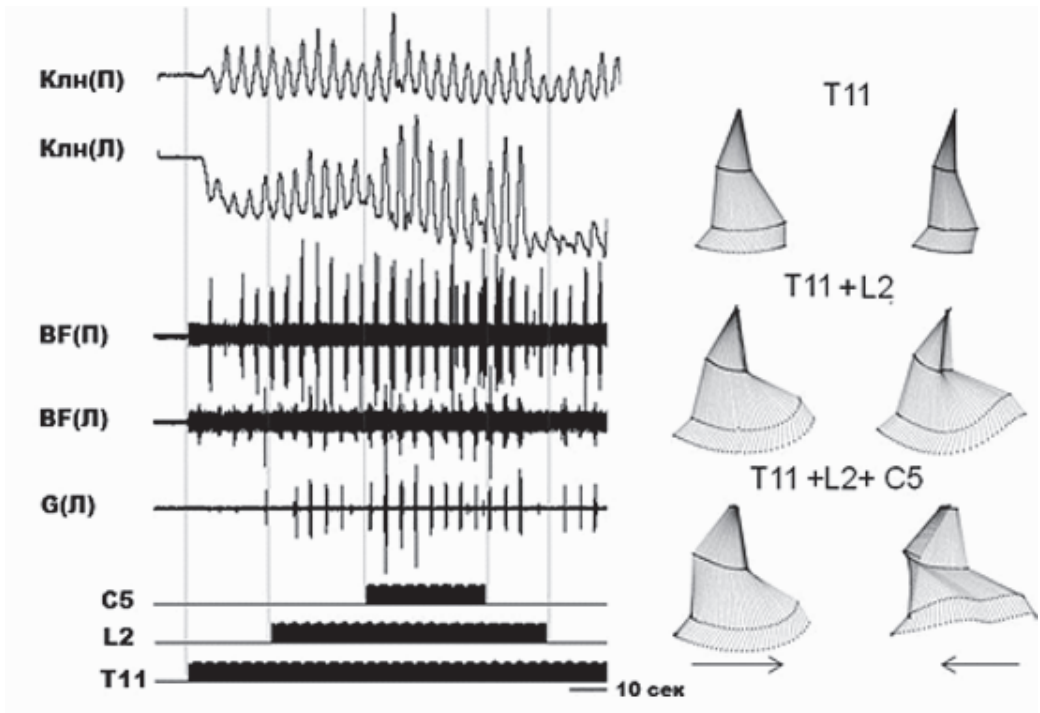


Рис. 13. Изменение двигательной активности ног в зависимости от способа ЧССМ. Испытуемый А.Б.

Вверху – изменение угла в коленных суставах (Клн) правой (П) и левой (Л) ног. Ниже – ЭМГ-активность, зарегистрированная в *m. gastrocnemius* (G) левой ноги и *m. biceps femoris* (BF) обеих ног. Ниже – отметки стимуляции (C5, L2, T11 соответствуют позвонкам, в области которых размещали активные электроды). Справа – стик-диаграммы, показывающие координацию движений в суставах правой ноги при движении ноги назад и вперед, вызванных разными способами ЧССМ

6. Заключение

Клиническая практика показала, что электрическая стимуляция спинного мозга эффективна при терапии хронических болевых синдромов, спастичности и в комплексном лечении патологии спинного мозга разной этиологии. Ряд работ убедительно доказывает, что электрическая стимуляция спинного мозга может приводить к восстановлению функции поддержки веса тела и появлению произвольных движений даже у пациента с полным перерывом спинного мозга.

Исследования, проведенные на лабораторных животных с повреждениями спинного мозга, моделирующими патологию, убедительно показали, что электрическая стимуляция поясничного отдела спинного мозга является неспецифическим активатором генераторов шагательных движений. Локусом спинного мозга, оптимальным для вызова локомоции, являются сегменты L2-L4, для поддержания веса тела – сегменты S1-S2.

Значительная трудоемкость и большая стоимость электрической эпидуральной стимуляции спинного мозга как медицинской процедуры накладывают ограничения на применение инвазивной стимуляции. Чрескожная электрическая стимуляция спинного мозга традиционными прямоугольными монополярными стимулами малоэффективна и плохо воспроизводима из-за болезненности стимулов. Применение сложного по форме электрического стимула вместо прямоугольного привело к неинвазивному воздействию на спинной мозг и позволило увеличивать интенсивность воздействия, чтобы добиться двигательного ответа. Это открывает хорошую перспективу широкого использования методики чрескожной электрической стимуляции спинного мозга в реабилитационном лечении нарушенных двигательных функций после повреждения спинного мозга. Результаты исследования эффекта мультисегментарной чрескожной стимуляции спинного мозга на здоровых испытуемых позволяют сделать заключение о возможности целенаправленного управления шагательными движениями, вызванными ЧССМ, стимулируя разные отделы спинного мозга поочередно или синхронно.

Результаты теоретического исследования рекомендуются для реабилитационного лечения пациентов с вертебро-спинальной патологией.

Литература

- Андреева Е.А., Хуторская О.Е. Спектральный метод анализа электромиографической активности мышц. М.: Наука, 1987.
- Андрианова Г.Г., Коц Я.М., Мартынов В.А., Хвилон В.А. Применение электростимуляции для тренировки мышечной силы // Новости медицинского приборостроения. 1971. № 3. С. 40-47.
- Богачева И.Н. Нейрональные механизмы формирования локомоторного паттерна при электрической стимуляции спинного мозга. Автореф. дисс. канд. мед. наук. СПб., 2006.
- Богачева И.Н., Кучер В.И., Щербакова Н.А. и др. Математическое моделирование процессов формирования локомоторных паттернов при эпидуральной стимуляции спинного мозга с учетом периферической обратной связи // Биофизика. 2005. Т. 50. № 6. С. 1125-1130.
- Васильев Д.Р., Ескин А.Е., Казанцев Ю.И., Сачков А.В., Ушаков А.А. Устройство для воздействия электрическим током. RU Патент 2090215, 20 09 1997.
- Герасименко Ю.П., Генераторы шагательных движений человека: спинальные механизмы их активации // Авиакосмическая и экологическая медицина. 2002. Т. 36. № 3. С. 14-24.

- Герасименко Ю.П., Лавров И.А., Богачева И.Н. и др.* Особенности формирования локомоторных паттернов у децеребрированной кошки при эпидуральной стимуляции спинного мозга // Росс. физиол. журнал им. И.М. Сеченова. 2003. Т. 89. № 9. С. 1046-1057.
- Герасименко Ю.П., Городничев Р.М., Авелев В.Д. и др.* Способ стимуляции спинного мозга. RU Патент 2393885, 10 07 2010.
- Герасименко Ю.П., Мусиенко П.Е., Мошонкина Т.Р., Макаровский А.Н.* Способ моделирования и обучения лечению больных с хроническим поражением спинного мозга. RU Патент 2418319, 10 05 2011а.
- Герасименко Ю.П., Мусиенко П.Е., Мошонкина Т.Р. и др.* Способ моделирования хронического поражения спинного мозга и обучение его лечению на мелких лабораторных животных. RU Патент 2411589, 10 02 2011б.
- Герасименко Ю.П., Городничев Р.М., Щербакова Н.А. и др.* Способ электрической стимуляции спинного мозга. RU Патент 2471518, 10 01 2013.
- Городничев Р.М., Мачуева Е.М., Пивоварова Е.А. и др.* Новый способ активации генераторов шагательных движений у человека // Физиология человека. 2010. Т. 36. № 6. С. 95-103.
- Городничев Р.М., Пивоварова Е.А., Пухов А. и др.* Чрескожная электрическая стимуляция спинного мозга: неинвазивный способ активации генераторов шагательных движений у человека // Физиология человека. 2012. № 2. С. 46-56.
- Зеелигер А., Мельник Н.Ю.* Длительная эпидуральная электростимуляция как метод лечения хронических болевых синдромов // Нейрохирургия. 2009. № 2. С. 39-43.
- Исагулян Э.Д.* Хроническая электростимуляция спинного и головного мозга в лечении нейрогенных болевых синдромов. Дисс. канд. мед. наук. М., 2006.
- Коц Я.М., Хвилон В.А.* Тренировка мышечной силы методом электростимуляции // Теория и практика физической культуры. 1971. № 4. С. 66-73.
- Лавров И.А.* Механизмы активации генераторов шагательных движений у децеребрированных и спинализированных кошек при электрической стимуляции спинного мозга. Автореф. дисс. канд. мед. наук. СПб., 2002.
- Макаровский А.Н.* Комплексное хирургическое лечение больных со спинномозговыми расстройствами при туберкулезном спондилите и последствиях вертебро-спинальной травмы. Автореф. дисс. докт. мед. наук. СПб., 2004.
- Макаровский А.Н., Гарбуз А.А., Герасименко Ю.П.* Методические рекомендации N 96/269. М.: Министерство здравоохранения РФ, 1998.
- Макаровский А.Н., Гарбуз А.Е., Герасименко Ю.П.* Эпидуральный электрод. RU Патент 97119571, 27 08 1999.
- Макаровский А.Н., Герасименко Ю.П., Олейник В.В.* Эпидуральная электростимуляция спинного мозга в диагностике и лечении спинальных больных старших возрастных групп // Профилактическая и клиническая медицина МЗ и Соц. развития РФ. 2010. С. 83-188.
- Макаровский А.Н., Герасименко Ю.П., Олейник В.В., Мошонкина Т.Р., Решетнева Е.В.* Клинические аспекты восстановления функций спинного мозга у больных с вертебро-медуллярным конфликтом на фоне эпидуральной электростимуляции // Высокие технологии, исследования, образование в физиологии, медицине и фармакологии. 2012а. Т. 1. С. 262-258.
- Макаровский А.Н., Олейник В.В., Балькин Ю.М., Герасименко Ю.П.* Эпидуральная многоканальная электростимуляция спинного мозга в системе хирургического лечения вертеброгенных спинномозговых расстройств // Вестник Ульяновского университета. 2012б. № 3. С. 63-68.
- Медведев С.В., Пузенко В.Ю., Гурчин Ф.А.* Электростимуляция спинного мозга. // Электрическая стимуляция мозга и нервов человека, Л.: Наука, 1990. С. 156-192.
- Мошонкина Т.Р., Макаровский А.Н., Богачева И.Н. и др.* Эффекты электрической стимуляции спинного мозга у пациентов с вертебро-спинальной патологией // Бюлл. exper. биол. и мед. 2012. Т. 153. № 1. С. 21-26.
- Мусиенко П.Е.* Механизмы регуляции локомоторной активности кошки при нарушенном супраспинальном контроле. Автореф. дисс. канд. мед. наук. СПб., 2005.
- Мусиенко П.Е., Богачева И.Н., Савахин А.А. и др.* Инициация локомоторной активности у децеребрированных и спинальных кошек при неинвазивной чрескожной электрической стимуляции спинного мозга // Росс. физиол. журнал им. И.М. Сеченова. 2013. Т. 99. № 8. С. 917-927.

- Нинель В.Г., Лившиц Л.Я., Меламуд Э.Е. Электростимуляция спинного мозга как метод лечения хронических нейрогенных болевых синдромов туловища и конечностей. Саратов, 2006.
- Тома А.И., Нинель В.Г., Норкин И.А., Тома Г.В., Смолькин А.А. Возможности электронейростимуляции у пострадавших с позвоночно-спинномозговыми повреждениями // Травматология и ортопедия России. 2010. Т. 56. № 2. С. 72-75.
- Усиков В.В., Усиков В.Д. Первичная инвалидность от изолированной травмы позвоночника в структуре повреждений опорно-двигательной системы по данным ВТЭК // Плановые оперативные вмешательства в травматологии и ортопедии: предоперационное обследование и подготовка больных, осложнения, исходы. 1992. С. 66-68.
- Цивьян Я.Л. Повреждения позвоночника. М.: Медицина, 1971.
- Цымбалюк В.И., Яминский Ю.Я. Применение метода эпидуральной электростимуляции в восстановительном хирургическом лечении больных с последствиями травматического повреждения шейных сегментов спинного мозга // Украинский нейрохирургический журнал. 2011. Т. 53. № 1. С. 36-43.
- Шабалов В.А. Функциональная нейрохирургия. Лечение тяжелых болевых синдромов // Клиническая неврология. 2004а. С. 403-419.
- Шабалов В.А., Томский А.Л., Декопов А.Я., Исагулян Э.Д. Возможности хронической электростимуляции спинного мозга в лечении спастического синдрома // First International Scientific Distance Congress on Spine and Spinal Cord Surgery «InterSpine=2004». 2004б.
- Шабалов В.А., Декопов А.В., Трошина Е.М. Хроническая эпидуральная электростимуляция поясничного утолщения спинного мозга для коррекции спастического синдрома // Нейрохирургия. 2005. № 3. С. 47-50.
- Шапков Ю.Т., Шапкова Е.Ю., Мушкин А.Ю. Способ лечения больных с поражением спинного мозга. RU Патент 2130326, 20 05 1999.
- Шапкова Е.Ю. Нейрореабилитация при миелопатиях, вызванных туберкулезом и другими заболеваниями позвоночника // Проблемы туберкулеза. 2007. Т. 84. № 1. С. 49-54.
- Шапкова Е.Ю., Мушкин А.Ю., Гуторко В.А. Способ лечения больных с хроническим поражением спинного мозга. RU Патент 2204423, 20 05 2003.
- Шик М.Л., Северин Ф.В., Орловский Г.Н. Управление ходьбой и бегом посредством электрической стимуляции среднего мозга // Биофизика. 1966. Т. 11. № 5. С. 659-666.
- Angeli, C.A., Edgerton, V.R., Gerasimenko, Y.P., Harkema S.J. Altering spinal cord excitability enables voluntary movements after chronic complete paralysis in humans // Brain. 2014. Vol. 137. № 5. P.1394-1409.
- Arshavsky Y.I., Gelfand I.M., Orlovsky G.N. The cerebellum and control of rhythmical movements // Trends Neurosci. 1983. Vol. 6. P. 417-422.
- Bantli H., Bloedel J.R., Long D.M., Thienprasit P. Distribution of activity in spinal pathways evoked by experimental dorsal column stimulation // J. Neurosurg. 1975. Vol. 42. P. 290-295.
- Barolat G., Myklebust J., Weninger W. Effects of spinal cord stimulation of spasticity and spasms secondary to myelopathy // Appl. Neurophysiol. 1988. Vol. 51. P. 29-44.
- Bayoumi A., Ashby A. Projections of group Ia afferents to motoneurons of thigh muscles in man // Experimental Brain Res. 1989. Vol. 76. P. 223-228.
- Beric A., Dimitrijevic M.R., Sharkey P.C., Sherwood A.M. Cortical potentials evoked by epidural stimulation of the cervical and thoracic spinal cord in man // Electroencephalogr Clin. Neurophysiol. 1966. Vol. 65. P. 102-110.
- Coburn B. A theoretical study of epidural electrical stimulation of the spinal cord. Part II. Effects on long myelinated fibers // IEEE Transactions on Biomedical Engineering. 1985. Vol. 32. P. 978-986.
- Coburn B., Sin W.K. A theoretical study of epidural electrical stimulation of the spinal cord. Part I. Finite element analysis of stimulus fields // IEEE Transactions on Biomedical Engineering. 1985. Vol. 32. P. 971-977.
- Cook A.W., Weinstein S.P. Chronic dorsal column stimulation in multiple sclerosis. Preliminary report // NY State J. Med. 1973. Vol. 73. №24. P. 2868-2872.
- Courtine G., Gerasimenko Y., Van den Brand R. et al. Transformation of nonfunctional spinal circuits into functional states after the loss of brain input // Nature Neuroscience., 2009. Vol. 12. № 10. P. 1333-1342.

- Dimitrijevic M.R., Faganel J.* Motor control in the spinal cord // *Recent Achievements in Restorative Neurology*. 1. Upper Motor Neuron Functions and Dysfunctions, Karger. 1985. P. 150-162.
- Dimitrijevic M., Gerasimenko Yu., Pinter M.* Evidence for a spinal central pattern generator in humans // *Ann. NY Acad. Sci.* 1998. Vol. 860. P. 360.
- Dy C., Gerasimenko Y., Edgerton V.R., Dyhre-Poulsen P., Courtine G., Harkema S.* Phase dependent modulation of percutaneously elicited multisegmental muscle responses after spinal cord injury // *J. Neurophysiology* 2010. Vol. 103. № 5. P. 2808-2820.
- Gerasimenko Yu.P., Makarovskiy A.N.* Neurophysiological evaluation of the effects of spinal cord stimulation in spinal patients // *Motor Control* VII. 1996. P. 153-157.
- Gerasimenko Yu., Garbuz A., Makarovskiy A., Shapkov Yu.* Effects of spinal cord stimulation on posture and gait in spinal patients // *Posture and Gait: Control Mechanisms*. 1992. P. 372-375.
- Gerasimenko Yu.P., Avelev V.D., Nikitin O.A., Lavrov I.A.* Initiation of locomotor activity in spinal cats in conditions of epidural stimulation of the spinal cord // *Ros. Fiziol. Zh. im. I. M. Sechenova*. 2001. Vol. 87. № 9. P. 1164-1170.
- Gerasimenko Y., Roy R.R., Edgerton V.R.* Epidural stimulation: Comparison of the spinal circuits that generate and control locomotion in rats, cats and humans // *Experimental Neurology*. 2008. Vol. 209. P. 417-425.
- Hallett M.* Transcranial magnetic stimulation and the human brain // *Nature*. 2000. Vol. 406. P. 147.
- Harkema S., Gerasimenko Y., Hodes J. et al.* Effect of epidural stimulation of the lumbosacral spinal cord on voluntary movement, standing, and assisted stepping after motor complete paraplegia: a case study // *Lancet*. 2011. Vol. 377. P. 1938-1947.
- Hause L.* A mathematical model for transmembrane potentials secondary to extracellular fields // *Electroanesthesia: Biomedical and Biophysical Studies*, NY.: Academic Press, 1975. P. 176-210.
- Hunter J.P., Asby P.* Segmental effects of epidural spinal cord stimulation in humans // *J. Physiol.* 1994. Vol. 3. P. 407-418.
- Ichiyama R.M., Gerasimenko Y.P., Zhong H., Roy R.R., Edgerton V.R.* Hindlimb stepping movements in complete spinal rats induced by epidural spinal cord stimulation // *Neurosci Lett*. 2005. Vol. 383. P. 339-344.
- Illis L.S., Sedgwick E.M., Oyar A.E., Awadalla M.A.S.* Dorsal column stimulation in the rehabilitation of patients with multiple sclerosis // *Lancet*. 1976. Vol. 307. No 7974. P. 1383-1386.
- Law J.D.* Spinal stimulation: Statistical superiority of monophasic stimulation of narrowly separated, longitudinal bipoles having rostral cathodes // *Appl. Neurophysiol.* 1983. Vol. 46. P. 129-137.
- Lazorthes Y., Verdie J.-C.* Spinal cord stimulation for neuropathic pain // *Handbook of Clinical Neurology*. 2005. P. 121-153.
- Levy W.J. Jr, York D.H.* Evoked potentials from the motor tracts in humans // *Neurosurgery*. 1983. Vol. 12. № 4. P. 422-429.
- Lloyd D.P.C., McIntyre A.K.* Dorsal column conduction of group I muscle afferent impulses and their relay through Clarke's column // *J. Neurophysiol.* 1950. Vol. 13. № 1. P. 39-54.
- Long-Sun Ro.* Neuropathic Pain: Mechanisms and Treatments // *Chang. Gung. Med. J.* 2005. Vol. 28. P. 597-605.
- Machida M., Weinstein S.L., Yamada T., Kimura J.* Spinal cord monitoring. Electrophysiological measures of sensory and motor function during spinal surgery // *Spine*. 1985. Vol. 10. P. 407-413.
- Mailis A., Ashby P.* Alterations in group Ia projections to motoneurons following spinal lesions in humans // *J. Neuroph.* 1990. Vol. 64. P. 637-647.
- Meglio M., Cioni B., Dal Lago A.* Pain control and improvement of peripheral blood flow following epidural spinal cord stimulation // *J. Neurosurg.* 1981. Vol. 54. № 6. P. 821-823.
- Mello L.F.D., Nóbrega L.F., Lemos A.* Transcutaneous electrical stimulation for pain relief during labor: a systematic review and meta-analysis // *Rev Bras Fisioter.* 2011. Vol. 15. № 3. P. 175-184.
- Ohnishi A., O'Brien P.C., Okazaki H., Dyck P.J.* Morphometry of myelinated fibers of fasciculus gracilis of man // *J. Neurol. Sci.* 1976. Vol. 27. № 2. P. 163-172.
- Pinter M., Gerstenbrand F., Dimitrijevic M.R.* Epidural electrical stimulation of posterior structures of the human lumbosacral cord: control of spasticity // *Spinal Cord*. 2000. Vol. 38. № 9. P. 524-531.
- Ranck J.B.* Which elements are stimulated in electrical stimulation of the mammalian central nervous system: a review // *Brain Res.* 1975. Vol. 98. P. 417-440.

- Sedan R., Bourhis A., Regis H.* La stimulation électrique du cône médullaire dans les vessies neurologiques // Neurochirurgie. 1974. Vol. 20. № 2. P. 93-116.
- Shapkova E.Y., Schomburg E.D.* Two types of motor modulation underlying human stepping evoked by spinal cord electrical stimulation (SCES) // Acta Physiologica et Pharmacologica Bulgarica. 2000. Vol. 26. № 3. P. 155-157.
- Shealy C.N., Mortimer J.T., Reswick J.B.* Electrical inhibition of pain by stimulation of the dorsal columns: Preliminary clinical report // Anesth. Analg. Cleveland. 1967. Vol. 46. P. 489-491.
- Shimoji K., Shimizu H., Maruyama Y., Matsuki M., Kurirayashi H., Rjioka H.* Dorsal column stimulation in man: facilitation of primary afferent depolarization // Anaesthesia Analgesia. 1982. Vol. 61. P. 410-413.
- Siegfried J.* Neurostimulation methods for correcting functional imbalances // Principles and Practice of Restorative Neurology, Oxford. 1992. P. 166-176.
- Siegfried J., Krainick J.-U., Haas H., Adorjani C., Meyer M.* Thoden. Electrical spinal cord stimulation for spastic movement disorders // Appl. Neurophysiol. 1977. Vol. 41. P. 134-141.
- Swiontek T., Thomas J., Sances A. et al.* Spinal cord implant studies // IEEE Transactions on Biomedical Engineering. 1976. Vol. 23. P. 307-312.
- Tallis R., Illis L., Sedgwick E.* The quantitative assessment of the influence of spinal cord stimulation on motor function in patients with multiple sclerosis // Disability & Rehabilitation. 1983. Vol. 5. № 1. P. 10-16.
- Waltz J.M.* Computerized percutaneous multi-level spinal cord stimulation in motor disorders // Appl. Neurophysiol. 1982. Vol. 45. P. 73-92.
- Ward A.R.* Electrical stimulation using kilohertz-frequency alternating current // Phys. Ther. 2009. Vol. 89. P. 181-190.
- Ward A.R., Shkuratova N.* Russian electrical stimulation: the early experiments // Phys. Ther. 2002. Vol. 82. P. 1019-1030.
- Young R.F.* Evaluation of dorsal column stimulation in the treatment of chronic pain // Neurosurgery. 1978. Vol. 3. P. 373-379.

Часть II

РАССЕЯННЫЙ СКЛЕРОЗ

Рассеянный склероз: патогенез, диагностика и лечение

*А.Г. Габиров, О.О. Фаворова, О.Г. Кулакова, А.Н. Бойко,
А.А. Белогуров, Н.А. Пономаренко*

Содержание

1. Введение
2. Эпидемиология, клиника и диагностика РС
 - 2.1. Эпидемиология РС
 - 2.2. Клиника РС
 - 2.3. Диагностика РС
3. Наследственные и внешние факторы в этиологии РС
4. Патогенез рассеянного склероза: аутоиммунное воспаление и нейродегенерация при рассеянном склерозе
 - 4.1. Активация аутореактивных клеток
 - 4.2. Проникновение аутореактивных клеток через ГЭБ
 - 4.3. Патологические иммунные реакции в ткани мозга
 - 4.4. Нейродегенерация
5. Аутоантигены при РС
6. Роль аутоантител в патогенезе РС
 - 6.1. Исследование субстратной специфичности анти-ОБМ аутоантител на модельных пептидах
 - 6.2. Кинетические исследования гидролиза ОБМ и EPeFRET (ОБМ81-103)
7. Современные методы лечения рассеянного склероза
 - 7.1. Препараты β-интерферона (ИФНβ)
 - 7.2. Глатирамера ацетат (Копаксон)
 - 7.3. Митоксантрон
 - 7.4. Препараты моноклональных антител
 - 7.5. Препараты, находящиеся на стадии клинических испытаний при РС

Сокращения: АПК – антиген-презентирующие клетки; БСА – бычий сывороточный альбумин; ВП – вызванные потенциалы; ГА – глатирамера ацетат; ГКГ – главный комплекс гистосовместимости; ГЭБ – гематоэнцефалический барьер; ДК – дендритные клетки; ИЛ – интерлейкин; ИФНβ – интерферон β; ИФНγ – интерферон γ; ЛТ – лимфотоксин; МАГ – миелин-ассоциированный гликопротеин; МКП – микросателлитные повторы; ММП (ММР) – **матриксные металлопротеиназы**; МОГ – **миелинолиго-дендритный гликопротеин**; МРТ – магнитно-резонансная томография; НТФ – нейротрофические факторы; ОБМ (МВР) – основной белок миелина; ОР – относительный риск; ОРЭР – Объединенное Российское исследование эпидемиологии РС; ПЛП – протеолипидный протеин; РС – рассеянный склероз; СМЖ – спинно-мозговая жидкость; ФНО – фактор некроза опухолей; ЦНС – центральная нервная система; ЦСЖ – цереброспинальная жидкость; ЭАЭ – экспериментальный аутоиммунный энцефаломиелит; cPLA2 – фосфолипаза А2; GWAS – полногеномный поиск ассоциаций; МСМС – метод Монте-Карло посредством цепей Маркова; ОНД – остеохондроз; S1P – сфингозин-1-фосфат.

1. Введение

Среди демиелинизирующих заболеваний особое место занимает рассеянный склероз (РС) – хроническое заболевание центральной нервной системы. Этиология рассеянного склероза остается неясной, а наиболее обоснованная теория патогенеза отводит основную роль в разрушении миелина – белково-липидной оболочки аксонов – воспалительному процессу, связанному с аутоиммунными реакциями (Steinman, 1996). В качестве факторов, влияющих на их возникновение, называются как бактериальные и вирусные инфекции, так и наследственная предрасположенность, и даже эколого-климатические условия местности. Однако, несмотря на огромное количество молекулярно-биологических исследований и клинических наблюдений, пока не удалось составить полную и однозначную картину механизма нарушений, лежащих в основе аутоиммунных заболеваний, и РС в частности. Тем не менее, большинство проведенных исследований доказывает, что развитие РС начинается с нарушения базовых механизмов иммунотолерантности, что приводит к активации аутореактивных клонов Т- и В-клеток и, как следствие, к выработке в организме повышенного количества антител к собственным антигенам, т.е. так называемых аутоантител. Существенное значение имеет прогрессирующий нейродегенеративный процесс с поражением нервных волокон и нейронов, механизмы которого также нуждаются в уточнении.

Большинство исследователей отдает ведущую роль в развитии рассеянного склероза аутореактивным клонам CD4+ Т-клеткам, специфичным к набору нейроантигенов (Steinman, 1996). Однако в последние годы было показано, что и аутоантитела могут вносить свой вклад в развитие патологического процесса, способствовать неблагоприятному развитию заболевания. Причина состоит в способности аутоантител связывать широкий спектр существующих в организме антигенов различной химической природы – от ДНК и мембранных белков до фосфолипидов и гепарина. Для них характерна повышенная перекрестная специфичность (полиреактивность), таким образом, одно антитело часто может взаимодействовать с несколькими собственными антигенами. С другой стороны, подобные аутоантитела обладают природной способностью связывать множество компонентов иммунной системы, тем самым обращая их действие против собственного организма, это и является причиной их патогенности. На данный момент не вызывает сомнений, что аутоантитела, вырабатываемые на мажорный компонент миелиновой оболочки – основной белок миелина (ОБМ), являются одним из важных патогенных факторов, влияющих на деградацию нервных волокон при РС (Belogurov et al., 2009a). Структурно-функциональные исследования патогенных аутоантител могут оказаться весьма перспективными как с точки зрения понимания механизмов развития заболевания, разработки новых подходов к терапии и прогнозу, так и для решения фундаментальных вопросов иммунологии (Belogurov et al., 2012).

В последние годы авторам настоящей монографии в рамках программы Президиума РАН «Фундаментальные науки – медицине» удалось достигнуть значительных успехов в исследовании молекулярных механизмов возникновения и развития рассеянного склероза. Открытие каталитической активности миелин-реактивных

иммуноглобулинов (Ponomarenko et al., 2006) и наличие корреляции между абзиматической активностью анти-ОБМ-антител и тяжестью заболевания (Ponomarenko et al., 2006) позволило осуществить целый цикл работ, посвященный роли В-клеток в патогенезе РС. Нами была показана возможность использования сайт-специфической абзиматической активности в качестве нового биомаркера РС (Belogurov et al., 2008). Новые горизонты терапии РС были продемонстрированы в работах А.А. Белогурова и соавторов (Belogurov et al., 2009b, 2013), описывающих доклинические испытания перспективного лекарственного средства на основе иммунодоминантных фрагментов ОБМ, инкапсулированных в малоразмерные маннозилированные липосомы. Альтернативный подход для терапии РС путем селективной элиминации аутореактивных В-клеток описан в работе (Stepanov et al., 2011). В свою очередь, с использованием комбинаторных библиотек переменных фрагментов иммуноглобулинов пациентов с РС впервые в мире удалось продемонстрировать непосредственную связь между рассеянным склерозом и его потенциальным триггером – вирусом Эпштейн-Барр (Gabibov et al., 2011). Развитием этой работы стал структурно-функциональный анализ миелин-реактивных антител, в том числе с использованием широкоформатного секвенирования (Lomakin et al., 2013, 2014). Отдельного упоминания заслуживает открытие убиквитин-независимого внутриклеточного протеолиза ОБМ полноразмерной 26S-протеасомой (Belogurov et al., 2014), что явно свидетельствует о потере контроля системы убиквитинилирования за деградацией этого аутоантигена (Белогуров и др., 2009; Бачева и др., 2009, 2011; Кузина и др., 2013).

2. Эпидемиология, клиника и диагностика РС

Рассеянный склероз (РС) представляет собой тяжелое воспалительное заболевание ЦНС, приводящее к инвалидизации. РС встречается во всем мире, лечение более 2,5 миллионов пациентов требует затрат миллиардов долларов (Amato, 2004; Lundry, Craig, 2006). Только в Европе проживает не менее 400 000 больных РС, а ежегодные затраты на одного больного составляют от 15 до 23,7 тысяч евро, причем большинство расходов – не прямые, растущие по мере утяжеления заболевания (Pugliatti et al., 2006; Rotstein et al., 2006). РС является одной из наиболее социально значимых проблем неврологии, поскольку этим заболеванием страдают в большинстве своем молодые люди, осуществляющие активную трудовую деятельность и социальную жизнь (Гусев и др., 2004а). Более половины больных через 10 лет болезни испытывают трудности в выполнении профессиональных обязанностей, через 15 лет – в самостоятельном передвижении, а при длительности РС более 20 лет – проблемы в самообслуживании (Voiko et al., 1999).

2.1. Эпидемиология РС

За последнее десятилетие проведена большая работа по унификации методов описательного эпидемиологического анализа, методов выявления и классификации

больных РС, что наряду с распространением общепринятых диагностических шкал способствовало накоплению определенного объема объективной информации, позволяющей судить о реальном распространении РС в мире (Гусев и др., 2004а).

Традиционно было принято выделять в мире три зоны, различающиеся по показателю распространенности РС. Зона высокого риска (распространенность более 30 случаев на 100 000 населения) включала Северную и часть Центральной Европы, северные районы США, юг Канады, юг Австралии и Новую Зеландию. Зона среднего риска (от 5 до 29 случаев на 100 000 населения) включала некоторые области Центральной и Северной Европы, Восточную и Южную Европу, юг США и остальную территорию Австралии. Зона низкого риска РС (менее 5 случаев на 100 000 населения) – большинство регионов Центральной и Южной Америки, Азии, Африки и Океании. В связи с общим увеличением количества больных РС в настоящее время чаще используют для характеристики зоны высокого риска РС зону с распространенностью РС выше 50 случаев на 100 000 населения, а для зоны среднего риска – от 50 до 10 случаев на 100 000 населения.

Первые систематические исследования, проведенные в Европе, Северной Америке и Австралии в 1950–1980 гг. позволили сформулировать основные «классические» характеристики распространения РС в мире: 1) болеют преимущественно европеоиды, причем особенно скандинавского происхождения, в то же время, есть этнические группы (майори, эскимосы и народности Крайнего Севера, коренные индейцы и коренные жители центральной Африки), где РС практически не встречается, 2) более высокая частота РС наблюдается в зонах, более удаленных от экватора; для Северного полушария характерен градиент убывания частоты РС «Север–Юг» (расцениваемый в последующем как совокупность географического и этнического факторов), 3) наличие семейного РС (5–10% от всех случаев РС), 4) во всех популяциях у женщин РС встречается несколько чаще, начинается в среднем на 1–2 года раньше, но у мужчин выше вероятность развития неблагоприятного первично-прогрессирующего течения РС, 5) у 60% больных РС начинается в возрасте от 20 до 40 лет, средний возраст клинического начала колеблется в разных популяциях от 29 до 33 лет, 6) изменение частоты РС среди перемещенного населения выявило изменение риска РС при смене зон проживания в зависимости от возраста переезда (до и после 15 лет), 7) описаны «кластеры РС» – зоны резко повышенной частоты РС, и «микрoэпидемии РС» – резкое увеличение заболеваемости РС на ограниченной территории в определенный временной промежуток, 8) в соседних странах и даже регионах в пределах одной страны показатели распространенности и заболеваемости РС могут значительно варьировать, что определяется совокупностью наследственных, внешних и социальных факторов.

С 90-х годов стали накапливаться данные о наличии новых тенденций в эпидемиологии РС. Среди них нужно отметить следующие: стирание традиционного градиента «Север–Юг» в Северном полушарии; выявление РС среди этнических групп, которые ранее считались неподверженными РС; увеличение числа случаев РС в «нетипичных» возрастных группах, т.е. с началом в возрасте моложе 18 и старше 45 лет, причем особенно выросло число больных РС среди детей и подростков; повышение показателей распространенности РС во многих регионах.

В качестве основных причин последней тенденции, т.е. увеличения частоты встречаемости (распространенности) РС, могут выступать как истинное увеличение заболеваемости, так и медико-социальные факторы. К последним относятся прогресс в методах терапии РС, обеспечивший увеличение средней продолжительности жизни больных, и улучшение качества диагностики, что привело и к более ранней постановке правильного диагноза, и к увеличению числа выявленных случаев «мягкого» РС.

Последние 7 лет в России проводится Объединенное Российское исследование эпидемиологии РС (сокращенно ОРЭР) по двум основным направлениям: 1) описательная эпидемиология – анализ распространенности и заболеваемости по единой методологии и 2) аналитическая эпидемиология – единый анализ факторов риска, собранных при аналитических исследованиях по методу случай–контроль (пары больной РС – подобранный контроль, с использованием валидированной анкеты (Riise, Wolfson, 1997).

В настоящее время такие исследования завершены или близки к завершению в более 20 городах России. Особенностью этих исследований является построение по единому дизайну с использованием универсальных методов сбора эпидемиологической информации, единого подхода к диагностике и оценке клинического течения РС, единой структуре анкет и методов статистического анализа. Установлено, что большинство регионов европейской части России относятся к зоне среднего риска развития РС, тогда как в Сибири и на Дальнем Востоке есть области как среднего, так и низкого риска развития РС. Данные по аналитической эпидемиологии приводятся в разделе «Наследственные и внешние факторы в этиологии РС».

2.2. Клиника РС

Специфическим клиническим проявлением РС являются признаки хронического, сначала, как правило, волнообразного, патологического процесса с накапливающимися симптомами поражения нескольких проводящих систем центральной нервной системы (ЦНС). Очаги демиелинизации (бляшки) могут возникать в разных отделах ЦНС у одного и того же больного в различное время; причем со временем происходит накопление симптомов поражения (так называемая диссеминация «в месте» и «во времени»). РС характеризуется множеством клинических форм и вариантов течения, характеризующихся различиями в частоте обострений заболевания, длительности обострений и ремиссии, количестве, размере и расположении очагов поражения, степени восстановления функций и скорости прогрессирования необратимых нарушений. Помимо классического ремиттирующего РС с обострениями и ремиссиями, в большинстве случаев со временем переходящего во вторичное прогрессирование, у 10–15% больных с самого начала наблюдается первично-прогрессирующий тип течения РС с быстрым нарастанием инвалидности.

В некоторых случаях заболевание может иметь очень мягкий тип течения с минимальным остаточным неврологическим дефицитом после многих лет болезни

или, напротив, быстро прогрессирующий злокачественный тип течения (Richards et al., 2002; Гусев и др., 2004б).

2.3. Диагностика РС

Диагноз РС в типичных случаях не вызывает больших сложностей у опытных неврологов. Основные классические критерии диагноза РС могут быть установлены даже при простом неврологическом осмотре. Тем не менее, большинство неврологов до постановки диагноза предпочитают получить результаты дополнительных исследований, обычно магнитно-резонансной томографии (МРТ), хотя метод вызванных потенциалов мозга (ВП) и исследование спинно-мозговой жидкости (СМЖ, или ликвора) также информативны. Основой диагностики является специфическая клиническая картина заболевания, которую подтверждают данные параклинических методов обследования. При этом обязательным является исключение всех других причин, т.е. сосудистых, инфекционных, неопластических и других заболеваний ЦНС, которые могут вызывать сходное хроническое многоочаговое поражение белого вещества головного мозга (Гусев, 2004).

Для подтверждения диагноза на ранних стадиях развития патологического процесса или в сомнительных случаях в разное время разрабатывались «критерии постановки диагноза РС» (Schumacher et al., 1965; McDonald, Halliday, 1977; Poser et al., 1983; Barkhof et al., 1997; McDonald et al., 2001). **Основная задача этих критериев** – в той или иной степени предположить и обосновать диссеминацию «в месте» и «во времени». Многие из этих критериев использовали градацию РС на «достоверный» РС для типичных случаев, а также иногда на «вероятный» и «возможный» РС, когда полного выполнения основного клинического критерия нет.

Критерии (McDonald et al., 2001) **включают только определение «достоверного» РС**, что представляется очень важным для проведения и эпидемиологических исследований, и клинических испытаний новых методов лечения РС. Они были разработаны специально созданной в 2000 г. Международной комиссией на основе предшествующих МРТ-критериев и получили название критериев МакДональда по имени первого автора. К МРТ-критериям РС, предложенным ранее (Barkhof et al., 1997; Tintoré et al., 2000), **было добавлено наличие признаков демиелинизирующего поражения спинного мозга**: отек спинного мозга в области очага должен отсутствовать или быть минимальным (хотя встречаются исключения); на T2-взвешенных МРТ-изображениях очаг должен быть гиперинтенсивным; очаг или очаги должны быть не менее 3 мм, но не более 2 сегментов в длину; очаги должны занимать лишь часть поперечного сечения спинного мозга. В этих критериях впервые допускалась возможность постановки диагноза «достоверный РС» при подтверждении диссеминации «в месте» и «во времени» только по данным МРТ, не дожидаясь последующих клинических атак, а именно, при появлении нового очага на томограмме через 3 месяца.

В 2005 г. была опубликована модификация критериев МакДональда, позволяющая ставить диагноз РС уже через месяц после первого клинического эпизода

при выявлении нового очага на T2-изображении или накоплении контраста на T1-изображении (т.е. признаков продолжающегося течения заболевания) (Polman et al., 2005b). Ранняя диагностика позволяет своевременно начинать специфическую терапию и подавлять патологический процесс на самых ранних его стадиях. Эти критерии позволяют ставить диагноз РС в любом возрасте, например, у детей и в возрасте старше 60 лет, но все равно сохраняется базовое положение всех критериев постановки диагноза РС – он ставится «при исключении других причин наблюдаемого многоочагового хронического заболевания ЦНС». Использование этих критериев и единых протоколов проведения МРТ позволяет проводить клинические исследования и испытания на большом количестве больных в разных клиниках и странах по абсолютно стандартной методологии.

Таким образом, новые диагностические критерии РС МакДональда доказали свою высокую чувствительность и специфичность при РС.

3. Наследственные и внешние факторы в этиологии РС

Первые данные о возможной генетической предрасположенности к РС были получены из эпидемиологических исследований, выявивших разную частоту РС в разных этнических группах, проживающих на одной территории. РС чаще встречается в семьях больных РС, чем в популяции в целом (Compston, Sadovnick, 1992), однако передача заболевания в семье происходит не по Менделевскому типу наследования (Zhangetal, 1997). Величина относительного риска (ОР) заболевания для родственников больных РС в 20–50 раз выше, чем в популяции в среднем (Farral, 1996), причем наблюдается систематическое уменьшение ОР в зависимости от генетической дистанции по отношению к пробанду (Sadovnick et al., 1996). Такой тип наследования характерен для полигенных заболеваний, которые возникают в результате совместного вклада множества независимо действующих или взаимодействующих полиморфных генов (Vomprezzi et al., 2003).

Изучение внешних факторов, влияющих на развитие РС. Основными результатами изучения этиологии РС явилось понимание того, что при наличии наследственной предрасположенности для развития заболевания необходимо воздействие внешних факторов. Был предложен ряд гипотетических механизмов, связанных и не связанных с иммунорегуляцией, по которым инфекционные агенты (вирусы и бактерии) и другие внешние воздействия могут влиять на риск развития РС. Семейные исследования в особых группах (сибсы, полусибсы, приемные дети, пары с РС и др.) выявили, что внешние факторы на семейном уровне менее важны, чем генетические, но внешнее воздействие имеет определенное значение и реализуется на уровне риска для микропопуляций, а не на уровне отдельного индивида (Ebers, 2005; Dument et al., 2006).

Пока не выявлена какая-либо одна конкретная инфекция как первопричина РС. Многочисленные сообщения о патоморфологическом и гистохимическом выявлении того или иного инфекционного агента в ткани мозга больных РС сводились как правило к описанию единичных случаев, не подтвержденных пока на уровне

закономерности. Последнее время активно изучается роль ретровирусов и герпесвирусов (в частности вируса Эпштейна-Барр) (Haahr, Hollsberg, 2006). Показана связь между инфекцией и частотой обострений, а также неблагоприятным прогнозом РС. Не вызывает сомнений, что неинфекционные факторы, такие как экологические характеристики зоны проживания, интоксикации, особенности питания, климатические факторы, также имеют существенное значение для развития РС. Предполагается, что формирование риска развития РС у предрасположенного индивида происходит в детстве под воздействием ряда внешних влияний. В большинстве исследований (анализ миграционных потоков и временно-пространственных кластеров, по методу «случай–контроль» и когортных и т.д.) как критический для воздействия «патогенных» факторов, определяющих риск развития РС в последующем, называется возраст до 18 лет, чаще до 15 лет (Гусев и др., 2004а).

В настоящее время в рамках Объединенного Российского исследования Эпидемиологии РС (ОРЭР) в 14 городах России проводится аналитическое исследование факторов риска РС по методу «случай–контроль». Единый дизайн и жесткое выполнение протокола проведения исследований сделали возможным совместный анализ данных многих исследований и объединение их результатов (мета-анализ). Первый совместный анализ данных стандартно подобранных 912 пар, собранных в семи городах России (Москва, Благовещенск, Ярославль, Волгоград, Иркутск, Орел, Казань), позволил выявить несколько единых ассоциаций высокой силы с факторами риска, приведенными в табл. 1, причем все они касались периода воздействия в возрасте до 15 лет. Учитывая высокую значимость выявленных ассоциаций (в большинстве случаев $p < 10^{-5}$), каждая, скорее всего, имеет существенный биологический смысл; механизмы влияния этих внешних воздействий на риск развития РС ждут своего изучения.

Особое внимание привлекает связь между риском развития РС и экологическими характеристиками зоны проживания. Ранее такие ассоциации были выявлены в Хорватии, Чехии, в некоторых регионах Германии и Канады (Гусев и др., 2004а). В последние годы в нескольких регионах России получены данные, подтверждающие наличие прямой связи между распространенностью РС и неблагоприятной экологической ситуацией, в частности, с экологическими показателями общей загрязненности территории и с выбросом вредных веществ в атмосферу (Кондратьева и др., 2002; Спиринов и др., 2003; Докучаева, Бойко, 2006). Комплексное влияние экологических факторов на риск развития РС сейчас сомнения не вызывает.

Таким образом, развитие РС, как и большинства других распространенных заболеваний, зависит как от генетической компоненты, так и от факторов внешней среды, находящихся в запрограммированном или случайном взаимодействии друг с другом (Oksenberg et al., 2008). Сложность этих взаимодействий не позволяет однозначно предсказать возникновение РС исходя из отдельно взятого признака, однако выявление даже ограниченного эффекта того или иного гена на развитие или характер течения РС может способствовать пониманию биологической природы заболевания и открыть новые возможности для его профилактики и лечения.

Поиск генов, вовлеченных в развитие РС, до последнего времени проводили при помощи двух основных подходов: 1) анализа ассоциации отдельных «генов-

Внешние факторы, имеющие прямую связь с риском развития РС по данным совместного анализа результатов аналитических эпидемиологических исследований в семи городах России (912 пар случай–контроль, подобранных по полу, возрасту ± 5 лет, этнической принадлежности)

Показатель	Больные РС		Контроли		ОР (ДИ)	
	+	-	+	-	χ^2	уровень p
Хронический тонзиллит с началом в возрасте до 15 лет	384 (42%)	528	225 (25%)	687	2,22 61,5	(1,81-2,73) <0,00001
Преобладание мяса в диете в возрасте до 15 лет	303 (33%)	609	168 (18%)	744	2,20 51,4	(1,76-2,75) <0,00001
Проживание в возрасте до 15 лет около химических и/или металлургических предприятий (менее 5 км) – экология	237 (26%)	675	125 (14%)	787	2,21 42,5	(1,73-2,83) <0,00001
Хронический контакт с бензином и/или органическими растворителями в возрасте до 15 лет – хронические отравления	69 (8%)	843	32 (4%)	880	2,25 13,6	(1,44-3,54) 0,0002

ОР – относительный риск, ДИ – доверительный интервал.

кандидатов» с заболеванием методом «случай–контроль» и 2) анализа сцепления с заболеванием широкого спектра хромосомных локусов (полный геномный поиск) в семьях с несколькими больными РС. При полном геномном поиске использовали панели анонимных генетических маркеров с известной хромосомной локализацией, более или менее равномерно распределенных по геному. С их помощью можно локализовать области генома, вовлеченные в развитие данного заболевания, и далее в найденных областях проводить поиск генов, сцепленных с данным заболеванием. В отличие от этого подхода, который можно определить как путь «от генома к гену», при подходе «ген-кандидат» предположение о возможном участии гена в этиопатогенезе заболевания выдвигают исходя из природы заболевания и функции продукта гена (путь «от фенотипа к гену»), а далее проверяют это предположение.

Анализ ассоциации «генов-кандидатов» с РС проводят путем сравнения распределения аллелей того или иного генетического полиморфного участка в репрезентативных выборках неродственных больных и неродственных здоровых индивидов («случай–контроль»), соответствующих друг другу по распределению полов, возрасту и этнической принадлежности. При этом анализируемые аллельные варианты могут быть локализованы в любом участке ДНК, включая как кодирующие последовательности (экзоны), несинонимические замены в которых изменяют структуру конечной белковой молекулы, так и интроны и промоторные области, где очень часто находятся участки регуляции транскрипции, а также другие области ДНК. При обнаружении статистически достоверных различий генетический маркер считается ассоциированным с болезнью. Не следует забывать, однако, что помимо прямой связи между исследованным локусом и наследственной патологией в основе ассоциации может лежать неравновесие по сцеплению между маркерным локусом и локусом болезни, если эти локусы расположены достаточно близко

друг от друга. Кроме того, наблюдаемая ассоциация может оказаться артефактом еще и в случае неоднородности популяции. Поэтому важным условием достоверности результатов, полученных методом «случай–контроль», является использование гомогенных популяций или семейного материала, когда контрольную группу составляют из тех аллелей здоровых родителей, которые не передаются больным потомкам (Thomson, 1995) .

Первое же выдвинутое на основании представлений об аутоиммунной природе РС (см. обзоры: Судомоина, Фаворова, 2000; Herrera, Ebers, 2003) предположение об участии генов HLA в формировании генетической предрасположенности к этому заболеванию (исходя из ведущей роли молекул HLA **главного комплекса гистосовместимости (ГКГ)** в иммунном ответе) получило экспериментальное подтверждение в ранние 1970-е годы при анализе ассоциации генов HLA классов I и II с РС. По данным ряда исследований, ассоциации с генами класса I являются независимыми от HLA класса II, хотя наличие сильного неравновесия по сцеплению в пределах области HLA затрудняет интерпретацию результатов. Рамки этой главы не позволяют изложить в деталях всю 35-летнюю историю доказательства ведущей роли этих генов в развитии РС; эти данные подробно описаны в обзорах 2008 г. (Svejgaard, 2008; Olsson, Hillert, 2008) и суммированы на сайте www.acceleratedcure.org. В целом, ассоциация РС с генами HLA, локализованными в области хромосомы 6p21.3, выявлена почти во всех популяциях (результаты более 215 исследований). В большинстве из этих работ обнаруживали ассоциацию каких-либо аллелей генов областей DR, DP или DQHLA класса II, а также их протяженного гаплотипа, с РС. Например, для европеоидов, включая русских, характерна устойчивая ассоциация с гаплотипом DR15 (*DRB1*1501*, *DQA1*0102*, *DQB1*0602*) (исключение составляют жители Сардинии, для которых характерна ассоциация с DR3 и DR4). В других этнических группах выявляли ассоциации с другими группами аллелей гена *DRB1*, например DR3 и DR4 – у больных РС из Северной Африки, DR4 наряду с DR15 – у популяции Канарских островов. В ряде работ наблюдали снижение риска при носительстве DR1 или DR8.

Носительством аллеля *DRB1*1501* можно объяснить от 20 до 60% всех случаев РС у европеоидов (Haines et al., 1998), и ассоциация с генами HLA **класса II является наиболее сильной** из всех, выявленных для РС до настоящего времени (как правило, величина отношения шансов (OR) близка к трем). Однако вклад этих генов в развитие РС меньше, чем в случае других аутоиммунных заболеваний, например инсулинзависимого диабета. В любом случае, наличие этого гаплотипа не служит фатальной предпосылкой для развития РС, а его отсутствие – гарантией невосприимчивости к этому заболеванию.

В отличие от ситуации с генами HLA, сотни исследований, направленных на выяснение вклада других генов-кандидатов в развитие РС, далеко не во всех случаях привели к однозначным выводам. В табл. 2 представлен перечень генов, для которых более чем в двух независимых исследованиях найдены ассоциации с РС. Последнее условие представляется весьма важным, поскольку из-за возможности ложно-положительных ассоциаций подтверждение ассоциации на независимых выборках больных и контрольных групп (валидация, или репликация) рассматрива-

ется на сегодняшний день как необходимый критерий для доказательства роли того или иного гена/аллеля как фактора риска заболевания. Как видно из данных табл. 2, такие гены обнаружены на большинстве хромосом. Однако во многих случаях результаты остаются противоречивыми, поскольку ассоциации выявлены только в незначительной части проводимых для данного гена исследований, число которых в ряде случаев достигает нескольких десятков. Важным исключением является ген *IL-7RA*, кодирующий α -цепь рецептора интерлейкина-7, расположенный

Таблица 2

Гены, для которых более чем в двух независимых исследованиях найдены ассоциации с РС

Хро-мо-сома	Гены-кандидаты*	Локализация гена	Анализируемый полиморфизм**	Общее число исследований	Этническая принадлежность/ национальность*** (ссылка)
1	<i>SH2D2A</i>	1q21	МКП (GA) _n в промоторной области	2	скандинавы (Dai et al., 2001)
			МКП (GA) _n в промоторной области, rs926103****		норвежцы (Lorentzen et al., 2008)
	<i>FAS ligand</i>	1q23	МКП на расстоянии 46 т.п.н. перед геном	3	испанцы (юг), американцы (Zayas et al., 2001); испанцы (юг) (Lucas et al., 2004)
	<i>PTPRC</i>	1q31-q32	SNP +77	11	немцы (Schwinzer et al., 2003); итальянцы (Ballerini et al., 2002)
	<i>IL-10</i>	1q31-q32	SNP +12	13	испанцы (Martinez Doncel et al., 2002)
SNP -819 и -592			болгары (Mihailova et al., 2005)		
2	<i>IL-1ra</i>	2q14.2	VNTR	15	испанцы (Мадрид) (De la Concha et al., 1997); сербы (Dincic et al., 2006)
	<i>CTLA4</i>	2q33	SNP +49 (экзон 1)	26	норвежцы (Harbo et al., 1999)
			МКП в положении +514 (3')		сербы (Dincic et al., 2006); шведы (Ligers et al., 1999)
МКП, экзон 4	американцы (Миннесота) (Kantarci et al., 2003a); шведы (Ligers et al., 1999)				
3	<i>CCR5, CCR2,</i>	3p21	CCR2 -64I	16	японцы (Miyagishi et al., 2003)
			CCR5 del32		финны (Pulkkinen et al., 2004)
4	<i>OPN</i>	4q21-q25	SNP +8090	5	японцы (Niino et al., 2003); итальянцы (Chiocchetti et al., 2005)
	<i>IL-2</i>	4q26-q27	(CA) _n , (3')	9	немцы (Epplen et al., 1995)
SNP -384			испанцы (Matesanz et al., 2001)		

таблица 2 (продолжение)

5	<i>IL-7RA (IL-7R alpha)</i>	5p13	rs19922452, rs951818 и rs870849	6	шведы (Zhang et al., 2005)
			SNP –504		австралийцы (Booth et al., 2005)
			rs6897932, rs2303137		северные европеоиды (Lundmark et al., 2007)
			rs6897932 (SNP +244 в экзоне 6)		американцы, британцы, бельгийцы (Gregory et al., 2007); французы, немцы (Weber et al., 2008)
<i>IL-4</i>	5q31.1	МКП I3(+709)	11	американцы (Миннесота) (Kantarci et al., 2003b)	
		SNP +33 в экзоне 1		испанцы (Urcelay et al., 2005)	
6	<i>HLA</i>	6p21.3	Полиморфизм генов HLA классов I и II	215	большинство исследуемых популяций (см. ссылки в (Svejgaard, 2008; Olsson, Hillert, 2008) и на сайте www.acceleratedcure.org)
	<i>TNF (TNF alpha) и LT alpha (TNF beta)</i>	6p21.3	МКП (GT) _n (TNFa)	39	шведы (Sandberg-Wollheim et al., 1995); русские (Boiko et al., 2000; Favorova et al., 2006); голландцы (De Jong et al., 2002); ирландцы (Kirk et al., 1997)
			МКП (GA) _n (TNFb)		ирландцы (Kirk et al., 1997)
			<i>TNF</i> SNP –376 (промотор)		испанцы (Fernandez-Arquero et al., 1999; Martinez et al., 2004)
			<i>TNF</i> SNP –308 (промотор)		поляки (Mucko et al., 1998a); немцы (Eppelen et al., 1995); сербы (Goris et al., 1999); иранцы (Sarial et al., 2008)
			<i>TNF</i> SNP –238 (промотор)		иранцы (Amirzargar et al., 2007)
	<i>LTα</i> SNP 252 в интроне 1	русские (Алексеев и др., 1999); норвежцы (Fernandes Filho et al., 2002)			
<i>MOG</i>	6p22-p21.3	ПДРФ Taq1	9	австралийцы (Hilton et al., 1995)	
		rs2857766 (V142L)		итальянцы (D'Alfonso et al., 2008)	
<i>CD24</i>	6q21	SNP в кодирующей области A/V	3	американцы (Огайо) (Zhou et al., 2003); испанцы (Отаеги et al., 2006)	
<i>ESR1 (ESR, ERG)</i>	6q25.1	ПДРФ XbaI	4	японцы (Niino et al., 2000b; Kikuchi et al., 2002); финны (Mattila et al., 2001)	

таблица 2 (продолжение)

7	<i>TAC1</i>	7q21-q22	D7S554 и D7S3126	2	сардинцы, сев. ирландцы (Vandenbroeck et al., 2002)
			SNP в интроне 1		сев. ирландцы (Cunningham et al., 2005)
	<i>PAI-1 (serpine 1)</i>	7q21.3-q22	полиморфизм пGnG в промоторной области	4	финны (Luomala et al., 2000)
D7S477			словенцы (Lovrecic et al., 2008); сардинцы, сев. ирландцы (Vandenbroeck et al., 2002)		
<i>TCR beta</i>	7q35	Гаплотип V beta 8 - V beta 11	21	американцы (Beall et al., 1989, 1993); испанцы (Martinez-Naves et al., 1993)	
		TCRBV8S1		австралийцы (Buhler et al., 2000)	
10	<i>Fas (CD95)</i>	10q24.1	SNP -670	6	голландцы (Van Veen et al., 2002)
			SNP -670 и E7 +74		американцы (Миннесота) (Kantarci et al., 2004)
	<i>IL-2RA (IL-2R alpha, CD25)</i>	10p15	rs157053 (3'-HTP)	3	испанцы (Matesanz et al., 2007)
			rs12722489, rs2104286		французы, немцы (Weber et al., 2008)
11	<i>UCP2</i>	11q13	SNP -866	2	немцы (Vogler et al., 2005)
			rs660339		испанцы (Otaegui et al., 2007)
12	<i>VDR</i>	12q12-q14	ПДРФ BsmI	7	японцы (Fukazawa et al., 1999)
			ПДРФ Apa I		японцы (Niino et al., 2000a)
			VDRв экзоне 2 (Fok I)		сев. европейцы (Partridge et al., 2004)
	<i>IFN gamma</i>	12q14-q15	динуклеотидный МКП I в интроне	14	шведы (Goris et al., 1999)
			SNP 3'(325)		американцы, сев. ирландцы, бельгийцы (Kantarci et al., 2005)
16	<i>CIITA (MHC2TA)</i>	16p13	ПДРФ BslI в промоторной области	4	англичане (Rasmussen et al., 2001)
			SNP +168		сев. европеоиды (Swanberg et al., 2005)
	<i>IL-4R</i>	16p12.1-p11.2	SNP Q551R	8	бельгийцы (Suppiah et al., 2005); афроамериканцы (Brassat et al., 2006)

17	<i>RANTES</i> (<i>CCL5</i>)	17q11.2-q12	SNP -403	3	американцы (Gade-Andavolu et al., 2004)
			SNP A (C/T)		североамериканские европеоиды (Vyshkina et al., 2005)
	<i>CCL3</i> , (<i>MIP-1 alpha</i> , <i>SCYA3</i>)	17q11-q21	SNP B (C/T)	4	североамериканские европеоиды (Vyshkina et al., 2005; Valman, 2006)
18	<i>MBP</i>	18q23	(TGGA) _n (5')	20	финны (Tienary et al., 1992, 1998; Pihlaja et al., 2003); датчане (Ibsen, Clausen, 1996); итальянцы, русские (Guerini et al., 2003)
19	<i>ICAM-1</i>	19q13	SNP +13848 (K/E 469 в экзоне 6)	8	поляки (Mucko et al., 1998b); финны, испанцы (Nejentsev et al., 2003); французы (Cournu-Rebeix et al., 2003)
			SNP D19S574	27	американцы (Калифорния) (Barcellos et al., 1997; Schmidt et al., 2002)
	<i>APOE</i>	19q13	ε-полиморфизм		датчане (Hogh et al., 2000)
			SNP в области ε-полиморфизма		американцы (европеоиды) (Schmidt et al., 2002)

* Продукты исследованных генов: *APOE* – аполипопротеин E; *CCL3* (*MIP-1 α*, *SCYA3*) – лиганд СС-хемокинов 3, *CCL3*; *CCR* – рецептор СС-хемокинов, *СИТА* (*MHC2TA*) – трансактиватор МНС класса II; *CTLA4* – ассоциированный с цитотоксическими Т-лимфоцитами белок, *ESR1* (*ESR*, *ERG*) – эстрогеновый рецептор 1, *Fas* – CD95/Apo-1, *Fas-ligand* – Fas-лиганд, *HLA* – лейкоцитарный антиген человека, *ICAM-1* – молекула адгезии ICAM-1, *IFN-γ*, интерферон γ, *IL* – интерлейкин, *IL-1ra* – антагонист рецептора интерлейкина-1, *IL-2RA* (*IL-2R α*, *CD25*) – α-цепь рецептора интерлейкина-2; *IL-4R* – рецептор интерлейкина-4, *IL-7RA* (*IL-7R α*) – α-цепь рецептора интерлейкина-7; *LTα* (*TNF β*) – лимфотоксин α, *MBP* – основной белок миелина, *MOG* – миелиновый олигодендроцитный гликопротеин; *OPN* – остеопонтин (секретируемый фосфопротеин 1), *PAI-1* (*serpine 1*) – ингибитор 1 активатора плазминогена; *PTPRC* – рецептор протеин-тирозинфосфатазы типа С (CD45), *RANTES* (*CCL5*) – лиганд СС-хемокинов 5, *CCL5*; *SH2D2A* – специфический адаптерный белок Т клеток (TSAд); *TAC1* – протахикинин-1 (protachykinin-1); *TCR β* – β-цепь Т-клеточного рецептора, *TNF* (*TNF α*) – фактор некроза опухолей; *UCP2* – разобщающий белок 2; *VDR* – рецептор витамина D. ** Обозначения: МКП – микросателлитный повтор (варьирующей по числу повторяющейся единицей является последовательность из 1–6, а чаще из 2 или 4 пар оснований); VNTR (variable number tandem repeat) – варьирующий по числу тандемный повтор (повторяющейся единицей является последовательность из 15–35 пар оснований); SNP (single nucleotide polymorphism) – однонуклеотидный полиморфизм; ПДРФ – полиморфизм длины рестриционных фрагментов; НТР – нетранслируемая область; аминокислоты даны в однобуквенном коде. *** Публикации, в которых не указана этническая принадлежность/национальность индивидов (в основном работы 80–90-х годов), не включены. **** Здесь и далее: идентификационный шестизначный номер SNP (reference SNP ID), например rs926103.

на хромосоме 5p13. Для этого гена в 5 из 6 опубликованных исследований, наиболее масштабные из которых выполнены в 2007–2008 гг. для разных этнических групп, идентифицирована несинонимическая замена оснований в экзоне 6, более распространенный аллель которой высоко достоверно увеличивает риск развития РС (Lundmark et al., 2007; Gregory et al., 2007). Из данных табл. 2 следует также, что для ряда генов, локализованных на хромосомах 1 (*SH2D2A*, *FAS ligand*), 6 (*CD24*), 7 (*TAC1*, *PAI-1*), 10 (*IL-2RA(CD25)*), 11 (*UCP2*) и 17 (*RANTES (CCL5)*), *CCL3*, (*MIP-1 α*, *SCYA3*), во всех или почти во всех проведенных исследованиях обнаружена ассоциация с РС, хотя для каждого из названных генов общее число публикаций не превышает 4. Многие из представленных в табл. 2 генов так или иначе вовлечены в процесс воспаления. Они кодируют или различные про- и противовоспалительные цитокины и их рецепторы, или антигены, против которых может быть направлен аутоиммунный ответ (например белки оболочки миелина MBP и MOG). Необходимо отметить, что вклад каждого из ассоциированных с РС генов является небольшим (например, для *IL-7RA* носительство аллеля предрасположенности увеличивает риск заболеть РС всего в 1,2–1,3 раза), что может быть следствием не только полигенной природы РС, но и фенотипической и генетической гетерогенности этого заболевания.

Отдельного обсуждения заслуживают не-HLA гены ГКГ. Множество данных свидетельствует о том, что в составе ГКГ находится несколько генов, независимо от генов HLA влияющих на восприимчивость к РС. В 39 исследованиях анализировали ассоциации с РС полиморфных участков области ГКГ, в которой расположены важные гены иммунного ответа, кодирующие фактор некроза опухолей и лимфотоксин. В 15 из них была выявлена достоверная ассоциация с заболеванием (см. табл. 2). Как и в случае генов HLA класса I, **встает вопрос о том, не возникают ли эти ассоциации вследствие неравновесия по сцеплению с основным фактором риска РС – геном *DRB1 HLA* класса II.** В работе (Favorova et al., 2006) показано, что аллель TNFa9 микросателлита TNFa, предрасполагающий к РС, не входит в единый гаплотип с аллелем *DRB1*1501* и, следовательно, вносит независимый вклад в развитие РС.

С помощью подхода «ген-кандидат» выявляют ассоциации генов не только с заболеванием в целом, но и с различными клиническими характеристиками РС (см. Андреевский и др., 2004). Эти исследования показали, что РС является гетерогенным заболеванием: он включает в себя множество форм, за которыми стоит большое генетическое разнообразие. По этой причине большинство ассоциаций найдено в хорошо охарактеризованных с точки зрения клинических признаков однородных по этническому признаку (и зачастую небольших) группах индивидов (Pihlaja et al., 2003.). Действительно, **при увеличении групп за счет включения данных разных авторов, проводивших исследования на разных популяциях, имеется тенденция к потере ассоциации** (Gomez-Lira et al., 2003).

Анализ сцепления генетического локуса с заболеванием проводят на семьях, более чем один член которых болен РС, с тем чтобы проследить наследование заболевания и идентифицировать области генома, которые отклоняются от независимой сегрегации и ко-сегрегируют с заболеванием. При этом оцениваются шансы (вероятности) за и против сцепления в данной семье. Количественным показателем

сцепления является логарифм соотношения шансов (правдоподобия) за и против сцепления – lod score (от английского Logarithm of Odds Ratio), или лод-балл.

Анализ сцепления с использованием в качестве маркеров сотен высокополиморфных микросателлитных повторов (МКП), относительно равномерно распределенных по геному, был проведен более чем в 30 исследованиях, выполненных в разных странах на семьях разной этнической принадлежности (Dument et al., 2004; Fernald et al., 2005)). **По известным из публикаций данным также провели три мета-анализа** (Wise et al., 1999; GAMES..., 2003; Abdeen et al., 2006), объединяющие и обобщающие полученные результаты.

Области положительного сцепления, характеризующиеся максимальным логарифмом отношения шансов (maximum lod scores – MLS) более 2 (или же непараметрическим сцеплением (nonparametric linkage – NPL) более 2,1), что соответствует шансам в пользу сцепления $\geq 100:1$, были обнаружены на большинстве хромосом, что демонстрирует полигенную природу РС. Однако в большинстве случаев полный геномный поиск в различных этнических группах, равно как мета-анализ объединенных данных, не дали совпадающих результатов, что может свидетельствовать о генетической гетерогенности РС в разных популяциях. Единственное исключение составлял локус HLA класса II, **расположенный в области ГКГ на хромосоме 6p21**, MLS для которого достигал 4,24 и участие которого в развитии РС было показано ранее при анализе ассоциации (см. выше).

Следующим шагом в анализе генетической предрасположенности к РС стало опубликованное в конце 2005 г. исследование Международного генетического консорциума по РС (International Multiple Sclerosis Genetics Consortium) (Sawcer et al., 2005), в котором в 730 семьях с несколькими больными анализировали сцепление с РС не МКП, а более чем 4500 полиморфных участков с однонуклеотидными заменами (single nucleotide polymorphisms – SNP), которые менее информативны, чем МКП, поскольку формируют только два аллеля, но зато гораздо более часто встречаются в геноме. Полученное в этой работе значение MLS 11,7 для локуса HLA свидетельствует о значительно большей мощности этого поиска с высокой плотностью покрытия генома SNP-маркерами по сравнению с предыдущими исследованиями. Однако и в этом случае за пределами HLA не было выявлено участков с высокодостоверным сцеплением. Таким образом, анализ сцепления отдельных областей генома с РС оказался подходом не только трудоемким, но и недостаточно информативным, скорее всего, вследствие его низкой чувствительности (Risch, 2000). На смену ему в последние два года пришел взявший все лучшее от предыдущих исследований метод поиска ассоциаций по всему геному (genome-wide association screening – GWAS).

Полногеномный поиск ассоциаций (GWAS) опирается на огромные возможности современных методов высокопроизводительного анализа ДНК, таких как ДНК-микрочипы (DNA microarrays). Последние уже позволяют анализировать до миллиона SNP в одном исследовании, что дает возможность маркировать блоки гаплотипов один за другим, уменьшая возможность пропустить важные гены при анализе методом «случай–контроль». В то же время, в результате проведения огромного количества тестов повышается риск ложно-положительных результатов

и возрастает необходимость валидации выявленных ассоциаций (Olsson, Hillert, 2008).

В 2007 г. опубликованы первые результаты анализа генетической предрасположенности к РС, полученные методом GWAS с использованием 500 000 SNP на 931 семье с больным РС (International..., 2007). Ассоциация с классическим фактором риска РС – геном *HLA DRB1* на хромосоме 6p21.3 достигла в этом исследовании чрезвычайно высокого уровня значимости ($p < 1 \cdot 10^{-81}$). Полученные данные свидетельствуют также об ассоциации РС с генами *IL-7RA* ($p = 2,94 \cdot 10^{-7}$) и *IL-2RA* (*CD25*) ($p = 2,96 \cdot 10^{-8}$), кодирующими α -субъединицы рецепторных комплексов интерлейкинов 7 и 2, соответственно. Кроме того, идентифицирован, но с меньшим уровнем значимости, ряд новых генов-кандидатов. Еще одно исследование, проведенное методом GWAS (14 500 несинонимических SNP) на 975 больных РС из Великобритании (Wellcome..., 2007), однако, не привело к валидации описанных выше ассоциаций. Ряд исследований в 2008 г. направлен на валидацию результатов, полученных для не-HLA генов Международным генетическим консорциумом по РС методом GWAS. Для австралийцев подтверждена ассоциация с геном *IL-2RA* (и еще с несколькими генами), но не с *IL-7RA* (Rubio et al., 2008), для французов и немцев – с обоими генами рецепторов (Weber et al., 2008). Следует напомнить, что выводы об ассоциации генов *IL-7RA* и *IL-2RA* были сделаны и ранее при использовании подхода «ген-кандидат» (см. табл. 1), что ставит вопрос о целесообразности дорогостоящих исследований типа GWAS для РС как заболевания с убедительно сформулированной теорией патогенеза и, следовательно, удачным выбором генов-кандидатов.

Ассоциации РС с несколькими полиморфными участками. Относительно неразработанным направлением исследований генетической предрасположенности к РС является анализ ассоциаций РС с сочетанной встречаемостью аллелей различных генов-кандидатов. В основном это аллели двух генов, т.к. анализ совместного вклада большего количества генов требует сложных статистических расчетов (Brasat et al., 2006). Самым распространенным способом анализа является разделение больных и здоровых на подгруппы по принципу носительства той или иной группы аллелей гена *DRB1* HLA класса II, позволяющее выявить сочетанную ассоциацию исследуемого гена с *DRB1* или с включающим этот ген протяженным гаплотипом.

Недавно разработан новый биоинформатический подход, который основан на методе Монте-Карло посредством цепей Маркова (MCMC) и осуществляет поиск наиболее сильно ассоциированных с заболеванием наборов из сочетаний аллелей/генотипов анализируемых полиморфных участков (Favogov et al., 2005). Алгоритм разработан таким образом, чтобы идентифицировать генетические факторы риска как минимальные множества аллелей. Под этим понимается, что добавление в такое множество каких-либо дополнительных аллелей не увеличивает значимости его ассоциации РС, а любое подмножество этого множества характеризуется меньшей значимостью ассоциации с РС. С помощью этого метода выявлены два триаллельных сочетания, предрасполагающие к развитию РС у русских (Favogova et al., 2006). Важно, что носители этих сочетаний входят в непересекающиеся подгруппы одной выборки, что является прямым доказательством генетической гете-

рогенности РС. При исследовании предрасположенности к РС с помощью другого непараметрического подхода, метода уменьшения многофакторной размерности (multifactor dimensionality reduction – MDR), также направленного на выявление сочетаний генов, влияющих на риск заболевания (Brassat et al., 2006; Motsinger et al., 2007), выявлены сочетания аллелей, соответствующие одно-, двух-, трех- и четырехлокусным моделям взаимодействия генов при формировании генетического риска РС. Однако только одно биаллельное сочетание (Motsinger et al., 2007) отвечало требованиям минимального РС-ассоциированного аллельного множества.

Данные по ассоциации РС с минимальными сочетаниями аллелей генов-кандидатов приведены в табл. 3. Наблюдается хорошая сходимость с результатами исследований, выявивших ассоциации одиночных генов на других этнических группах и выборках: из 16 генов, входящих в предрасполагающие к РС сочетания (см. табл. 3), только 4 (*TGFβ1*, *UGB*, *C5* и *TPA*) не представлены в табл. 2. Восемь из 12 представленных в табл. 3 сочетаний несут аллели генов *DRB1* (или *DQB1*), 4 – гена *CTLA4*, 2 – гена *TGFβ1*, а сочетание аллелей генов *TCRβ* и *DRB1* выявлено в двух независимых исследованиях. Нужно отметить, что одно из выявленных сочетаний несет два несцепленных аллеля разных полиморфных участков одного гена (*TNF*).

Как видно из данных табл. 3, ассоциированные с РС сочетания могут включать гены, продукты которых входят в один биохимический путь. Так, ген *TPA* из сочетания, выявленного у словенцев (Lovrecic et al., 2008), кодирует тканевой активатор плазминогена, а второй ген сочетания, *PAI-1* – основной ингибитор этой сериновой протеиназы; в результате модулируемая функциональным генетическим

Таблица 3

Выявленные ассоциации РС с сочетаниями аллелей генов-кандидато

Гены, сочетания аллелей которых значимо ассоциированы с РС*	Этническая принадлежность/ национальность	Ссылка
<i>IL-4R</i> , <i>DRB1</i>	американцы	Mirel et al., 2004
<i>TCRβ</i> , <i>DRB1</i>	немцы	Epplen et al., 1997
	австралийцы	Buhler et al., 2000
<i>MBP</i> , <i>DRB1</i>	русские, итальянцы	Guerini et al., 2003
<i>CCR5</i> , <i>DRB1</i>	русские	Favorova et al., 2002
<i>TGFβ1</i> , <i>DRB1</i>	американцы	Green et al., 2001
<i>ICAM-1</i> , <i>DQB1</i>	финны, испанцы	Nejentsev et al., 2003
<i>CTLA4</i> , <i>DRB1</i>	французы	Alizadeh et al., 2003
<i>CTLA4</i> , <i>TGFβ1</i> , <i>DRB1</i>	русские	Favorova et al., 2006
<i>CTLA4</i> , <i>TNF</i> (два несцепленных аллеля этого гена)	русские	Favorova et al., 2006
<i>CTLA4</i> , <i>IL-1ra</i>	сербы	Dincic et al., 2006
<i>UGB</i> , <i>C5</i>	североамериканские европеоиды	Motsinger et al., 2007
<i>PAI-1</i> , <i>TPA</i>	словенцы	Lovrecic et al., 2008

* Продукты исследованных генов: *DRB1* и *DQB1* – гены HLA класса II; *TGFβ1* – ранформирующий ростовой фактор β1; *UGB* – утероглобин (секреторный белок клеток Клара), *C5* – C5-компонент комплемента, *TPA* – тканевой активатор плазминогена. Продукты остальных генов приведены в табл. 2.

полиморфизмом экспрессия этих генов может приводить к нарушениям фибринолиза, характерным для РС. В других случаях продукты генов, входящих в отдельные ассоциированные с РС сочетания, вовлекаются в различные этапы воспалительного процесса. Принимая во внимание небольшой вклад отдельных генов, привлекательно предположить, что носительства любого одного предрасполагающего аллеля из выявленного сочетания недостаточно для выхода за рамки нормы, а вместе они создают этиологические предпосылки для развития РС. Исходя из сказанного, можно заключить, что анализ сочетаний генов обеспечивает большую статистическую мощность при выявлении генов предрасположенности к РС, которая определяется или аддитивностью вклада отдельных генов, или ген-генными взаимодействиями, а потому представляется весьма перспективным для прогноза развития заболевания.

Генетические исследования на экспериментальных моделях РС детально описаны в обзоре (Olsson, Hillert, 2008). Преимуществом этого подхода является возможность свести к минимуму различия в условиях внешней среды, снижение генетической гетерогенности за счет использования инбредных линий и в принципе неограниченные размеры исследуемых когорт, что важно для достижения адекватной статистической значимости. Установлено, что развитие экспериментального аутоиммунного энцефаломиелита (ЭАЭ) у грызунов, как и людей, зависит от генов HLA классов I и II и регулируется более чем 100 генами, каждый из которых обеспечивает слабый эффект.

Новые возможности открывают исследования на трансгенных гуманизированных моделях. Ранее было показано, что когда у мышей присутствуют молекулы HLA DR класса II человека совместно с Т-клеточным рецептором человека, специфичным для основного белка миелина (MBP), у них развивается ЭАЭ (Madsen et al., 1999). Используя такую систему, экспрессировали у мышей, порознь и вместе, соседние гены HLA класса II человека *DR2b* и *DR2a*, всегда наследуемые вместе, т.е. входящие в один гаплотип (Gregersen et al., 2006). Трансгенез одного *DR2b* приводил к спонтанному развитию тяжелого ЭАЭ, а при совместном введении двух этих генов тяжесть заболевания уменьшалась, его дебют откладывался, и заболевание протекало по типу ремиттирующего течения РС у людей. Эти данные свидетельствуют о функциональном эпистазе продуктов генов, локализованных внутри общего ГКГ-гаплотипа, ассоциированного с РС.

В целом, данные о генетической предрасположенности к РС, полученные на экспериментальных моделях, совпадают с данными генетики человека и развивают их.

Совокупность полученных данных свидетельствует о том, что РС является заболеванием полигенной природы, характеризующимся генетической гетерогенностью, которая, скорее всего, отражает разную этиологию клинических форм заболевания. Болезнь возникает вследствие независимого либо эпистатического действия множества генов (в первую очередь, входящих в систему HLA), каждый из которых вносит небольшой вклад в развитие заболевания. В силу этих причин вопрос о факторах генетической предрасположенности к РС, несмотря на многочисленные усилия исследователей, далек от своего разрешения.

4. Патогенез рассеянного склероза: аутоиммунное воспаление и нейродегенерация при рассеянном склерозе

Рассеянный склероз (РС) является хроническим воспалительным заболеванием центральной нервной системы (ЦНС), в развитии которого большое значение имеют аутоиммунные реакции (Гусев, Бойко, 2000, 2001; Завалишин, Захарова, 2004; Bruck, 2005; Prat, Antel, 2005). **Этиология РС остается невыясненной, однако предполагается, что инициация и развитие заболевания определяются взаимодействием ряда факторов внешней среды и генетической предрасположенности индивида (см. выше). Эти факторы запускают каскад патологических процессов, включающий воспалительный ответ в ЦНС, который приводит к демиелинизации, гибели олигодендроцитов, разрушению аксонов, глиозу и нейродегенерации (Bjartmar et al., 2003; Kieseier et al., 2005).**

Точные механизмы, лежащие в основе повреждения тканей ЦНС при РС, до настоящего времени не выяснены. Разнообразие клеточных и молекулярных элементов, обнаруженных в активных очагах повреждения ЦНС у больных РС, и выявление уникальных типов очагов демиелинизации, скорее всего, свидетельствует о том, что в повреждении ткани мозга при РС могут участвовать различные механизмы (Lucchinetti et al., 2000; Kornek, Lassmann, 2003). Присутствие в бляшках всех типов (или в непосредственной близости от них) воспалительного инфильтрата, содержащего сенсibilизированные к антигенам миелина иммунокомпетентные клетки, указывает на участие элементов иммунной системы в общих процессах повреждения миелина, олигодендроцитов и нервных волокон.

4.1. Активация аутореактивных клеток

Необходимым условием развития аутоиммунного повреждения является активация анергичных аутореактивных Т- и В-клеток на периферии. Она может осуществляться чужеродными микроорганизмами (по принципу молекулярной мимикрии), микробными суперантигенами или собственными антигенами, иммуногенность которых повышена вследствие различных причин (Tauber et al., 2007).

В выборе направления дифференцировки Т-лимфоцитов важнейшую роль играют как сам антиген, так и цитокиновое микроокружение, которое во многом определяется состоянием антиген-презентирующих клеток (АПК) (Kidd, 2003). Различающиеся функционально и по спектру экспрессируемых цитокинов Т-хелперы (Th) принято относить к разным субпопуляциям CD4⁺ Т-лимфоцитов. У человека клетки субпопуляции Th1 продуцируют интерферон γ (ИФН γ), лимфотоксин (ЛТ), но не интерлейкин (ИЛ)-4 и ИЛ-5, и стимулируют, в основном, клеточно-опосредованные иммунные реакции. Клетки субпопуляции Th2 продуцируют ИЛ-4, ИЛ-5, ИЛ-9, ИЛ-25, но не ИФН γ и ЛТ, и обеспечивают основную помощь в развитии гуморального иммунного ответа (O'Garra, 1998; Alam, Gorska, 2003).

Клетки открытой недавно субпопуляции Th17 продуцируют цитокины семейства интерлейкинов-17 – ИЛ-17А и ИЛ-17F, которых не продуцируют ни Th1, ни Th2

CD4+Т-лимфоциты. Кроме того, Th17-клетки синтезируют большое число других цитокинов, определяющих развитие воспалительного процесса – фактора некроза опухолей (ФНО), ИЛ-6, ИЛ-21, ИЛ-22 и некоторые хемокины (Harrington et al., 2006; Kikly et al., 2006).

В отдельную субпопуляцию выделяют также Т-лимфоциты, способные регулировать активность и Th1, и Th2 субпопуляций, так называемые регуляторные Т-лимфоциты (Treg, Tr). Показано, что CD4+Treg-клетки конститутивно экспрессируют α -цепь рецептора к ИЛ-2 (CD25), транскрипционный фактор Foxp3 и синтезируют ТРФб и ИЛ-10. Недавно было обнаружено, что пути дифференцировки Т-лимфоцитов в субпопуляции Treg и Th17 – взаимоисключающие. В дифференцировке Т-лимфоцитов в субпопуляцию Treg определяющую роль играет цитокин ТРФб. Однако в присутствии ИЛ-6, белка острой фазы, продуцирующегося при воспалении, дифференцировка Т-лимфоцитов в Treg в ответ на ТРФб полностью прекращается и заменяется дифференцировкой в провоспалительные клетки субпопуляции Th17 (Bettelli et al., 2006; Afzali et al., 2007).

Цитокины, секретируемые одним типом Th-клеток, существенным образом влияют на другую субпопуляцию лимфоцитов, подавляя их дифференциацию и эффекторные функции. Функциональные исследования показали, что Treg-клетки могут оказывать существенное влияние на окончание воспалительного ответа, опосредованного Th1- и Th17-клетками при инфекционных и аутоиммунных заболеваниях (McCuirk, Mills, 2002; Steinke, Borish, 2006).

Одним из характерных признаков развития как РС, так и экспериментального аутоиммунного энцефаломиелита (ЭАЭ) – аутоиммунного заболевания животных, сходного с РС по многим клиническим и гистологическим признакам (Заргарова, Фаворова, 1999), является присутствие в ЦНС активированных ИФН γ -продуцирующих клеток, в основном Th1 лимфоцитов. До последнего времени ИФН γ отводилась основная роль в запуске воспалительных процессов в мозге при РС (Kaplan, 2001; Wheeler, Owens, 2005). Важную провоспалительную роль приписывали также ИЛ-12, который необходим для инициации Th1-опосредованного иммунного ответа. Однако в последнее время накапливаются данные, свидетельствующие о том, что роль ИФН γ /ИЛ-12 в аутоиммунном воспалении в ЦНС не столь велика. Использование в качестве моделей мышей, нокаутированных по генам, кодирующим различные субъединицы цитокинов ИЛ-12 и ИЛ-23 (которые, помимо специфических субъединиц ИЛ-12p35 и ИЛ-23p19, соответственно, содержат общую субъединицу ИЛ-12/23p40), показало, что для развития ЭАЭ у этих мышей важен ИЛ-23, а не ИЛ-12 (Becher et al., 2002; Cua, et al., 2003).

ИЛ-23, как и ИЛ-12, секретируется АПК (в основном активированными дендритными клетками). Изучение механизма, лежащего в основе участия ИЛ-23 в развитии ЭАЭ, выявило, что в ИЛ-23-дефицитных мышях невозможно индуцировать CD4+ Т-клетки, продуцирующие ИЛ-17 (Langrish et al., 2005). Показано, что интерлейкины, принадлежащие к семейству ИЛ-17 (особенно ИЛ-17А), стимулируют клетки различных типов, такие как эпителиальные, эндотелиальные и фибробласты, продуцировать провоспалительные цитокины и хемокины (Kolls Lindén, 2004). Кроме того, Th17-клетки, активированные в присутствии ИЛ-23, об-

ладают большей способностью переносить ЭАЭ *in vitro*, чем Th1-клетки, активированные в присутствии ИЛ-12 (Langrish et al., 2005). Эти результаты показывают, что путь дифференцировки ИЛ-23/Th17 более важен в развитии ЭАЭ, чем путь ИЛ-12/Th1 (Kikly et al., 2006; McKenzie et al., 2006).

В настоящее время становится ясным, что направление дифференцировки Т-лимфоцитов по пути ИЛ-23/Th17 может играть важную роль не только у животных моделей, но и при развитии хронических воспалительных заболеваний человека; при этом большую роль отводят компонентам системы врожденного иммунитета, в частности дендритным клеткам (ДК). Показано, что миелоидные ДК из периферической крови больных РС продуцируют больше ИЛ-23 и ИЛ-23p19 мРНК, чем ДК здоровых доноров, при одинаковом уровне секреции ИЛ-12. Выявлена также повышенная продукция ИЛ-17 Т-лимфоцитами больных РС, активированными с помощью анти-CD3 антител (Vaknin-Dembinsky et al., 2006). **Значительное увеличение** в продукции мРНК и обеих субъединиц ИЛ-23 обнаружено как в активных, так и в неактивных бляшках у больных РС по сравнению с тканью мозга контрольных индивидов без неврологических заболеваний. С помощью двойного окрашивания показано, что важным источником ИЛ-23p19 в этих бляшках являются активированные макрофаги/микроглия (Li et al., 2007). При оценке с помощью гибридизации *in situ* количества мононуклеарных клеток крови, синтезирующих ИЛ-17 мРНК, показано, что оно выше у больных РС по сравнению со здоровыми донорами и при обострении РС выше, чем при ремиссии. У больных РС в цереброспинальной жидкости (ЦСЖ) наблюдали больше мононуклеарных клеток, синтезирующих ИЛ-17 мРНК, чем в крови (Matusевичius et al., 1999). Анализ с помощью микрочипов выявил резкое увеличение количества ИЛ-17 мРНК в бляшках, полученных при аутопсии больных РС, по сравнению с образцами головного мозга контрольных доноров, не имевших патологии в ЦНС (Lock et al., 2002). Кроме того, наблюдали, что Т-клетки памяти, продуцирующие ИЛ-17 и ИЛ-22, инфильтрируют бляшки больных РС (Kebir et al., 2007). В то же время показано, что для дифференцировки Th17-клеток человека *in vitro* необходимы ИЛ-1 β , ИЛ-6 и ИЛ-23, тогда как роль ТРФБ до конца не выяснена (Acosta-Rodriguez et al., 2007; Wilson et al., 2007; Manel et al., 2008). И хотя точные этапы и факторы дифференцировки субпопуляции Th17, а также участие этой субпопуляции в развитии ЭАЭ доказано в настоящий момент только для мышей, уже первые результаты, полученные при исследовании больных РС, дают основание предполагать важную роль ИЛ-23/Th17 в развитии этого заболевания.

4.2. Проникновение аутореактивных клеток через ГЭБ

Следующим ключевым этапом развития иммунопатологического процесса при РС является нарушение гематоэнцефалического барьера (ГЭБ) и проникновение Т- и В-клеток в ЦНС. Активированные лимфоциты, независимо от их специфичности, могут проникать через ГЭБ, что является важной составной частью пускового механизма аутоиммунных реакций в ЦНС (Wekerle et al., 1986). **Активация лимфоцитов и моноцитов на периферии приводит к повышению продукции провос-**

палительных цитокинов ИФН γ , ФНО и ИЛ-1, которые, в свою очередь, стимулируют экспрессию на эндотелиальных клетках в ЦНС молекул адгезии (Doge-Duffy et al., 1993), а также молекул HLA класса II. Стимуляция и направление миграции клеток различных классов во многом определяется небольшими белками плазмы – хемокинами, вырабатываемыми макрофагами, астроцитами, клетками микроглии и воспалительными клетками. Хемокины стимулируют миграцию лимфоцитов и моноцитов в ЦНС не только за счет прямой хемоаттракции, но и путем активации экспрессии лейкоцитарных интегринов, что увеличивает связывание лимфоцитов молекулами адгезии на эндотелиальных клетках. При развитии РС провоспалительные цитокины являются главными индукторами продукции хемокинов (Simpson et al., 2000; Boven et al., 2000). Показано, что пары хемокин/рецептор IP10/CXCR3 и RANTES/CCR5 являются предпочтительными хемоаттрактантами для воспалительных Т-хелперов субпопуляции Th1, а пара MCP-1/CCR2 – для воспалительных Т-хелперов субпопуляции Th17 (Siveke, Hamman, 1998; Aranami, Yamamura, 2008). Проникновение клеток иммунной системы в ЦНС сопровождается разрушением коллагена типа IV, являющегося основой внеклеточного матрикса. В преодолении этого барьера ключевую роль играют матриксные металлопротеиназы (ММП). Основными ММП, участвующими в разрушении коллагена типа IV, являются ММП-2 и ММП-9, продуцируемые эндотелиальными клетками, перицитами, астроцитами и активированными Т-клетками. При патоморфологических и иммуноцитохимических исследованиях ткани мозга больных РС наблюдали, что ММП-9 секретируется периваскулярными мононуклеарными клетками белого вещества и вместе с другими ММП ассоциирована с моноцитами и астроцитами в очагах демиелинизации (Maeda, Sobel, 1996).

4.3. Патологические иммунные реакции в ткани мозга

Гистологические и иммуноцитохимические исследования очагов демиелинизации (бляшек) у больных РС идентифицировали основные клеточные и молекулярные элементы, характеризующие эти очаги, в то же время выявив гетерогенность состава бляшек у разных больных. Все очаги демиелинизации у больных РС характеризуются присутствием в них воспалительного инфильтрата, состоящего из макрофагов, Т-лимфоцитов (CD4+, CD8+), В-лимфоцитов и плазматических клеток. В бляшках обнаружены также активированные астроциты, микроглиальные и эндотелиальные клетки. Кроме того, в них в разных количествах выявлены иммуноглобулины, компоненты системы комплемента (включая мембраноатакующий комплекс), провоспалительные цитокины (ФНО, ИФН γ , ИЛ-2, ИЛ-6, ИЛ-12, ИЛ-17, ИЛ-23, ЛТ и др.), хемокины, ММП и молекулы адгезии (на эндотелии, лейкоцитах, глии) (O'Connor et al., 2001).

При комплексном исследовании бляшек с активной демиелинизацией, полученных при биопсии или аутопсии мозга больных РС, выявлено четыре различных типа (паттерна) патологического процесса. Для бляшек типа I характерна фокальная демиелинизация, ассоциированная с инфильтрацией Т-лимфоцитами и макро-

фагами. В бляшках типа II дополнительно к Т-лимфоцитам и макрофагам обнаружено отложение иммуноглобулинов и активация системы комплемента в местах активного разрушения миелина, т.е. существенное значение имеют гуморальные аутоиммунные реакции. Оба типа характеризуются значительной ремиелинизацией. В двух других типах (III и IV) более выражено повреждение олигодендроцитов. Тип III, в отличие от всех других типов, характеризуется практически полной потерей миелин-ассоциированного гликопротеина (МАГ); в этих бляшках выявлены олигодендроциты с типичными признаками апоптоза, ремиелинизация здесь минимальна, в то же время, есть признаки воспалительного процесса. В бляшках редкого типа IV наблюдается гибель олигодендроцитов неапоптотическим путем с минимальными воспалительными изменениями. Кроме того, сделано важное наблюдение, что все активные бляшки каждого больного принадлежат к одному из классифицированных типов, хотя не исключается полностью возможность смены типа очага при прогрессировании заболевания (Lucchinetti et al., 2000; Kornek, Lassmann, 2003; Wingerchuk, Lucchinetti, 2007).

Разнообразие клеточных и молекулярных элементов, обнаруженных в бляшках больных РС, и выявление четырех уникальных типов очагов демиелинизации свидетельствуют о том, что в повреждении ткани мозга при РС могут участвовать различные патологические процессы. Однако присутствие воспалительного инфильтрата во всех типах бляшек (или в непосредственной близости от них) предполагает участие элементов иммунной системы в общих процессах повреждения миелина

Попадая в ЦНС, Т-хелперы дополнительно активируются аутоантигенами. Т-клеточный ответ в ЦНС развивается на многие белки миелиновой оболочки, на стресс-белки, возникающие в ответ на развитие воспалительной реакции, и на другие вещества. Активированные Th1 (и Th17) клетки вырабатывают также большее количество провоспалительных цитокинов, что повышает уровень экспрессии антигенов HLA классов I и II и молекул адгезии на поверхности астроцитов, олигодендроцитов и микроглии и эндотелии сосудов мозга. Это, в свою очередь, облегчает дальнейшую миграцию иммунных клеток в паренхиму мозга, вызывая локальное воспаление и отек. Некоторые цитокины могут напрямую повреждать миелиновую оболочку: так, ФНО может оказывать прямое повреждающее действие на олигодендроциты, способствуя тем самым фагоцитозу макрофагами участков миелиновой оболочки (Antel, 2001). Кроме того, ФНО активирует микроглию и макрофаги, что, в свою очередь, приводит к усилению фагоцитирующих свойств этих клеток и к продукции цитотоксических веществ, таких как окислительные радикалы, NO, протеазы и др. (Kreutzberg, 1996).

В формировании очагов демиелинизации могут принимать активнейшее участие не только CD4+ Т-клетки, но и другие клетки иммунной системы. В работах последних лет показано увеличение количества CD8+ Т-лимфоцитов в бляшках больных РС, причем, основываясь на анализе Т-клеточных рецепторов, выявлена клональная экспансия CD8+ Т-лимфоцитов, экспрессирующих определенную β-цепь Т-клеточного рецептора (Babbe et al., 2000). Кроме того, обнаружено, что у больных РС чаще встречаются CD8+ Т-лимфоциты, специфичные к некоторым

белкам миелина, чем у здоровых доноров (Crawford et al., 2004). В последние годы были разработаны модели ЭАЭ, опосредованные CD8+ Т-лимфоцитами (Ji, Goverman, 2007; Brisebois et al., 2006). Эти результаты позволили некоторым авторам высказать предположение, что хотя возникновение очагов демиелинизации инициировано CD4+ Т-клетками, их дальнейшее развитие может быть во многом опосредовано CD8+ Т-лимфоцитами (McFarland, Martin, 2007). Это предположение подтверждается наблюдениями, что CD8+ Т-лимфоциты могут при некоторых условиях напрямую атаковать и повреждать аксоны (Medana et al., 2001).

В последние годы установлена существенная роль гуморального иммунитета в развитии РС (см. ниже). Большое значение в развитии как клеточного, так и гуморального иммунопатологических процессов при РС имеет феномен «распространения эпитопов (epitope spreading)», состоящий в расширении репертуара антигенов ЦНС и их эпитопов, к которым сенсibilизированы клетки, по мере хронизации процесса (Miller et al., 2007).

В последние десятилетия было показано, что ключевую роль в запуске и регуляции Т-клеточного (и, опосредованно, В-клеточного) иммунного ответа играют дендритные клетки (ДК) (Steinman, Nussenzweig, 2002; McMenamin et al., 2003; Weiner, 2008; O'Brien et al., 2008). Предполагается, что функцию поддержания толерантности выполняют незрелые ДК, а срыв ауто толерантности происходит при длительном представлении аутоантигенов зрелыми ДК (Steinman, Nussenzweig, 2002; Ludewig et al., 2001). Повышенное количество зрелых ДК, «нагруженных» антигенами миелина, может приводить к активации миелин-реактивных Т-клеток и, таким образом, к обострению РС с высвобождением новых антигенов. В дальнейшем эти процессы могут замыкаться в порочный круг, способствующий самоподдержанию аутоиммунного воспаления. Данные последних лет дают основание считать, что нарушения в созревании и активации ДК лежат в основе перехода в прогрессирующую стадию заболевания (Weiner, 2008). Некоторыми авторами рассматривается другой механизм хронизации аутоиммунного воспаления при РС – нарушение процесса элиминации (апоптоза) проникших в ткань мозга Т-клеток (Semra et al., 2002; Hebb et al., 2008).

4.4. Нейродегенерация

В настоящее время стало понятным, что диффузные нейродегенеративные процессы являются важным элементом патогенеза РС, особенно прогрессирующих форм (Trapp et al., 1998). Нейродегенерация может быть выявлена уже на самых ранних стадиях заболевания; она может развиваться как вследствие аутоиммунного воспаления и последующей демиелинизации, так и независимо от аутоиммунных процессов. Нейродегенеративные изменения лежат в основе прогрессирования необратимых нарушений, приводящих к стойкой инвалидности (Fisher et al., 2002). Существенные дегенеративные изменения могут выявляться и вне очагов демиелинизации, во внешне неизменном белом и сером веществе (Bergers et al., 2002). Так, выявлена диффузная активация микроглии в белом веществе головного мозга

больных РС (Allen et al., 2001), которая может быть одним из начальных этапов формирования бляшек в ЦНС. Большинство нейронов в ЦНС млекопитающих обладает рецепторами для одного из триггеров апоптоза – возбуждающего нейротрансмиттера глутамата. Активированные лимфоциты, микроглиальные клетки и макрофаги продуцируют повышенное количество глутамата, который связывается с этими рецепторами, экспрессированными на олигодендроглии (олигодендроцитах и глиальных клетках) и на нейронах (Mattson, 2000). Избыточная активация рецепторов глутамата может индуцировать гибель клеток посредством механизма, связанного с притоком кальция. По-видимому, в нейродегенеративные процессы вовлечено также нарушение гомеостаза натриевых ионных каналов (Bechtold, Smith, 2005). Еще одним из возможных механизмов дегенеративных процессов, происходящих при формировании очагов демиелинизации, может быть окислительное повреждение. Олигодендроциты и миелин содержат относительно большое количество железа, которое, высвобождаясь при повреждении тканей, участвует в образовании высокотоксичных гидроксильных радикалов (Carlson, Rose, 2006; Levine, Chakrabarty, 2004). При демиелинизирующих процессах *in vitro* и *in vivo* неоднократно наблюдали протективный эффект различных нейротрофических факторов (НТФ), таких как NGF, IGF-1, GGF-2, BDNF, FGF, **выражающийся прежде всего в выживании олигодендроцитов в процессе развития аутоиммунного воспаления** (Webser, 1997). Как следствие – нарушение баланса НТФ, выявленное при РС, может приводить к развитию нейродегенеративных процессов (Hohlfeld, 2008). Таким образом, перечисленные механизмы приводят к образованию на нервных волокнах участков демиелинизации, гибели олигодендроцитов и нейродегенерации, что приводит к нарушению передачи нервного импульса и развитию патофизиологического дефекта.

В целом, данные последних лет свидетельствуют о гетерогенности механизмов патогенеза РС. Открытие новых взаимосвязанных субпопуляций Т-лимфоцитов (провоспалительной – Th17 и регуляторной – *treg*) позволяет по-новому взглянуть на системные нарушения иммунорегуляции при РС, проявляющееся клинически в чередовании периодов ремиссий и обострений. Можно предположить, что при обострении происходит сдвиг дифференцировки Т-лимфоцитов (или их выживаемости) в сторону *th17* (и, возможно, *th1*), тогда как восстановление баланса и сдвиг в сторону *treg*, зависящий от цитокинового микроокружения и активности АПК (в основном дендритных клеток), может обуславливать наступление и поддержание состояния ремиссии. Если в последние годы достигнуты существенные успехи в лечении аутоиммунного воспаления, особенно на ранних стадиях развития РС, то предупреждение и коррекция нейродегенеративных изменений остаются серьезнейшими нерешенными проблемами.

5. Аутоантигены при РС

Основными аутоантигенами при РС являются белки миелиновой оболочки нервных волокон: основной белок миелина (ОБМ), протеолипидный протеин

(ПЛП), миелинолигодендроцитарный гликопротеин (МОГ). Основная информация о структуре миелина получена с помощью рентгеноструктурного анализа и электронной микроскопии. Уникальной морфологической особенностью миелина является то, что он формируется в результате спирального закручивания отростков олигодендроглиоцитов в ЦНС и шванновских клеток на периферии, вокруг аксонов нейронов. Таким образом, миелин представляет собой своеобразную мембрану, состоящую из липидного бислоя и белков, связанных с ним. Среди белков миелина выделяют так называемые внутренние (intrinsic) и внешние (extrinsic) белки. Первые прочно связаны с мембраной, проходя сквозь нее, в то время как другие, расположенные поверхностно, связаны слабее. Подобная мембрана является асимметричной по химическому составу и электрическому заряду.

Процесс формирования миелина отростками глиальных клеток сопровождается вытеснением цитоплазмы из этих клеток таким образом, что цитоплазматические поверхности мембраны плотно соприкасаются друг с другом, образуя так называемую главную плотную линию (major dense line). Одной из биохимических характеристик, которая отличает миелин от других биологических мембран, является высокое соотношение липид/белок. Белки составляют от 25 до 30% массы сухого вещества миелиновой оболочки. На долю липидов приходится приблизительно 70–75% от сухой массы белого вещества ЦНС млекопитающих.

Основной функцией миелина является обеспечение быстрого проведения нервного импульса по аксонам, которые он окружает. Мембраны клеток, формирующих миелин, плотно соприкасаются, что обуславливает высокое сопротивление и малую емкость, обеспечивая, таким образом, аксону эффективную изоляцию и предотвращая продольное распространение импульса. Миелин прерывается только в области перехватов Ранвье, которые встречаются через определенные промежутки длиной примерно 1 мм. В связи с тем, что ионные токи не могут проходить сквозь миелин, вход и выход ионов осуществляется лишь в области перехватов. Это ведет к увеличению скорости проведения нервного импульса. Таким образом, по миелинизированным волокнам импульс проводится приблизительно в 5–10 раз быстрее, чем по немиелинизированным. Помимо передачи нервного импульса миелин участвует в питании нервного волокна, а также выполняет структурную и защитную функции (Чехонин и др., 2000).

Основной белок миелина, строение, физико-химические свойства. При электрофоретическом анализе в полиакриламидных гелях экстрактов миелиновой оболочки человека определяется до 10 полос (Beniac et al., 2000). Основную полосу (около 50% всех белков) составляет ПЛП с молекулярной массой порядка 30 кДа. Вторым в количественном соотношении (около 30%) является основной аутоантиген при РС ОБМ, представленный тремя изоформами с молекулярными массами 17,5, 18,5 и 21,5 кДа. Третья из них кодируется 7 экзонами; в результате делеции 2 экзонов синтезируется белок с молекулярной массой 18,5 кДа. При кодировании же изоформы массой 17,5 кДа делеции подвержены 5 экзонов. Показано, что ген ОБМ человека расположен на 18-й хромосоме и имеет 3 промоторные области, с которых начинается считывание информации (Чехонин и др., 2000).

ОБМ содержит необычайно высокий процент (приблизительно 25%) основных аминокислот, равномерно распределенных по всей полипептидной цепи, что и обуславливает очень высокую изоэлектрическую точку ОБМ (pI более 12). Основная изоформа ОБМ с молекулярной массой 18,5 кДа в дальнейшем может быть субфракционирована в щелочной среде по зарядам. Подобная неоднородность заряда возникает в результате фосфорилирования и дезаминирования *in vivo* (Riederer et al., 1984). Так, например, в бычьем ОБМ различают шесть различно модифицированных вариантов изоформы 18,5 кДа, обозначаемые С1-С6. С1 не модифицирован; С2 содержит дезаминированный Gln¹⁴⁶; в С3 фосфорилированы остатки Thr⁹⁷ и Ser¹⁶⁴; в С4 фосфорилированы два остатка серина Ser^{54,160} и Thr⁹⁷; в С5 фосфорилированы Ser^{7,54,164} и Thr⁹⁷; в С6 – четыре остатка серина Ser^{7,54,160,164}, а также Thr⁹⁷ (Zand et al., 1998)1. Другая посттрансляционная модификация белка заключается в метилировании остатка Arg¹⁰⁷, она катализируется специфической аргинин-метилтрансферазой. Регуляция данного фермента оказывает значительное влияние на формирование миелиновой оболочки, так как при недостаточном метилировании ОБМ нарушается его интеграция в миелиновую мембрану (Amur et al., 1984). Все изоформы ОБМ могут подвергаться ацетилированию N-конца. Чрезвычайно важный эффект дезаминирования ОБМ был установлен коллективом авторов в (Musse et al., 2006). Они показали, что в форме С8 участок Val⁸³-Thr⁹² теряет свою спиральную структуру; это приводит к его выходу из билипидного слоя и повышенной чувствительности к протеолизу, что делает его гораздо более доступным компонентам иммунной системы (Husted, 2006). Потеря положительного заряда также приводит к повышенной чувствительности ОБМ к протеазам. Установлено, что при дезаминировании более чем 7 положительно заряженных остатков аргинина молекула ОБМ становится крайне чувствительна к протеолизу Катепсином D (Pritzker et al., 2000). Проведенное авторами молекулярное моделирование показало дестабилизацию третичной структуры. Аналогичные результаты были получены в случае дегградации ОБМ стромелизином-1 (MMP-3) (D'Souza, Moscarello, 2006). Еще одна протеаза, по-видимому, вовлеченная в процесс протеолиза и презентации ОБМ, это трипсин-4 (Medveczky et al., 2006). Интересно отметить, что недавно появились данные об аутокаталитическом разрушении ОБМ как альтернативном механизме его презентации иммунной системе (D'Souza et al., 2005). Авторы в очередной раз отмечают, что дезаминированный ОБМ С8 легче подвергается самодеградации, в то время как присутствие липидов, наоборот, стабилизирует белок.

Достаточно подробно изучены контакты ОБМ с внутриклеточными белками. Показано взаимодействие пролин-богатой области ОБМ, следующей сразу за α -спиральным участком энцефалитогенного фрагмента, с SH-3 доменами тирозинкиназ Yes1, Fyn, c-Src, киназ Abl, Itk, PSD95, а также с белком коратактин (Polverini et al., 2008). Константы взаимодействия лежат в микромолярном диапазоне. Также обнаружено Ca²⁺-зависимое связывание молекулы ОБМ с кальмодулином. Участки связывания предположительно находятся в С-концевой области молекулы и в районе фрагмента 82–93 (Libich et al., 2003). Данные наблюдения подтверждают ассоциацию ОБМ с мембраной и цитоскелетом, а также его возможное значение в передаче трансмембранного сигнала.

6. Роль аутоантител в патогенезе РС

В норме В-клетки не способны преодолевать гематоэнцефалический барьер, однако при развивающемся воспалении его проницаемость может нарушаться, открывая доступ в ЦНС В-клеткам, иммуноглобулинам и белкам комплемента. В-клетки могут служить антиген-презентирующими для аутореактивных Т-клеток, привлекать их в ЦНС и производить костимуляцию (Sospedra, Martin, 2005). Так, у больных наблюдается накопление в ЦНС клонально родственных В-клеток (Colombo et al., 2000) и повышенный синтез в ткани мозга и спинномозговой жидкости антител, специфичных к ОБМ, ПЛП и МОГ (Reindl et al., 1999), а также к ДНК и другим компонентам нервных тканей. Показано, что уровень аутоантител к ОБМ коррелирует с воспалительным процессом в ЦНС, согласно данным МРТ (Kuhle et al., 2007a). Анализ аутореактивных клонов В-клеток показал повышенную встречаемость семейств D2, D3, JH4 и зародышевых линий VH1–69, VH4–34 и VH4–39 (Baranzini et al., 1999).

Превалирующим иммуногенным компонентом миелина для В-клеток человека является ОБМ, он же является наиболее сильным индуктором ЭАЭ у животных. При исследовании роли В-клеточного звена в патогенезе РС было показано, что у некоторых больных количество антител-продуцирующих В-лимфоцитов, специфичных к ОБМ, составляло в тканях мозга более 50% в общем пуле В-клеток (Gerritse et al., 1994). С другой стороны, IgG-опосредованный фагоцитоз миелинового дебриса макрофагами и активация комплемента внутри ЦНС являются косвенными доказательствами участия антител в патогенезе РС. Группой исследователей (Egg et al., 2001) было показано, что у 72% больных РС в сыворотке детектируются анти-МОГ антитела и в 59% случаев обнаруживаются аутоантитела к ОБМ. При этом среди иммуноглобулинов к названным антигенам доминировали изотипы IgM, а также IgG₁ и IgG₃. При скрининге пациентов с риском заболевания РС на присутствие аутоантител к МОГ и ОБМ было установлено, что 83% больных с положительным ответом на анти-МОГ и 95% на оба антитела имели первое обострение в течение 52 месяцев, в то время как 77% испытуемых, сыворотка крови которых не содержала ни одно из этих антител, не были затронуты болезнью. Данное наблюдение, возможно, позволит диагностировать РС в его доклинической форме (Berger et al., 2003).

Известно, что у мышей, дефицитных по В-системе иммунитета, возможно индуцировать ЭАЭ энцефалитогенным пептидом МОГ³⁵⁻⁵⁵, однако они резистентны к цельному белку (Lyons et al., 1999). **Это наблюдение очередной раз подчеркивает факт о необходимости В-клеточной системы для корректного презентирования антигена и инициации значимого аутоиммунного заболевания.** Линии В-клеток узнают различные эпитопы МВР, в первую очередь область от 84-го до 102-го аминокислотного остатка. К.Г. Уоррен и И. Кац (Warren, Catz, 1995) в своих работах неоднократно демонстрировали, что внутривенное введение больным РС синтетических пептидов, повторяющих иммунодоминантные эпитопы ОБМ (ОБМ⁷⁵⁻⁹⁵), приводит к значительному снижению титра анти-ОБМ антител как в сыворотке, так и в спинномозговой жидкости (Warren, Catz, 1995). Эти же исследователи в своих дальнейших публикациях (Warren, Catz, 1997) показали, что наиболее им-

мунодоминантным эпитопом ОБМ, с наибольшей эффективностью блокирующим аутоантитела к ОБМ, является последовательность аминокислот, расположенная между 85-м и 96-м пролинами, а именно: ⁸⁵PVVHFFKNIVTP⁹⁶.

Интересно, что, как уже упоминалось, подобный пептид можно использовать в качестве эффективного индуктора ЭАЭ у модельных животных. Однако только использование полноразмерной молекулы ОБМ и пептида МОГ 91-106 приводит к возникновению так называемого «epitope spreading», т.е. переключению иммунной системы на другие эпитопы и молекулы нейроантигенов (Bischof et al., 2004). Перечисленные сведения о деградации ОБМ свидетельствуют о важности этого процесса для презентации этого нейроантигена компонентам иммунной системы. В ранних работах лаборатории биокатализа ИБХ РАН было показано, что протеолиз этого белка может осуществляться аутоантителами (Ponomarenko et al., 2002), что нашло подтверждение в работах других авторов (Polosukhina et al., 2004). Развитие этой работы состояло в исследовании специфичности антитело-зависимого связывания и процессинга ОБМ и его фрагментов, а также возможности применения этого процесса для диагностики РС.

Активность аутоантител была нами охарактеризована по реакциям протеолиза с использованием неспецифических (биотинилированный бычий сывороточный альбумин (БСА), МОГ, тиоредоксин I *E. coli*) и специфического (ОБМ) субстратов. Результаты, представленные на рис. 1, свидетельствуют о том, что препараты антител, выделенных из сывороток больных РС и модельных мышей линии SJL с индуцированным ЭАЭ, обладали каталитической активностью только в отношении ОБМ.

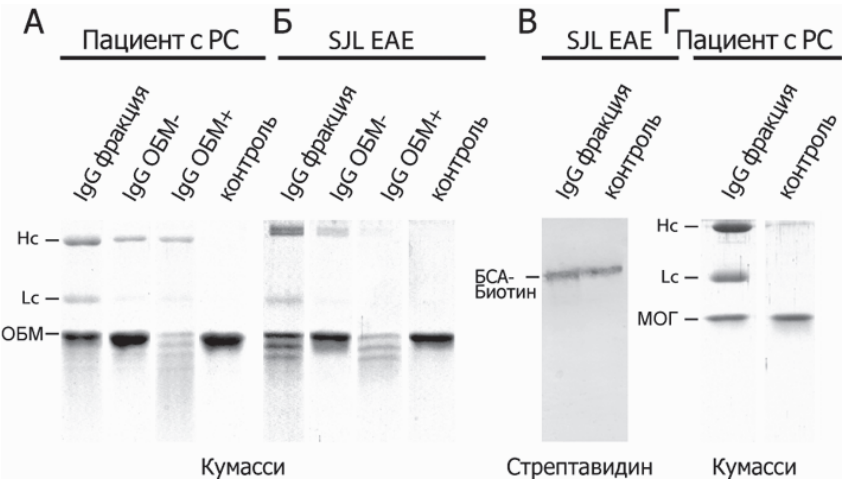


Рис. 1. Электрофореграмма (А, Б, Г) и иммуноблот (В) образцов гидролиза ОБМ (А), БСА (В) и МОГ (Г) препаратами антител, полученными из сывороток больных рассеянным склерозом (А, Г) и модельных мышей линии SJL с индуцированным ЭАЭ (экспериментальный аутоиммунный энцефаломиелит, ЕАЭ) (Б, В)

Показана протеолитическая активность суммарного пула иммуноглобулинов класса G (IgG фракция), а также сорбирующихся (IgG ОБМ+) и не сорбирующихся (IgG ОБМ-) на иммобилизованный ОБМ антител. Легкие и тяжелые цепи антител обозначены Lc и Hc соответственно. Адаптировано из (Ponomarenko et al., 2006)

Контрольные антитела из пулированной сыворотки здоровых доноров проявляли фоновый уровень протеолитической активности ко всем описанным субстратам.

Для определения сайт-специфичности гидролиза ОБМ аутоантителами было применено сочетание методов обращенно-фазовой хроматографии, трицинового белкового электрофореза и масспектрометрии SELDI. На первом этапе продукты гидролиза были разделены с использованием обращенно-фазовой хроматографии на колонке C₄ (рис. 2А). Далее образцы фракций анализировали с использованием

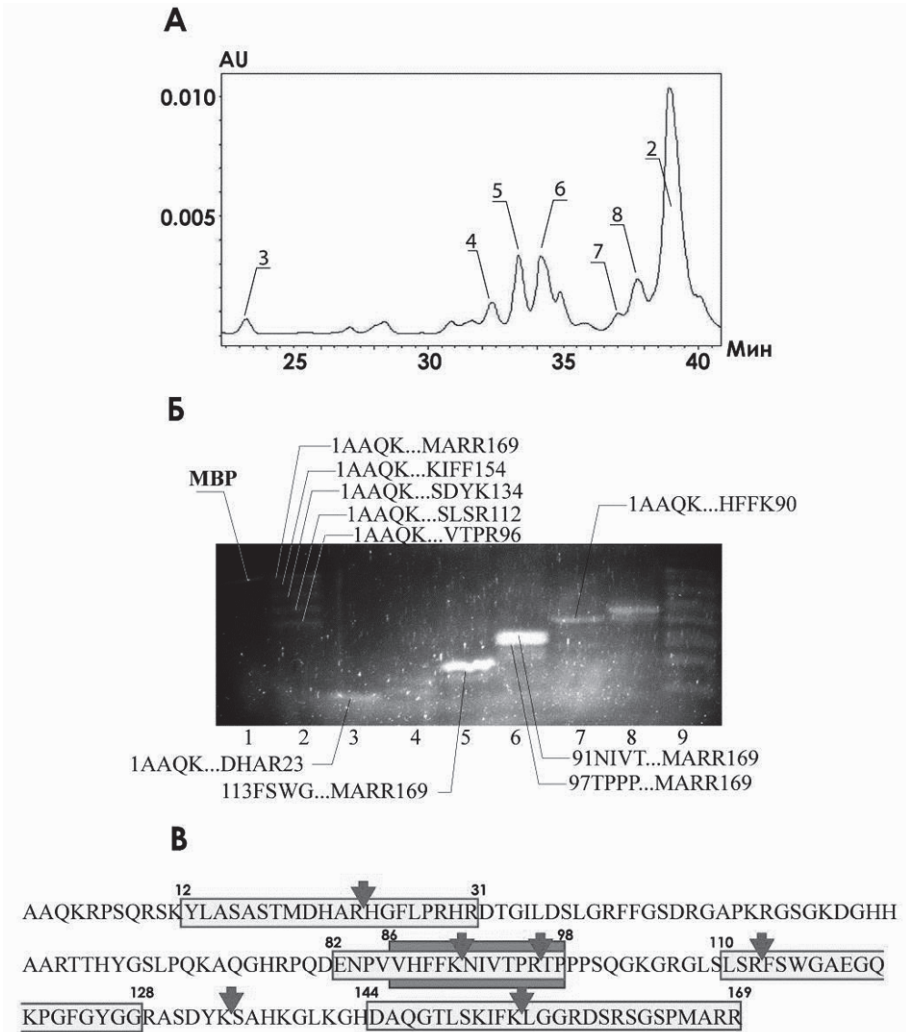


Рис. 2. Обращенно-фазовая хроматография продуктов гидролиза ОБМ аутоантителами (А) и анализ образцов посредством трицинового электрофореза (Б): 1 – полноразмерный ОБМ, 2–8 – фракции, полученные при разделении продуктов гидролиза на обращенной фазе (соответствующие им пики на (А) обозначены теми же номерами), 9 – гидролизат до разделения; стрелками показаны идентифицированные фрагменты. В – основные сайты гидролиза ОБМ специфическими аутоантителами (стрелки)

Светло-серым отмечены иммунодоминантные районы белка, темно-серым обозначен энцефалитогенный пептид. Адаптировано из (Ponomarenko et al., 2006)

трицинового электрофореза, с последующей детекцией низкомолекулярных пептидов при помощи флуоресцентного красителя Sypro Orange (рис. 2Б). Молекулярная масса преимущественных в количественном отношении и четко детектируемых на гидролизате до разделения (см. рис. 2Б, дорожка 9) продуктов была уточнена SELDI масспектрометрией. В результате объединения экспериментальных результатов и картирования молекулярных масс продуктов протеолиза относительно аминокислотной последовательности ОБМ удалось идентифицировать каждый фрагмент в структуре ОБМ (см. рис. 2Б, обозначены стрелками). В итоге было показано присутствие шести основных сайтов гидролиза ОБМ специфическими аутоантителами (рис. 2В).

При анализе характера расщепления ОБМ антителами (см. рис. 2) стало очевидным, что пять из шести сайтов гидролиза расположены в иммунодоминантных районах ОБМ, распознаваемых молекулами главного комплекса гистосовместимости II класса (HLA-DR2), вовлеченными в презентацию антигенов при РС (Hafler et al., 2005), а два локализованы на энцефалитогенном пептиде – индукторе ЭАЭ у модельных животных.

Для определения различий в скорости гидролиза ОБМ по отдельным сайтам было необходимо ввести специфическую метку с известной локализацией в молекулу ОБМ. Ранее *in vitro* было показано, что протеинкиназа С фосфорилирует бычий ОБМ преимущественно по остаткам Ser⁷, Ser⁵⁴, и в малой степени Ser¹⁰⁹, Ser¹¹⁴ и Ser¹⁵⁰ (Kishimoto et al., 1985). Данный способ модификации белка был признан подходящим для анализа. Для детекции продуктов гидролиза ³²P-меченного *in vitro* ОБМ был применен трициновый электрофорез в ПААГ с последующей автордиографией (рис. 3). Полученные результаты на качественном уровне демонстрируют, что гидролиз протекает независимо и с примерно равной скоростью по всем основным сайтам (Ponomarenko et al., 2006).

6.1. Исследование субстратной специфичности анти-ОБМ аутоантител на модельных пептидах

Дальнейшее исследование специфичности аутоантител мы проводили с помощью сконструированной «эпитопной библиотеки» перекрывающихся пептидов в составе слитных белков с тиоредоксином, соответствующей полной последовательности ОБМ (Belogurov et al., 2008; Бачева и др., 2011). Этот подход был выбран на основании концепции предпочтительного «представления» субстратных пептидов в растворе. Доступность соответствующего эпитопа в качестве потенциального субстрата аутоантител требует придания этому пептидному фрагменту определенной структуры в растворе, что может быть обеспечено лишь в составе биополимера. Для изучения протеолиза отдельных эпитопов ОБМ специфическими антителами были созданы двенадцать генноинженерных конструкций, содержащих последовательности, кодирующие различные фрагменты ОБМ (рис. 4), на основе экспрессионного вектора рЕТ-32b-СН(+). **Между тиоредоксином и последовательностью пептидов ОБМ был помещен линкер (SGGGG)₃S.** Подобный серин-глициновый линкер используется в большом количестве работ для придания гибкости и

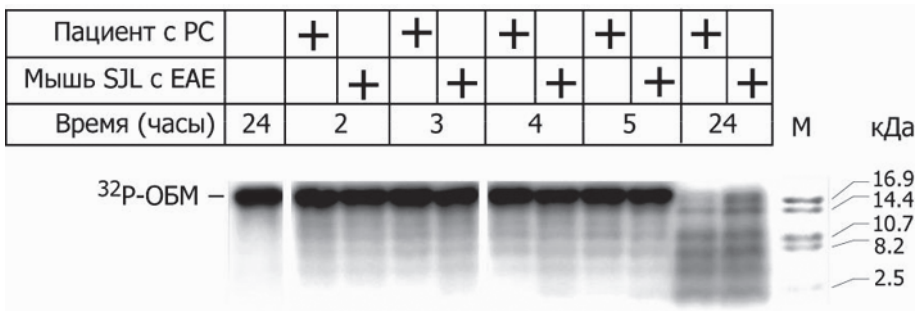


Рис. 3. Электрофореграмма продуктов гидролиза фосфорилированного ^{32}P ОБМ специфичными аутоантителами, полученными от больных РС и модельных мышей линии SJL с индуцированным ЭАЭ, визуализированная с помощью автордиографии
 Представлены точки, соответствующие 2, 3, 4, 5 и 24 часам прохождения реакции. М – низкомолекулярный маркер. Адаптировано из (Ponomarenko et al., 2006)

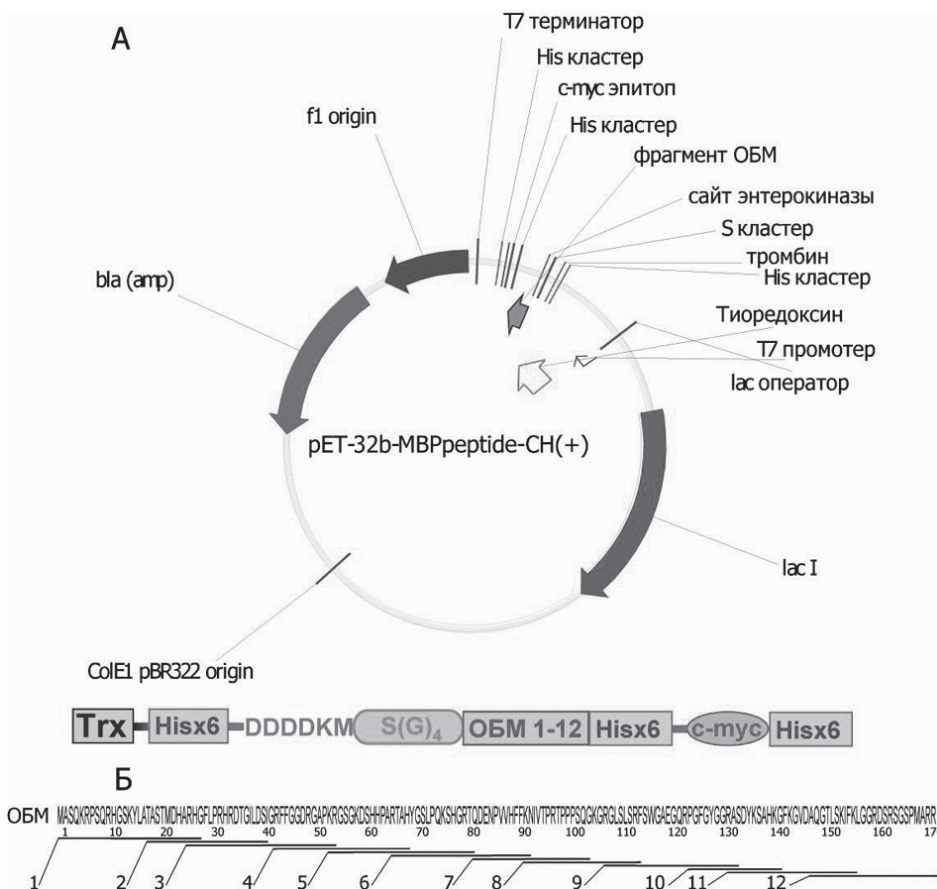


Рис. 4. А – схема плазмидного вектора, сконструированного для экспрессии фьюжн-белка тиоредоксина *E. coli* с фрагментами ОБМ. Б – аминокислотная последовательность ОБМ человека. Показано распределение пептидов 1-12 на последовательности ОБМ. Адаптировано из (Ponomarenko et al., 2006)

подвижности конструируемым рекомбинантным белкам. Наличие подобного пептидного линкера содействует корректной презентации фрагментов ОБМ в составе фьюжн-белка с тиоредоксином.

Для характеристики субстратной специфичности антител фьюжн-белки тиоредоксина с фрагментами ОБМ инкубировали с иммуноглобулинами (суммарная IgG фракция), выделенными из сыворотки крови 26 больных РС, 22 пациентов с другими нейродегенеративными заболеваниями (other neurological diseases, OND), 11 здоровых доноров (healthy donors, HD) и мышей аутоиммунной линии SJL с ЭАЭ, индуцированным иммунизацией ОБМ (Belogurov et al., 2008). Как видно из приведенных электрофореграмм (рис. 5), в случае пациентов с РС и остеохондрозом (OND) протеолизу подвергались только пептиды, содержащие энцефалитогенную последовательность ОБМ. С другой стороны, у мышей SJL с ЭАЭ, предрасположенных к развитию аутоиммунных заболеваний, наблюдался множественный гидролиз перекрывающихся эпитопов ОБМ.

Каталитические свойства проявили антитела, изолированные из сывороток крови 77% пациентов с прогрессирующим и 85% с ремитирующим типом течения РС. Среди больных нейродегенеративными заболеваниями и здоровых доноров доля положительного каталитического ответа была 9% и 0% соответственно (рис 6). Исключение составили два случая остеохондроза, при которых было отмечено наличие каталитической деградации пептида ОБМ под действием аутоантител. Причем эти больные характеризовались значительной длительностью патологического процесса и серьезными нейрональными поражениями. Расщепление рекомбинантных белков бычьим трипсином, катепсином D и металлопротеазой матрикса 3 (MMP-3) (см. рис. 5, нижняя часть) проводили как контроль на специфичность гидролиза. Для всех исследованных антител методом масспектрометрии SELDI сайты гидролиза были локализованы исключительно в рекомбинантных фрагментах ОБМ (рис. 7, табл. 4), белок-носитель и линкерная часть оставались интактными. Причем, в случае абзимов, выделенных из сыворотки крови мышей линии SJL, сайты гидролиза рекомбинантных фрагментов повторяют таковые в нативном белке (см. рис. 7). При детальном анализе продуктов расщепления энцефалитогенного пептида антителами было обнаружено, что сайтами гидролиза являются как Lys⁹¹ так и Arg⁹⁷, причем лишь у двух пациентов степень расщепления по двум приведенным сайтам оказалась сравнимой (см. табл. 4). В большинстве случаев при РС наиболее предпочтительным для гидролиза являлся аргининовый сайт. Приведенные результаты свидетельствуют о том, что каталитические антитела, специфичные к участку ОБМ⁸¹⁻¹⁰³, составляют подавляющее большинство в общем пуле ОБМ-гидролизующих иммуноглобулинов при РС. Полученные данные находятся в соответствии с сообщениями относительно В-клеток, полученных от больных РС, узнающих преимущественно данный эпитоп, а также хорошо согласуются с фактом значительной иммунодоминантности этого фрагмента при представлении молекулами главного комплекса гистосовместимости II класса патогенных Т-клеток (Ota et al., 1990; Hafler, 2004). В случае мышей линии SJL, предрасположенных к развитию аутоиммунных заболеваний, репертуар протеолитических IgG, специфичных к ОБМ, намного шире и включает в себя антитела практически на все исследован-

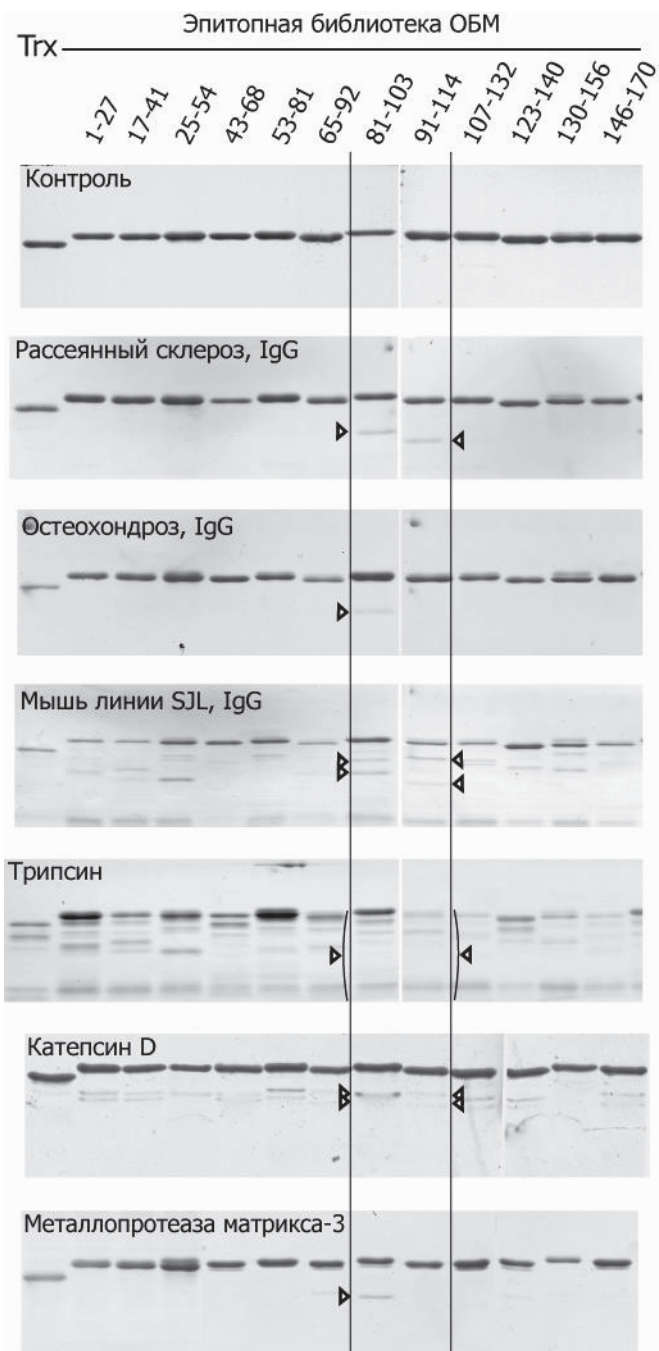


Рис. 5. Гидролиз эпитопной библиотеки аутоантителами и протеазами

Сверху вниз: контроль; гидролиз модельных пептидов протеолитическими антителами, полученными от пациента с РС, с остеохондрозом, аутоиммунных мышей линии SJL с ЭАЭ, индуцированным ОБМ; или же бычьим трипсином, катепсином D и металлопротеазой матрикса 3. Адаптировано из (Belogurov et al., 2008)

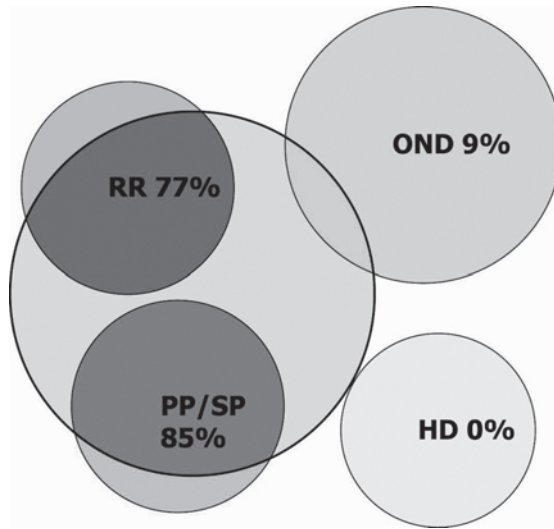


Рис. 6. Схематическое представление доли пациентов с различными формами РС (RR – ремитирующая, PP/SP – прогрессирующая), больных другими нейродегенеративными заболеваниями (OND), а также здоровых доноров, антитела которых проявляли каталитическую активность. Адаптировано из (Belogurov et al., 2008)



Рис. 7. Схема слитных белков, содержащих различные последовательности ОБМ человека

Сайты гидролиза рекомбинантных фрагментов основного белка миелина специфичными иммуноглобулинами, изолированными из пациентов с рассеянным склерозом (обозначены серым) и мышей линии SJL с ЭАЭ (отмечены белым). Адаптировано из (Belogurov et al., 2008)

ные пептиды (см. рис. 5). Сайты гидролиза рекомбинантных фрагментов данными антителами (см. рис. 7) в целом аналогичны действию на них неспецифической протеазы, однако по сравнению с ограниченным трипсинолизом не распространяются на тиоредоксин и линкерную часть. Объяснением возникновения такого разнообразия ОБМ-специфичных протеолитических антител у мышей линии SJL при иммунизации основным белком миелина может служить уже упоминавшаяся ранее особенность данной модельной линии – крайнее высокая частота индукции клонов В-клеток, продуцирующих каталитические антитела. Сравнение сайтов расщепления рекомбинантных субстратов из сконструированной нами библиоте-

Сайты гидролиза модельных пептидов аутоантителами, выделенными из сывороток крови пациентов с РС, и протеолитическими ферментами

№ Пациента/ фермент	Стадия РС	⁸¹ QDENPW H F F K N I V T P R T PPSQ ¹⁰³
MS32	RR/R	
MS37	RR/R	
MS38	RR/E	
MS39	RR/E	
MS40	RR/R	
MS41	RR/R	
MS43	RR/R	
MS75	RR	
MS78	RR/R	
MS79	RR/E	
MS80	RR/R	
MS81	RR/R	
MS82	RR/R	
MS28	SP	
MS31	PP	
MS33	SP/E	
MS34	SP/E	
MS35	SP/E	
MS36	SP/E	
MS42	SP/E	
MS44	PP/E	
MS45	PP/E	
MS46	SP/R	
MS76	SP	
MS77	SP	
MS83	SP	
Трипсин		
MMP -3		
Cathepsin D		

RR – ремиттирующий, PP – первично прогрессирующий, SP – вторично прогрессирующий тип РС; E – обострение, R – ремиссия, основные сайты отмечены светло-серым цветом, темно-серым показаны минорные.

ки под действием аутоантител и набора протеиназ, в том числе специфичных к ОБМ (см. рис. 5, 7, табл. 4), приводит к выводу о достаточно значительных отличиях в специфичности этих биокатализаторов (процессинг полноразмерного белка аналогичными биокатализаторами представлен в табл. 5). Этот факт позволил нам

Сайты протеолиза основного белка миелина различными протеазами и каталитическими антителами

Желатиназа В (<i>GelB</i>)		F90K91	S110L111 F114S115	D133Y134
Металлопротеаза матрикса MMP-3		F89F90	R113F114	D133Y134
Катепсин D (<i>CatD</i>)	F43F44	F89F90		
Автокатализ (<i>ACat</i>)		A64R65 Q74K75	F90K91 F89F90	F114S115
Абзимы (<i>Abz</i>) R25H26		R97T98	R113F114	K135S136 K155L156
Лизосомные протеазы (<i>LP</i>)	F43F44	F89F90K91 N92I93	F114S115	A131S132 Q147G148
Трипсин 4 (<i>Tryp4</i>) R25H26		R65T66	R97T98	



А

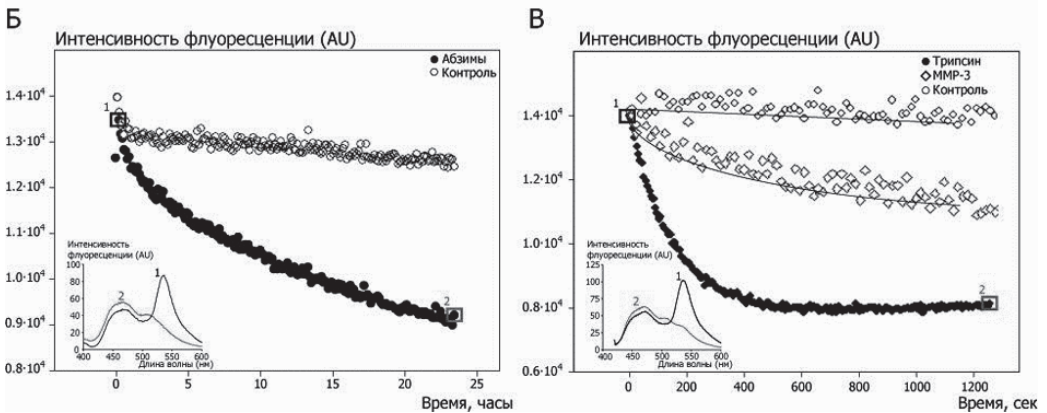
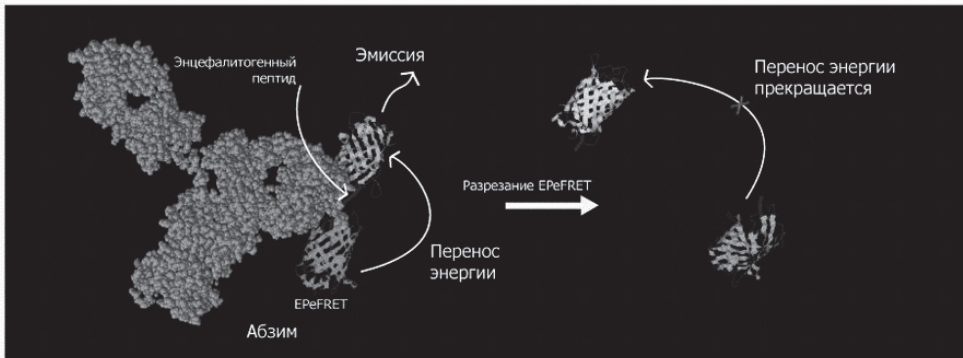


Рис. 8. А – принципиальная схема FRET-подхода к исследованию кинетики абзиматической реакции. Б, В – расщепление белка EpeFRET абзимами и модельными протеазами соответственно.

Во врезке показано изменение спектра флуоресценции во времени. Адаптировано из (Belogurov et al., 2008)

поставить вопрос о «специфическом модельном субстрате» для возможного скринингового анализа сывороток больных РС и гибридом, продуцирующих моноклональные каталитические антитела к ОБМ.

На основании данных по «дифференциальной специфичности» по сравнению с расщеплением протеиназами для реакции с аутоантителами нами был выбран фрагмент 81–103, содержащий энцефалитогенную последовательность ОБМ, для интеграции во FRET-пару. Для этого на основе векторарQe30 была создана генно-инженерная конструкция, экспрессирующая два флуоресцентных белка PS-CFP2 и TurboYF, соединенные вышеуказанным пептидом ОБМ, так называемый «EpeFRET»-белок (рис. 8А). При разрезании линкера прекращается резонансный перенос энергии и происходит падение флуоресценции (рис. 8Б,В).

6.2. Кинетические исследования гидролиза ОБМ и EpeFRET (ОБМ81-103)

Для определения кинетических констант гидролиза ОБМ специфичными иммуноглобулинами высокоочищенные антитела (IgG ОБМ+ фракция) инкубировали с ОБМ, а затем аликвоты реакционной смеси наносили на обращенно-фазовую колонку C_4 для определения степени гидролиза субстрата (Ponomarenko et al., 2006). На основе полученных данных была построена полная кинетическая кривая, а соответствующие кинетические константы определены из графика в координатах Уокера-Шмидта (рис. 9). Каталитическая эффективность $k_{\text{кат}}/K_m$ составила $1.1 \cdot 10^3$ и $3.0 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{c}^{-1}$ в случае антител человека и мыши, соответственно (табл. 6). Данные величины более чем на два порядка ниже по сравнению с специфичными протеазами, например, энтерокиназой быка, эффективность которой по отношению к природному субстрату трипсиногену составляет $7.1 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{c}^{-1}$. В то же время, каталитическая эффективность изучаемых антител в большинстве случаев превосходит значения, продемонстрированные для ранее полученных абзимов. Можно предположить, что достаточно медленное, но направленное действие антител по протеолизу ОБМ, возможно, играет определенную роль в разрушении миелиновых структур и патогенезе РС.

Кинетические константы гидролиза EpeFRET аутоантителами, трипсином и металлопротеазой матрикса – 3, а также ингибирование данной реакции слитными белками и препаратом Копаксон, известным лекарственным средством при РС (см. ниже), представляющем собой сополимер лизина, глутаминовой кислоты, аланина и тирозина, представлены в табл. 7 и на рис. 10 (Belogurov et al., 2008). Каталитическая эффективность изученных биокатализаторов уменьшалась примерно на порядок в ряду трипсин – MMP-3 – абзим. Интересно, что значение $k_{\text{кат}}/K_m$ реакции гидролиза полноразмерного белка и модельного субстрата EpeFRET в случае каталитических антител оказалось близким и различается в пределах ошибки. Характер ингибирования расщепления EpeFRET слитными белками тиоредоксина с фрагментом ОБМ 81-103, его мутантом R97A, белком-носителем и Копаксонем радикально отличается в случае катализа абзимами и модельными протеазами. Если

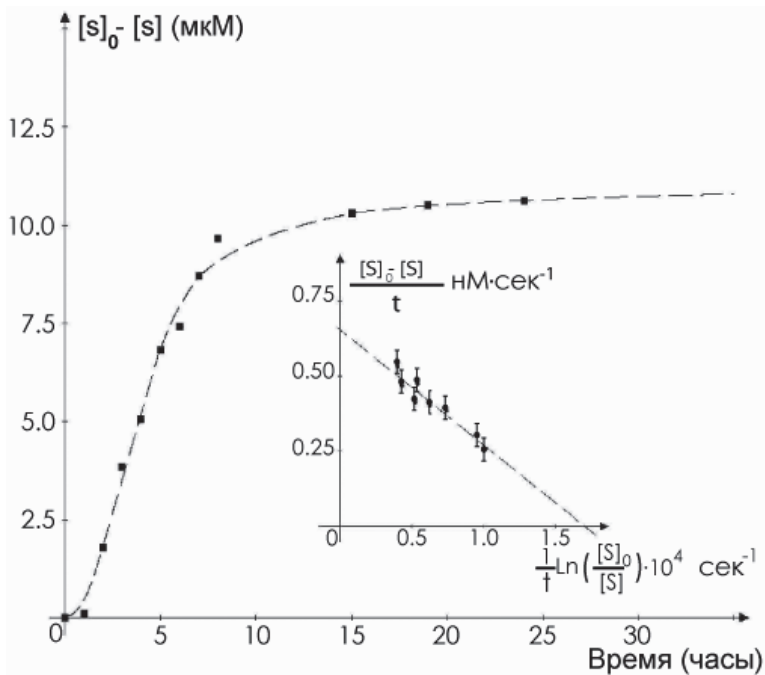


Рис. 9. Полная кинетическая кривая гидролиза ОБМ специфическими аутоантителами (А)
 На врезке данные представлены в координатах Уокера-Шмидта. Адаптировано из (Ропотагенько et al., 2006)

Таблица 6

Кинетические константы гидролиза ОБМ аутоантителами

Пациент с PC SJL EAE	K_m (M)	$k_{кат}$ (с ⁻¹)	$k_{кат}/K_m$ (с ⁻¹ M ⁻¹)
	$(7,0 \pm 3,0) \cdot 10^{-6}$	$(0,8 \pm 0,2) \cdot 10^{-2}$	$(1,1 \pm 0,5) \cdot 10^3$
$(4,0 \pm 1,0) \cdot 10^{-6}$	$(1,1 \pm 0,3) \cdot 10^{-2}$	$(3,0 \pm 1,3) \cdot 10^3$	

Таблица 7

Кинетические константы гидролиза EPeFRET аутоантителами и модельными протеазами, а также ингибирование данной реакции слитными белками и Копаксином

Тип био-катализатора	Кинетические константы гидролиза EPeFRET			Ингибирование реакции гидролиза EPeFRET (IC ₅₀ μM)			
	K_m (μM)	$k_{кат}$ (с ⁻¹)	$k_{кат}/K_m$ (с ⁻¹ M ⁻¹)	ОБМ81-103	ОБМ81-103 R97A	Тгх	Соракхоне
Трипсин	$(3,5 \pm 0,4) \cdot 10^1$	$8,8 \pm 1,5$	$(2,5 \pm 0,7) \cdot 10^5$	$3,1 \pm 0,7$	$1,8 \pm 0,6$	$2,9 \pm 0,3$	$(2,0 \pm 0,1) \cdot 10^{-1}$
ММР-3	$6,4 \pm 0,8$	$(2,4 \pm 1,0) \cdot 10^{-1}$	$(3,8 \pm 1,8) \cdot 10^4$	$8,2 \pm 0,8$	$(1,2 \pm 0,1) \cdot 10^1$	$(1,5 \pm 0,1) \cdot 10^1$	$(2,0 \pm 0,1) \cdot 10^1$
Абзим	$7,6 \pm 0,9$	$(1,4 \pm 0,2) \cdot 10^{-2}$	$(1,8 \pm 0,5) \cdot 10^3$	$(7,0 \pm 2,0) \cdot 10^{-3}$	$(9,0 \pm 1,0) \cdot 10^{-2}$	Не действ.	$(1,0 \pm 0,2) \cdot 10^{-1}$

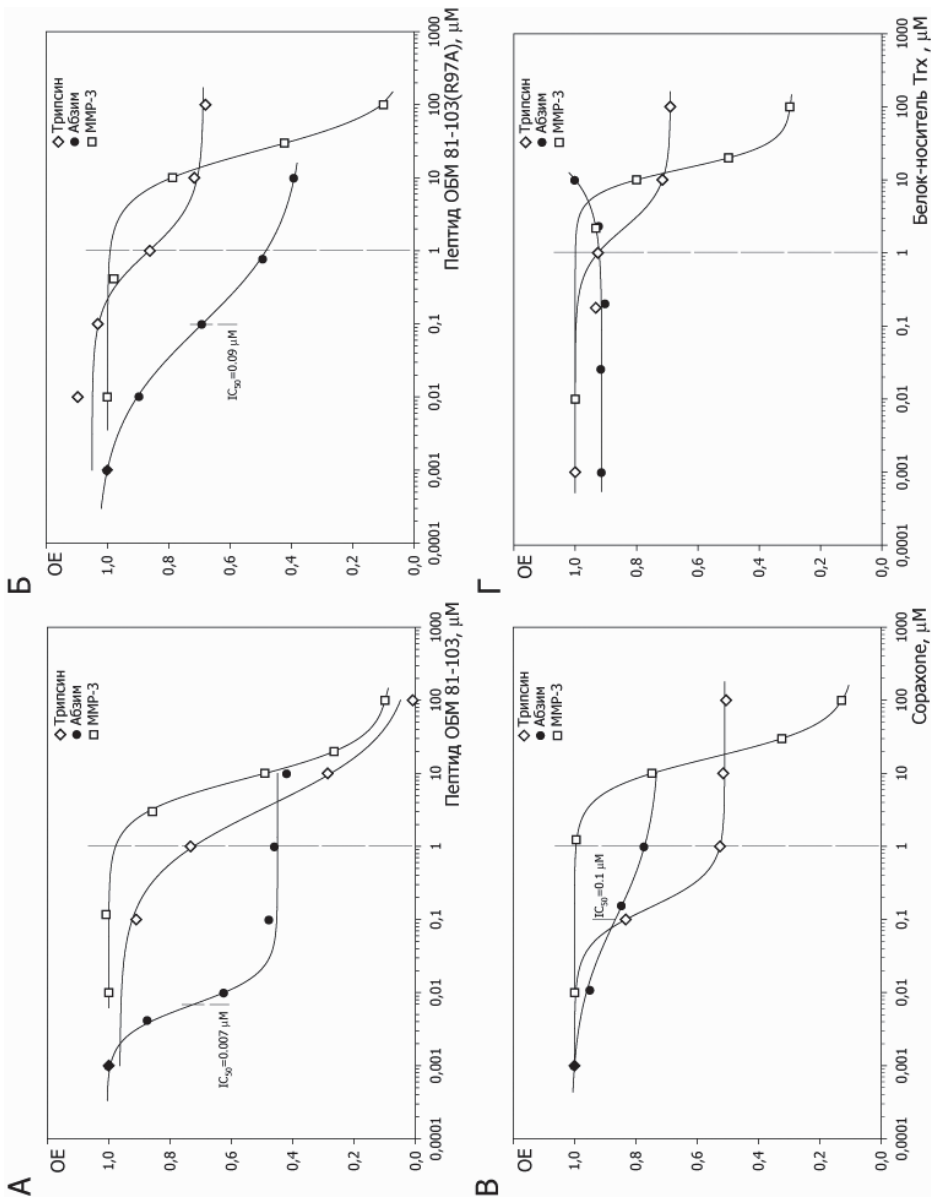


Рис. 10. Кривые ингибирования абзиматического и ферментативного гидролиза ERFRET слитным белком Tg с фрагментом ОБМ81-103 (А), его мутантом R97A (Б), Колаксоном (В) и белком-носителем (Г)

Адаптировано из (Belougov et al., 2008)

для каталитических антител способность к ингибированию в ряду Тгх-ОБМ81-103, Тгх-ОБМ81-103(R97A). Тгх падает со значения IC_{50} $7.0 \cdot 10^{-3}$ до >100 мкМ, то для ферментов рассчитанные значения IC_{50} находятся в диапазоне от 3 до 20 мкМ независимо от типа ингибитора. Эффективное ингибирующее действие Копаксона на реакцию, катализируемую трипсином, по-видимому, объясняется высоким (до 29%) содержанием остатков лизина в этом сополимере.

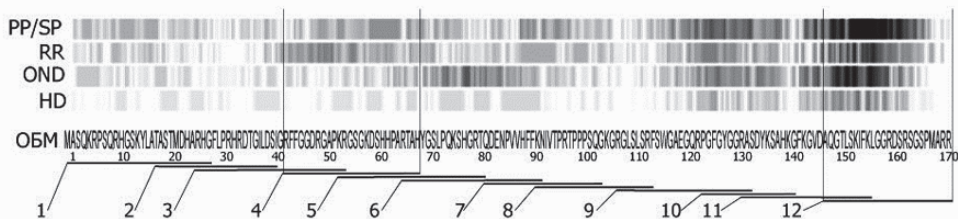
С использованием тех же групп пациентов и здоровых доноров была проанализирована связывающая активность к ОБМ и к его эпитопной библиотеке поликлонального пула иммуноглобулинов из сыворотки крови. Уровни аутоантител к фрагментам ОБМ 48-70 и 85-170, а также к полноразмерным молекулам ОБМ и МОГ были достоверно выше в сыворотке крови пациентов с РС в сравнении со здоровыми донорами. Однако специфическое взаимодействие всего лишь с двумя короткими фрагментами ОБМ 43-68 и 146-170 достоверно различалось в паттерне связывания аутоантител при РС и других нейродегенеративных заболеваний (рис. 11). Данный факт еще раз свидетельствует о необходимости тонкого дифференциального подхода к диагностике РС по уровню антител и мимикрирующих под него нейродегенеративных заболеваний неаутоиммунной природы. Противоречивые данные относительно корреляции уровня антител к ОБМ и развития РС могут быть связаны именно с использованием полноразмерной молекулы ОБМ в качестве тестового антигена (Antel, Bar-Or, 2003; Berger et al., 2003; Kuhle et al., 2007b). Интересно, что корреляция уровня антител с EDSS (качественный параметр, характеризующий тяжесть заболевания) была установлена для несколько других фрагментов основного белка миелина 81-103 ($r^2=0.332$; $p=0.024$), 130-156 ($r^2=0.381$; $p=0.011$), 146-170 ($r^2=0.310$; $p=0.033$) (рис. 12), что свидетельствует о разной значимости пептидов ОБМ в инициации и развитии заболевания (Belogurov et al., 2008).

Как уже упоминалось, в последнее десятилетие роль В-клеточного ответа и сопутствующего образования антител к собственным антигенам при различных аутоиммунных заболеваниях приобретает все большее значение. Нами на основе имеющейся выборки пациентов с нейрональными патологиями показано, что каталитическая активность аутоантител по отношению к ОБМ и его фрагментам выделяет РС в сравнении с другими нейродегенеративными заболеваниями значительно больше, чем их связывание с данным антигеном. Продемонстрированная сайт-специфичность каталитических антител в отношении ОБМ и его презентированных пептидов позволяет вплотную подойти к созданию тест-систем для диагностики и терапии РС на основе сконструированных модельных субстратов (Belogurov et al., 2008).

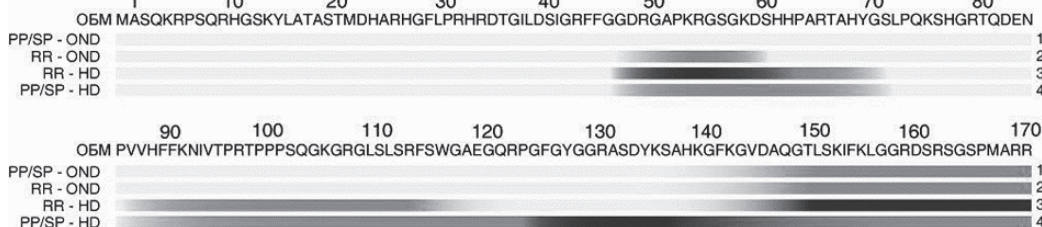
7. Современные методы лечения рассеянного склероза

Лечение РС остается одной из наиболее серьезных проблем современной медицины, хотя достигнутый в последние годы существенный прогресс в понимании механизмов развития заболевания и его патогенеза вселяет надежду на скорый успех в этой области. Если ранее терапевтическая помощь пациентам с РС

A



Б



В

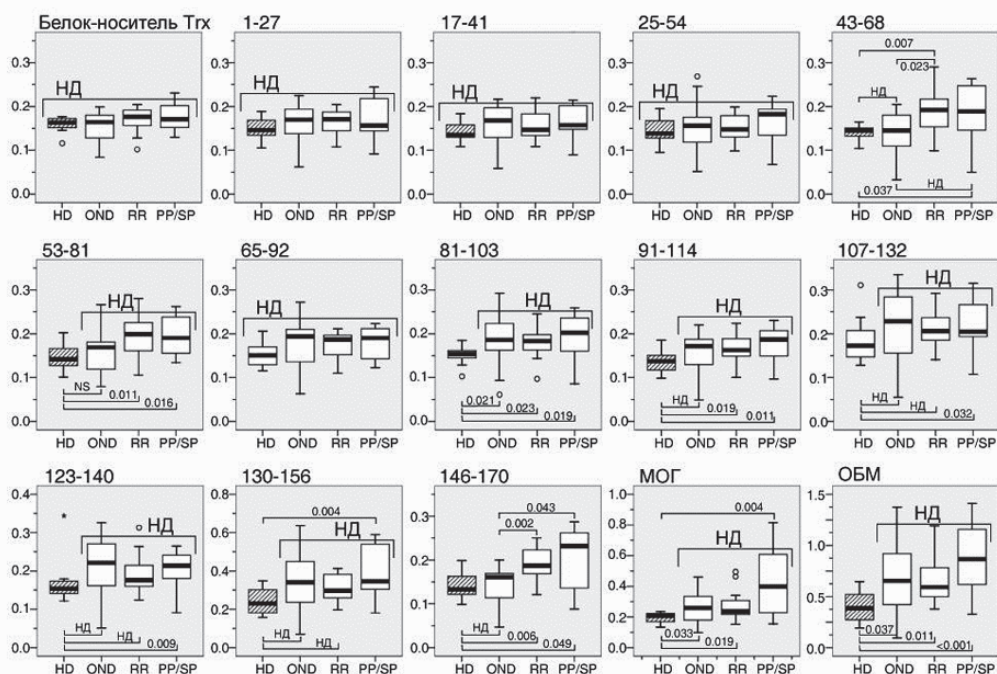


Рис. 11. А – анализ паттерна связывания аутоантител из сывороток крови пациентов с ремитирующим (RR) и прогрессирующим (PP/SP) РС, а также больных дорсопатией (OND) и здоровых доноров (HD) с библиотекой рекомбинантных фрагментов ОБМ. Обозначена последовательность ОБМ и его пептиды в составе слитного белка с тиоредаксином. Усиление цвета соответствует большему связыванию. Б – значение доверительных интервалов статистически значимых различий уровней аутоантител из сывороток крови здоровых доноров (HD), больных дорсопатией (OND), пациентов с ремитирующим (RR) и прогрессирующим (PP/SP) РС к полноразмерным молекулам МОГ и ОБМ, белку-носителю и фрагментам ОБМ. Значения *p* менее 0,05 принимались как статистически значимые. HD – не достоверно. Адаптировано из (Belogurov et al., 2008)

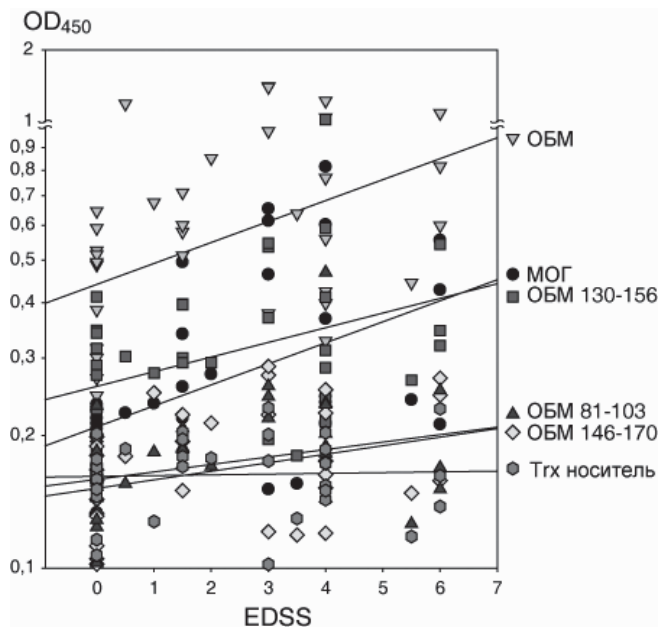


Рис. 12. Корреляция параметра EDSS с уровнем аутоантител из сывороток крови больных РС к белку-носителю тиоредаксину ($r^2 = 0,055$; $p = 0,376$), полноразмерным молекулам ОБМ ($r^2 = 0,458$; $p = 0,005$) и МОГ ($r^2 = 0,520$; $p < 0,001$), а также к различным фрагментам ОБМ 81-103 ($r^2 = 0,332$; $p = 0,024$), 130-156 ($r^2 = 0,381$; $p = 0,011$), 146-170 ($r^2 = 0,310$; $p = 0,033$)

Адаптировано из (Belogurov et al., 2008)

сводилась лишь к попыткам купирования обострений заболевания и проведению симптоматического лечения, то к настоящему времени появились пути воздействия на течение болезни. Это стало возможным благодаря разработке современных подходов, опирающихся на знание иммунопатогенеза РС, и результатов успешных мультицентровых клинических исследований, организованных по всем правилам современной медицины.

Лечение РС складывается из трех направлений. Первое – лечение обострения или резкого прогрессирования заболевания. Второе – симптоматическая терапия, направленная на коррекцию неврологических симптомов, т.е. проявления стойкого нарушения функций. Третье направление – предупреждение проявлений заболевания, обострений и прогрессирования неврологического дефицита. Это направление активно внедряется в практическую неврологию только последние 10 лет и позволяет существенно снизить активность патологического процесса, в первую очередь аутоиммунного воспаления и демиелинизации. Поэтому препараты этой группы получили название «препараты, изменяющие течение РС» (ПИТРС, англоязычный вариант Disease Modifying Treatment – DMT). Однако на сегодняшний день еще не разработан препарат, который способен полностью остановить развитие заболевания. Имеющиеся в распоряжении врачей препараты могут лишь снизить частоту и тяжесть обострений, а также замедлить темпы накопления неврологического дефицита, что подтверждается данными магнитно-резонансной

томографии (МРТ) головного и спинного мозга (Jacobs et al., 1996; Johnson et al., 1998; PRISMS..., 1998; The IFNB..., 1993). К ПИТРС, разрешенным к применению, относят иммуномодулирующие препараты интерферон- β (ИФНб) и глатирамера ацетат (ГА, или Копаксон), а также иммуносупрессор митоксантрон (Гусев, 2004; Гусев, Бойко, 2007; Freedman et al., 2008). Первые два препарата являются наиболее активно используемыми при ремиттирующем РС.

7.1. Препараты β -интерферона (ИФНб)

Препараты ИФНб представляют собой рекомбинантные бета-интерфероны человека, вырабатываемые штаммом *E. coli* (ИФНб-1b) или культурой клеток млекопитающих (ИФНб-1a). ИФНб-1b – **негликозилированный белок, который отличается по аминокислотной последовательности от природного ИФНб человека отсутствием N-концевого метионина и заменой остатка серина в 17-м положении на цистеин (Buttmann, Rieckmann, 2007). ИФНб-1b (Бетаферон) стал первым препаратом ИФНб, одобренным для лечения РС в 1993 г. Препараты ИФНб-1a (Ребиф и Авонекс) были разрешены позднее, эти препараты идентичны природному ИФНб человека по последовательности аминокислот и, как и последний, гликозилированы (Wagstaff, Goa, 1998).**

Терапевтический эффект этих препаратов на активность РС при ремиттирующем и вторично-прогрессирующем (с обострениями) течении был показан в нескольких мультицентровых рандомизированных клинических испытаниях с использованием двойного слепого метода и мониторинга МРТ. Эти препараты снижают частоту и тяжесть обострений, задерживают прогрессирование нетрудоспособности и возникновение новых очагов (по данным МРТ головного мозга). Их применение приводит к сокращению числа госпитализаций и проводимых курсов гормональной терапии (Бойко и др., 2007; Panitch et al., 2004; Завалишин и др., 2006; Kappos et al., 2006b; Kinkel et al., 2006; Гусев, Бойко, 2007). Также показана возможность эффективно использовать эти препараты не только во время ремиттирующего течения РС, но и на ранних стадиях РС (Kappos et al., 2006a).

Изучение механизма действия ИФНб на животных с ЭАЭ (модель РС – см. выше) и при лечении пациентов с РС показало, что его связывание со специфическим рецептором инициирует ряд антипролиферативных и иммуномодулирующих реакций, которые вызывают изменение экспрессии на поверхности клеток антигенов главного комплекса гистосовместимости (ГКГ) и костимулирующих молекул. Это, в свою очередь, может приводить к ингибированию активации CD4+ Т-лимфоцитов, а также к изменению в балансе цитокинов в сторону уменьшения продукции провоспалительных (Th1) и увеличения продукции противовоспалительных (Th2) цитокинов (Kovarik et al., 2007). **Показано также, что ИФНб блокирует резистентность Т-лимфоцитов к апоптотическим сигналам (Billiau et al., 2004).** В исследованиях *in vitro* установлено, что ИФНб ингибирует экспрессию молекул адгезии (Jensen et al., 2005) и матриксных металлопротеиназ (ММП) (Stuve et al., 1997), но увеличивает уровень ингибитора ММП – ТИМР-1 (Waubant et al., 2001) и, как следствие, Т-клеточную миг-

рацию. Эти наблюдения могут объяснить роль ИФНб в уменьшении проницаемости гемато-энцефалического барьера (ГЭБ), определяемой с помощью МРТ с усилением парамагнитным контрастом (гадолинием).

7.2. Глатирамера ацетат (Копаксон)

Глатирамера ацетат (ГА) изначально создавался в конце 1960-х годов группой израильских ученых как синтетический аналог ОБМ – белка, наиболее представленного в миелиновой оболочке аксонов, – для изучения молекулярных механизмов развития ЭАЭ. В качестве потенциальных энцефалитогенных пептидов было синтезировано 11 различных кополимеров, имеющих разную степень гомологии по аминокислотному составу с ОБМ. Однако оказалось, что ни один из них не вызывает развития ЭАЭ, а некоторые, напротив, предупреждают его развитие или уменьшают клинические проявления у животных с уже развившимся ЭАЭ. Наиболее эффективным оказался кополимер-1 с молекулярной массой от 4,7 до 11 кДа, который представляет собой смесь синтетических полипептидов в виде уксуснокислых солей, состоящих из L-изомеров глутаминовой кислоты, лизина, аланина и тирозина (отсюда и название – глатирамера ацетат) в таком же молярном соотношении, как в молекуле ОБМ (Arnon, 1996). Эффективность ГА, выпускаемого под торговым названием Копаксон, была подтверждена как при лечении ЭАЭ у животных, так и в клинических испытаниях, что определило применение ГА в качестве лекарственного препарата при ремиттирующем течении РС (Johnson et al., 1995, 1998).

В основе механизма действия ГА при лечении РС лежит индукция в первую очередь устойчивых ГА-специфичных клонов Т-клеток фенотипа Th2, которые продуцируют цитокины и нейротрофические факторы, благоприятно снижающие активность патологического процесса при РС. Также предполагается конкуренция ГА с ОБМ, основным иммуногенным и энцефалитогенным антигеном миелина, за связывание с молекулами ГКГ на поверхности антиген-презентирующих клеток (АПК), что приводит к ингибированию антиген-презентирования и, как следствие, к подавлению развития миелин-реактивных Th1-клеток (Ziemssen et al., 2002; Гусев, Бойко, 2007; Arnon, Aharoni, 2007).

Следует отметить, однако, что степень влияния ИФНб и ГА на течение РС может варьировать у разных больных, вплоть до устойчивой резистентности (т.е. отсутствия влияния препаратов на течение заболевания) к используемому препарату (Macciardi et al., 2005).

7.3. Митоксантрон

В последние годы все более широкое применение в терапии быстро прогрессирующего РС находят так называемые «цитостатики второго поколения» – синтетические препараты, которые обладают узконаправленным действием на иммунокомпетентные клетки. Эти препараты имеют меньше побочных эффектов по сравнению

с цитостатиками первого поколения и лучше переносятся большими. Наиболее применяемым из них является митоксантрон (Гусев, 2002; Voiko et al., 1999).

Митоксантрон является синтетическим производным антрацендиона. Механизм его действия окончательно не выяснен. Показано, что препарат встраивается между основаниями молекулы ДНК, блокируя процессы репликации и транскрипции; кроме того, митоксантрон ингибирует топоизомеразу II. Это, в конечном счете, подавляет пролиферацию Т-, В-лимфоцитов и макрофагов. Обнаружено, что митоксантрон обладает также некоторыми иммуномодулирующими свойствами: он нарушает презентацию антигенов энцефалитогенным Т-лимфоцитам, уменьшает секрецию провоспалительных цитокинов. Кроме того, он ингибирует продукцию антител и опосредованную макрофагами деградацию миелина (Fox, 2004; Angelucci et al., 2006). Митоксантрон также индуцирует апоптоз лимфоцитов, моноцитов и дендритных клеток (Neuhaus et al., 2005), **может ингибировать миграцию воспалительных клеток в ЦНС** (Kopadze et al., 2006). Все это подавляет патологический процесс при РС. Длительность использования препарата ограничивается потенциальным кардиотоксическим действием, в качестве побочных эффектов возможно угнетение кроветворения (лейкопения, тромбоцитопения, реже – эритроцитопения) и гастроинтестинальные нарушения.

По данным клинических испытаний, митоксантрон замедляет прогрессирование заболевания при вторично прогрессирующем РС, а также при агрессивном течении ремиттирующего РС (Scott, Figgitt, 2004). Препарат, обладая умеренной эффективностью, замедляет прогрессирование заболевания и снижает частоту обострений у пациентов с различными типами течения РС (за исключением первично прогрессирующего РС) в рамках коротких (два года) исследований (Edan et al., 1997; Hartung et al., 2002). Митоксантрон при ремиттирующем РС относят ко второй линии препаратов, используемых только в случае неэффективности препаратов ИФНб и ГА.

7.4. Препараты моноклональных антител

Эта группа высокоспецифичных иммуномодуляторов состоит из химерных (человек/мышь) или гуманизированных антител, направленных против определенных молекул, участвующих в патогенезе заболевания.

Первый препарат из этой группы – Натализумаб (Тизабри®) – относится к новому классу лекарственных средств, получивших название «селективные ингибиторы молекул адгезии» и представляет собой рекомбинантные гуманизированные моноклональные антитела к субъединице α -4 молекулы интегрина (Elices, 2003). Препарат блокирует α 4 β 1-интегрины (VLA (very late antigen)-4), экспрессирующиеся на поверхности активированных лимфоцитов и некоторых фагоцитов, что предотвращает адгезию лимфоцитов к стенкам сосудистого эпителия. Это приводит к прекращению миграции аутореактивных лимфоцитов через ГЭБ и в воспаленные ткани (Hutchinson, 2007; Johnson, 2007). Эффективность этого препарата при РС оказалась выше, чем эффективность ИФНб (Buttmann, Rieckmann, 2008;

Polman et al., 2006), однако его внедрение было приостановлено в 2005 г. после сообщения о трех случаях тяжелого заболевания (два из которых имели летальный исход) у больных, получавших Натализумаб в комплексной терапии с Авонексом (Kleinschmidt-DeMasters, Tyler, 2005; Langer-Gould, Steinman, 2006). Это сопутствующее заболевание – прогрессирующая мультифокальная энцефалопатия – развилось из-за активации вирусной инфекции (нейротропный JC вирус из семейства Polyomaviridae). На сегодняшний день Натализумаб рекомендован для лечения пациентов с РС только при неэффективности других иммуномодулирующих препаратов (терапия второй линии) и при соблюдении необходимых мер предосторожности, в частности, серологического контроля возможности активации JC-вируса (Karpos et al., 2007). В России он пока не разрешен к использованию.

Помимо Натализумаба в настоящее время позитивные результаты при лечении РС в исследованиях фазы II показали еще три препарата моноклональных антител: Алемтузумаб, Ритуксимаб и Даклизумаб (Bielekova et al., 2004; Chofflon, 2005; Cree, 2006; Buttmann, Rieckmann, 2008; Rose et al., 2008; Chaudhuri, Behan, 2008).

Анти-CD52-антитела (Campath®, или Алемтузумаб) – гуманизированные моноклональные антитела к поверхностному рецептору, экспрессированному на тимоцитах, Т- и В-лимфоцитах (но не на плазматических клетках), моноцитах. Алемтузумаб стимулирует цитопатическое повреждение лимфоцитов, в первую очередь Т-клеток.

Анти-CD20-антитела (Rituxan®, или Ритуксимаб) – химерные моноклональные антитела, имеющие вариабельные районы мыши и константные – человека, специфически связываются с антигеном CD20 на поверхности В-лимфоцитов и инициируют иммунологические реакции, опосредующие лизис В-клеток.

Анти-CD25-антитела (Zenarax®, или Даклизумаб) – гуманизированные моноклональные антитела к α -субъединице рецептора интерлейкина-2 (ИЛ-2), одного из основных активационных цитокинов. Даклизумаб с высокой специфичностью связывается с α -субъединицей высокоаффинного рецепторного комплекса ИЛ-2 (который экспрессируется на активированных Т-клетках), подавляет связывание и биологическую активность ИЛ-2, в том числе опосредованную ИЛ-2 активацию лимфоцитов.

В клинических исследованиях фазы II при ремиттирующем РС введение этих препаратов достоверно снижало количество активных очагов на МР-томограммах и частоту обострений РС по сравнению с ИФНб (для Алемтузумаба) или по сравнению с плацебо (для Ритуксимаба и Даклизумаба).

7.5. Препараты, находящиеся на стадии клинических испытаний при РС

Клинические исследования новых методов патогенетического лечения РС проходят по ряду направлений: во-первых, это разработка препаратов более сильных, чем ИФНб, ГА и митосантрон, при хорошей переносимости (в основном моноклональные антитела); во вторых, разработка препаратов, более удобных в использовании (как правило иммуносупрессоров и противовоспалительных лекарственных

средств в таблетированной форме), при хорошей переносимости. Среди таблетированных препаратов, успешно проходящих клинические исследования II или III фазы, можно отметить Кладрибин (**Mylinax®**) – иммуносупрессор, аналог пуринового нуклеозида, действие которого направлено против определенных популяций лимфоцитов; Финголимод (**Fingolimod (FTY720)**) – представитель нового класса иммуномодуляторов – агонист рецептора сфингозин-1-фосфата (**S1P**) – **ингибирует** выход лимфоцитов из вторичных лимфоидных тканей и тимуса в кровь, также супрессирует активность фосфоорилазы A2 (сPLA2), необходимой для синтеза медиаторов воспаления; Терифлуномид (**Teriflunomide**) – иммуномодулирующий препарат – ингибирует фермент дигидрооротат-дегидрогеназу и оказывает антипролиферативное действие; Лаквинимод (**Laquinimod**) – иммуномодулирующий препарат, подавляющий воспаление, демиелинизацию и повреждение аксонов при ЭАЭ, что может свидетельствовать о противовоспалительных и нейропротективных свойствах препарата; BG-12 (**Panaclar, BG-00012, FAG-201**) – производное фумаровой кислоты, имеет цитопротективное и противовоспалительное действие (Lietal., 2004; O'Connor et al., 2006, 2009; Polman et al., 2005a; Leist, Vermersch, 2007; Wakke, Thio, 2007). И, наконец, важным направлением является разработка более эффективных и имеющих меньше побочных реакций лекарственных форм известных препаратов, форм или их комбинации.

Особое место занимает новый препарат MBP8298, представляющий собой синтетический пептид, состоящий из 17 аминокислот, идентичных участку 82-98 ОБМ человека. В одном клиническом исследовании II фазы при ремиттирующем и двух исследованиях III фазы при вторично прогрессирующем РС было выявлено достоверное удлинение периода ремиссии у больных, несущих гаплотипы HLA-DR2 или DR4 (Warren et al., 2006).

Таким образом, в патогенетическом лечении РС ПИТРС являются «препаратами первого выбора», пока не доказаны преимущества других методов лечения, но исследования активно продолжаются. Основная проблема современного этапа изучения РС – лечение нарастающего нейродегенеративного процесса. Это связано с тем, что только часть предполагаемых механизмов нейродегенерации при РС может быть напрямую связана с воспалением и аутоиммунными реакциями. Поэтому одно из перспективных современных направлений в разработке новых методов лечения этого заболевания связано с нейропротекцией – замедлением или, в оптимальном варианте, остановкой прогрессирования заболевания путем предотвращения дегенерации нервных клеток и аксонов или их восстановления. В связи с этим активно изучается антиапоптозный и иммуномодулирующий эффект нейротрофических факторов и стимуляторов их продукции, которые, возможно, в скором времени также станут объектом клинических испытаний при РС.

Литература

Алексеевков А.Д., Судомоина М.А., Бойко А.Н. и др. Анализ двух участков биаллельного полиморфизма в локусе фактора некроза опухолей у больных рассеянным склерозом из русской популяции:

- связь с ПДРФ NcoI в первом интроне гена лимфотоксина α // Молекуляр. биология. 1999. Т. 33. С. 190-196.
- Андреевский Т.В., Судомоина М.А., Бойко А.Н., Фаворова О.О.* Генетика рассеянного склероза // Рассеянный склероз и другие демиелинизирующие заболевания. Ред. Е.И. Гусев, И.А. Завалишин, А.Н. Бойко. М.: Миклош, 2004. С. 43-45.
- Бачева А.В., Белогуров А.А., Пономаренко Н.А. и др.* Анализ фрагментации основного белка миелина под действием протеасомы // Acta Naturae. 2009. №1. С. 86-89.
- Бачева А.В., Белогуров А.А., Кузина Е.С. и др.* Функциональная деградация основного белка миелина. Протеомный подход // Биоорганическая химия. 2011. №1. 39-47.
- Белогуров А.А., Пономаренко Н.А., Говорун В.М., Габитов А.Г., Бачева А.В.* Сайт-специфическая деградация основного белка миелина протеасомой // Докл. РАН. 2009. Т. 425. № 2. С. 251-255.
- Бойко А.Н., Давыдовская М.В., Демина Т.Л. и др.* Опыт длительного использования Бетаферона и Копаксона в повседневной практике неврологов – результаты 5-летнего лечения больных рассеянным склерозом в Московском городском центре рассеянного склероза // Журнал неврол. психиатр. Спец. выпуск: Рассеянный склероз. 2007. № 4. С. 84-94.
- Гусев Е.И.* Современные диагностические критерии рассеянного склероза // Рассеянный склероз и другие демиелинизирующие заболевания. Ред. Е.И. Гусев, И.А. Завалишин, А.Н. Бойко. М.: Миклош, 2004. С. 252-261.
- Гусев Е.И., Бойко А.Н.* Демиелинизирующие заболевания центральной нервной системы // Consilium medicum. 2000. Т. 2. № 2. С. 84-86.
- Гусев Е.И., Бойко А.Н.* Рассеянный склероз: от изучения иммунопатогенеза к новым методам лечения. М.: Губернская медицина, 2001. 128 с.
- Гусев Е.И., Бойко А.Н.* Рассеянный склероз: достижения десятилетия // Журнал неврол. психиатр. Спец. выпуск: Рассеянный склероз. 2007. № 4. С. 4-13.
- Гусев Е.И., Бойко А.Н., Сланова А.В., Нестерова В.А.* Новые данные о механизмах действия копаксона при рассеянном склерозе: у ряда больных отмечено существенное усиление продукции нейротрофического фактора BDNF // Материалы XI Всеросс. науч. конф. «Нейроиммунология». СПб., 2002. С. 78-79.
- Гусев Е.И., Бойко А.Н., Завалишин И.А., Быкова О.В.* Современная эпидемиология рассеянного склероза // Рассеянный склероз и другие демиелинизирующие заболевания. Ред. Е.И. Гусев, И.А. Завалишин, А.Н. Бойко. М.: Миклош, 2004а. С. 8-29.
- Гусев Е.И., Бойко А.Н., Силюянова В.А. и др.* Варианты течения и прогноз при рассеянном склерозе // Рассеянный склероз и другие демиелинизирующие заболевания. Ред. Е.И. Гусев, И.А. Завалишин, А.Н. Бойко. М.: Миклош, 2004б. С. 158-180.
- Докучаева Н.Н., Бойко А.Н.* Клинико-эпидемиологическое исследование рассеянного склероза в Волгограде // Журнал неврол. психиатр. Спец. выпуск: Рассеянный склероз. 2006. № 3. С. 4-10.
- Завалишин И.А., Захарова М.Н.* Рассеянный склероз: основные аспекты патогенеза // Рассеянный склероз и другие демиелинизирующие заболевания. Ред. Е.И. Гусев, И.А. Завалишин, А.Н. Бойко. М.: Миклош, 2004. С. 60-75.
- Завалишин И.А., Переседова А.В., Стойда Н.И. и др.* Сравнительный анализ эффективности рифа-22 мкг и копаксона при рассеянном склерозе // Журнал неврол. и псих. Спец. выпуск: Рассеянный склероз. 2006. №3. С. 111-115.
- Заргарова Т.А., Фаворова О.О.* Экспериментальный аллергический энцефаломиелит – модель рассеянного склероза // Иммунология. 1999. № 2. С. 5-8.
- Кондратьева О.С., Исмаилов М.Ф., Матвеева Т.В., Саитгалеев И.З.* К эпидемиологии рассеянного склероза на территории Республики Татарстан // Неврологический вестник. 2002. № 3-4. С. 4-12.
- Кузина Е.С., Черноловская Е.Л., Кудряева А.А. и др.* Ускорение внутриклеточного протеолиза основного белка миелина иммунопротеасомой // Докл. РАН. 2013. Вып. 453. № 4. С. 446-449.
- Спирин Н.Н., Качура Д.А., Качура А.Н., Бойко А.Н.* Влияние экологических факторов на заболеваемость и распространенность рассеянного склероза // Журнал неврол. психиатр. Спец. выпуск: Рассеянный склероз. 2003. № 2. С. 111-113.
- Судомоина М.А., Фаворова О.О.* Поиск генов предрасположенности к рассеянному склерозу // Молекуляр. биология. 2000. Т. 34. С. 654-670.

- Чехонин В.П., Гурина О.И. и др. Основной белок миелина. Структура, свойства, функции, роль в диагностике демиелинизирующих заболеваний // Вопросы медицинской химии. 2000. Вып. 6. С. 10-27.
- Abdeen H., Heggarty S., Hawkins S.A. et al. Mapping candidate non-MHC susceptibility regions to multiple sclerosis // *Genes Immun.* 2006. Vol. 7. P. 494-502.
- Acosta-Rodriguez E.V., Napolitani G., Lanzavecchia A., Sallusto F. Interleukins 1beta and 6 but not transforming growth factor-beta are essential for the differentiation of interleukin 17-producing human T helper cells // *Nat. Immunol.* 2007. Vol. 8. P. 942-949.
- Afzali B., Lombardi G., Lechler R.I., Lord G.M. The role of T helper 17 (Th17) and regulatory T cells (Treg) in human organ transplantation and autoimmune disease // *Clin. Exp. Immunol.* 2007. Vol. 148. P. 32-46.
- Alam R., Gorska M. Lymphocytes // *J. Allergy Clin. Immunol.* 2003. Vol. 11. P. S476-485.
- Alizadeh M., Babron M.C., Birebent B. et al. Genetic interaction of CTLA-4 with HLA-DR15 in multiple sclerosis patients // *Ann. Neurol.* 2003. Vol. 54. P. 119-122.
- Allen I.V., McQuaid S., Mirakhur M., Nevin G. Pathological abnormalities in the normal-appearing white matter in multiple sclerosis // *Neurol. Sci.* 2001. Vol. 22. P.141-144.
- Amato M.P. Pharmacoeconomic considerations of multiple sclerosis therapy with the new disease-modifying agents // *Exp. Opin. Pharmacother.* 2004. Vol. 5. P. 2115-2126.
- Amirzargar A., Khosravi F., Dianat S. et al. Profile of cytokine gene polymorphisms in Iranian multiple sclerosis patients // *Mult. Scler.* 2007. Vol. 13. P. 253-255.
- Amur S.G., Shanker G. et al. Regulation of myelin basic protein (arginine) methyltransferase by thyroid hormone in myelinogenic cultures of cells dissociated from embryonic mouse brain // *J. Neurochem.* 1984. Vol. 43. P. 494-8.
- Angelucci F., Batocchi A.P., Caggiula M. et al. In vivo effects of mitoxantrone on the production of pro- and anti-inflammatory cytokines by peripheral blood mononuclear cells of secondary progressive multiple sclerosis patients // *Neuroimmunomodulation.* 2006. Vol. 13. P. 76-81.
- Antel J. Oligodendrocyte susceptibility to immune-mediated injury // *Multiple sclerosis. Tissue Destruction and Repair.* Eds. L. Kappos, J. Kesselring, E.W. Radu, K. Johnson, Dunitz M. 2001. P. 11-24.
- Antel J. P., Bar-Or A. Do myelin-directed antibodies predict multiple sclerosis? // *N. Engl. J. Med.* 2003. Vol. 349. P. 107-9.
- Aranami T., Yamamura T. Th17 Cells and Autoimmune Encephalomyelitis (EAE/MS) // *Allergol. Int.* 2008. Vol. 57. P.115-120.
- Arnon R. The development of Cop 1 (Copaxone), an innovative drug for the treatment of multiple sclerosis: personal reflections // *Immunol. Lett.* 1996. Vol. 50. P. 1-15.
- Arnon R., Aharoni R. Neurogenesis and neuroprotection in the CNS - fundamental elements in the effect of Glatiramer acetate on treatment of autoimmune neurological disorders // *Mol. Neurobiol.* 2007. Vol. 36. P. 245-253.
- Babbe H., Roers A., Waisman A. et al. Clonal expansions of CD8(+) T cells dominate the T cell infiltrate in active multiple sclerosis lesions as shown by micromanipulation and single cell polymerase chain reaction // *J. Exp. Med.* 2000. Vol. 192. P. 393-404.
- Ballerini C., Rosati E., Salvetti M. et al. Protein tyrosine phosphatase receptor-type C exon 4 gene mutation distribution in an Italian multiple sclerosis population // *Neurosci. Lett.* 2002. Vol. 328. P. 325-327.
- Baranzini S.E., Jeong M.C. et al. B cell repertoire diversity and clonal expansion in multiple sclerosis brain lesions // *J. Immunol.* 1999. Vol. 163. P. 5133-44.
- Barcellos L.F., Thomson G., Carrington M. et al. Chromosome 19 single-locus and multilocus haplotype associations with multiple sclerosis. Evidence of a new susceptibility locus in Caucasian and Chinese patients // *JAMA.* 1997. Vol. 278. P. 1282-1283.
- Barkhof F., Filippi M., Miller D.H. et al. Comparison of MR imaging criteria at first presentation to predict conversion to clinically definite multiple sclerosis // *Brain.* 1997. Vol. 120. P. 2059-2069.
- Beall S.S., Concannon P., Charmley P. et al. The germline repertoire of T cell receptor beta-chain genes in patients with chronic progressive multiple sclerosis // *J. Neuroimmunol.* 1989. Vol. 21. P. 59-66.
- Beall S.S., Biddison W.E., McFarlin D.E. et al. Susceptibility for multiple sclerosis is determined, in part, by inheritance of a 175-kb region of the TcR V beta chain locus and HLA class II genes // *J. Neuroimmunol.* 1993. Vol. 45. P. 53-60.

- Becher B., Durell B.G., Noelle R.J. Experimental autoimmune encephalitis and inflammation in the absence of interleukin-12 // *Clin. Invest.* 2002. Vol. 110. P. 493-497.
- Bechtold D.A., Smith K.J. Sodium-mediated axonal degeneration in inflammatory demyelinating disease // *J. Neurol. Sci.* 2005. Vol. 233. P. 27-35.
- Belogurov A.A. Jr., Kurkova I.N. et al. Recognition and degradation of myelin basic protein peptides by serum autoantibodies: novel biomarker for multiple sclerosis // *J. Immunol.* 2008. Vol. 180. P. 1258-1267.
- Belogurov A. Jr., Kozyr A., Ponomarenko N., Gabibov A. Catalytic antibodies: balancing between Dr. Jekyll and Mr. Hyde // *Bioessays.* 2009a. Vol. 31. № 11. P. 1161-1171.
- Belogurov A. Jr., Zargarova T.A., Turobov V.I. et al. Suppression of ongoing experimental allergic encephalomyelitis in DA rats by novel peptide drug, structural part of human myelin basic protein 46-62 // *Autoimmunity.* 2009b. Vol. 42. № 4. P. 362-364.
- Belogurov A. Jr., Smirnov I., Ponomarenko N., Gabibov A. Antibody-antigen pair probed by combinatorial approach and rational design: bringing together structural insights, directed evolution, and novel functionality // *FEBS Lett.* 2012. Vol. 586. № 18. P. 2966-2973.
- Belogurov A.A. Jr., Stepanov A.V., Smirnov I.V. et al. Liposome-encapsulated peptides protect against experimental allergic encephalitis // *FASEB J.* 2013. Vol. 27. № 1. P. 222-231.
- Belogurov A. Jr., Kudriaeva A., Kuzina E. et al. Multiple sclerosis autoantigen mMyelin basic protein escapes control by ubiquitination during proteasomal degradation // *J. Biol. Chem.* 2014. Vol. 289. № 25. P. 17758-17766.
- Beniac D. R., Wood D.D. et al. Cryoelectron microscopy of protein-lipid complexes of human myelin basic protein charge isomers differing in degree of citrullination // *J. Struct. Biol.* 2000. Vol. 129. P. 80-95.
- Berger T., P. Rubner, et al. Antimyelin antibodies as a predictor of clinically definite multiple sclerosis after a first demyelinating event // *N. Engl. J. Med.* 2003. Vol. 349. P. 139-45.
- Bergers E., Bot J.C.J., De Groot C.J.A. et al. Axonal damage in the spinal cord of MS patients occurs largely independent on T2 MRI // *Neurology.* 2002. Vol. 59. P. 1766-1771.
- Bettelli E., Carrier Y., Gao W. et al. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells // *Nature.* 2006. Vol. 441. P. 235-238.
- Bielekova B., Richert N., Howard T. et al. Humanized anti-CD25 (daclizumab) inhibits disease activity in multiple sclerosis patients failing to respond to interferon beta // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2004. Vol. 101. P. 8705-8708.
- Billiau A., Kieseier B., Hartung H-P. Biologic role of interferon beta in multiple sclerosis // *J. Neurol.* 2004. Vol. 251. Suppl. 2. P. 10-14.
- Bischof F., Bins A. et al. A structurally available encephalitogenic epitope of myelin oligodendrocyte glycoprotein specifically induces a diversified pathogenic autoimmune response // *J. Immunol.* 2004. Vol. 173. P. 600-606.
- Bjartmar C., Wujek J.R., Trapp B.D. Axonal loss in the pathology of MS: consequences for understanding the progressive phase of the disease // *Neurol. Science.* 2003. Vol. 206. P. 165-171.
- Boiko A.N., Kesselring J., Paty D.W. et al. Multiple sclerosis and public health. Educational and management implications // *Neuroscience and Neurological Disorders. World Health Organization, Department of Mental Health,* 1999. Vol. 2. P. 1-11.
- Boiko A.N., Guseva M.E., Guseva M.R. et al. Clinico-immunogenetic characteristics of multiple sclerosis with optic neuritis in children // *J. Neurovirol.* 2000. Suppl. 2. P. S152-155.
- Bomprezzi R., Kovanen P.E., Martin R. New approaches to investigating heterogeneity in complex traits // *J. Med. Genet.* 2003 Vol. 40. P. 553-559.
- Booth D.R., Arthur A.T., Teutsch S.M. et al. The Southern MS Genetics Consortium. Gene expression and genotyping studies implicate the interleukin 7 receptor in the pathogenesis of primary progressive multiple sclerosis // *J. Mol. Med.* 2005. Vol. 83. P. 822-830.
- Boven L.A., Montagne L., Nottet H.S., DeGroot C.J. Macrophage inflammatory protein-1a (MIP-1a), MIP-1 and RANTES mRNA semiquantification and protein expression in active demyelinating multiple sclerosis (MS) lesions // *Clin. Exp. Immunol.* 2000. Vol. 122. P. 257-263.
- Brassat D., Motsinger A.A., Caillier S.J. et al. Multifactor dimensionality reduction reveals gene-gene interactions associated with multiple sclerosis susceptibility in African Americans // *Genes Immun.* 2006. Vol. 7. P. 310-315.

- Brisebois M., Zehntner S.P., Estrada J. et al.* A pathogenic role for CD8+ T cells in a spontaneous model of demyelinating disease // *J. Immunol.* 2006. Vol. 177. P. 2403–2411.
- Bruck W.* The pathology of multiple sclerosis is the result of focal inflammatory demyelination with axonal damage // *J. Neurol.* 2005. Vol. 252. Suppl. 5. P. v3-9.
- Buhler M.M., Bennetts B.H., Heard R.N., Stewart G.J.* T cell receptor beta chain genotyping in Australian relapsing-remitting multiple sclerosis patients // *Mult. Scler.* 2000. Vol. 6. P. 140-147.
- Buttmann M., Rieckmann P.* Interferon-beta1b in multiple sclerosis // *Expert. Rev. Neurother.* 2007. Vol. 7. P. 227-239.
- Buttmann M., Rieckmann P.* Treating multiple sclerosis with monoclonal antibodies // *Expert. Rev. Neurother.* 2008. Vol. 8. P. 433-455.
- Carlson N.G., Rose J.W.* Antioxidants in multiple sclerosis: do they have a role in therapy? // *CNS Drugs.* 2006. Vol. 20. P. 433-441.
- Chaudhuri A., Behan P.O.* Rituximab in relapsing-remitting multiple sclerosis // *N. Engl. J. Med.* 2008. Vol. 358. P. 2646.
- Chiocchetti A., Comi C., Indelicato M. et al.* Osteopontin gene haplotypes correlate with multiple sclerosis development and progression // *J. Neuroimmunol.* 2005. Vol. 163. P.172-178.
- Chofflon M.* Mechanisms of action for treatments in multiple sclerosis. Does a heterogeneous disease demand a multi-targeted therapeutic approach? // *Biodrugs.* 2005. Vol. 19. P. 299-308.
- Colombo M., Dono M. et al.* Accumulation of clonally related B lymphocytes in the cerebrospinal fluid of multiple sclerosis patients // *J. Immunol.* 2000. Vol. 164. P. 2782-9.
- Compston D.A.S., Sadovnick A.D.* Epidemiology and genetics of multiple sclerosis // *Curr. Opin. Neurol. Neurosurg.* 1992. Vol. 5. P. 175-181.
- Cournu-Rebeix I., Génin E., Lesca G. et al.* Intercellular adhesion molecule-1: a protective haplotype against multiple sclerosis // *Genes Immun.* 2003. Vol. 4. P. 518-523.
- Crawford M.P., Yan S.X., Ortega S.B. et al.* High prevalence of autoreactive, neuroantigen-specific CD8+ T cells in multiple sclerosis revealed by novel flow cytometric assay // *Blood.* 2004. Vol. 103. P. 4222-4231.
- Cree B.* Emerging monoclonal antibody therapies for multiple sclerosis // *Neurologist.* 2006. Vol. 12. P. 171-178.
- Cua D.J., Sherlock J., Chen Y. et al.* Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain // *Nature.* Vol. 421. P. 744-748.
- Cunningham S., Patterson C.C., McDonnell G. et al.* Haplotype analysis of the preprotachykinin-1 (TAC1) gene in multiple sclerosis // *Genes Immun.* 2005. Vol. 6. P. 265-270.
- Dai K.Z., Harbo H.F., Celius E.G. et al.* The T cell regulator gene SH2D2A contributes to the genetic susceptibility of multiple sclerosis // *Genes Immun.* 2001. Vol. 2. № 5. P. 263-268.
- D'Alfonso S., Bolognesi E., Guerini F.R. et al.* A sequence variation in the MOG gene is involved in multiple sclerosis susceptibility in Italy // *Genes Immun.* 2008. Vol. 9. P. 7-15.
- De Jong B.A., Huizinga T.W., Zanelli E. et al.* Evidence for additional genetic risk indicators of relapse-onset MS within the HLA region // *Neurology.* 2002. Vol. 59. P. 549-555.
- De la Concha E.G., Arroyo R., Crusius J.B. et al.* Combined effect of HLA-DRB1*1501 and interleukin-1 receptor antagonist gene allele 2 in susceptibility to relapsing/remitting multiple sclerosis // *J. Neuroimmunol.* 1997. Vol. 80. P. 172-178.
- Dincić E., Živković M., Stanković A. et al.* Association of polymorphisms in CTLA-4, IL-1ra and IL-1beta genes with multiple sclerosis in Serbian population // *J. Neuroimmunol.* 2006. Vol. 177. P. 146-50.
- Dore-Duffy P., Washington R., Dragovic L.* Expression of endothelial cell activation antigens in microvessels from patients with multiple sclerosis // *Adv. Exp. Med. Biol.* 1993. Vol. 331. P. 243-248.
- D'Souza C.A., Moscarello M.A.* Differences in susceptibility of MBP charge isomers to digestion by stromelysin-1 (MMP-3) and release of an immunodominant epitope // *Neurochem. Res.* 2006. Vol. 31. P. 1045-1054.
- D'Souza C.A., Wood D.D. et al.* Autocatalytic cleavage of myelin basic protein: an alternative to molecular mimicry // *Biochemistry.* 2005. Vol. 44. P. 12905-13.
- Dyment D.A., Ebers G.C., Sadovnick A.D.* Genetics of multiple sclerosis // *Lancet Neurol.* 2004. Vol. 3. P. 104-110.

- Dyment D.A., Yee I.M., Ebers G.C., Sadovnick A.D.* Canadian Collaborative Study Group. Multiple sclerosis in stepsiblings: recurrence risk and ascertainment // *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*. 2006. Vol. 77. P. 258-259.
- Ebers G.* Prognostic factors for multiple sclerosis: the importance of natural history studies // *J. Neurol.* 2005. Suppl. 252. P. 15-20.
- Edan G., Miller D., Clarnet M. et al.* Therapeutic effect of mitoxantrone combined with methylprednisolone in multiple sclerosis: a randomized multicentre study of active disease using MRI and clinical criteria // *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*. 1997. Vol. 62. P. 112-118.
- Egg, R., Reindl M. et al.* Anti-MOG and anti-MBP antibody subclasses in multiple sclerosis // *Mult. Scler.* 2001. Vol. 7. P. 285-9.
- Elices M.J.* Natalizumab // *Curr. Opin. Investig. Drugs*. 2003. Vol. 4. P. 1354-1362.
- Epplen C., Buitkamp J., Rumpf H. et al.* Immunoprinting reveals different genetic bases for (auto)immuno diseases // *Electrophoresis*. 1995. Vol. 16. P. 1693-1697.
- Epplen C., Jäckel S., Santos E.J. et al.* Genetic predisposition to multiple sclerosis as revealed by immunoprinting // *Neurol.* 1997. Vol. 41. P. 341-352.
- Farral M.* Mapping genetic susceptibility to multiple sclerosis // *Lancet*. 1996. Vol. 348. P. 1674-1675.
- Favorov A.V., Andreevski T.V., Sudomoina M.A. et al.* A Markov chain Monte Carlo technique for identification of combinations of allelic variants underlying complex diseases in humans // *Genetics*. 2005. Vol. 171. P. 2113-2121.
- Favorova O.O., Andreevski T.V., Boiko A.N. et al.* The chemokine receptor CCR5 deletion mutation is associated with MS in HLA-DR4-positive Russians // *Neurology*. 2002. Vol. 59. P. 1652-1655.
- Favorova O.O., Favorov A.V., Boiko A.N. et al.* Three allele combinations associated with multiple sclerosis // *BMC Med. Genet.* 2006. Vol. 7. P. 63-70.
- Fernald G.H., Yeh R.F., Hauser S.L. et al.* Mapping gene activity in complex disorders: integration of expression and genomic scans for multiple sclerosis // *J. Neuroimmunol.* 2005. Vol. 167. P. 157-169.
- Fernandes Filho J.A., Vedeler C.A., Myhr K.M. et al.* TNF-alpha and -beta gene polymorphisms in multiple sclerosis: a highly significant role for determinants in the first intron of the TNF-beta gene // *Autoimmunity*. 2002. Vol. 35. P. 377-380.
- Fernandez-Arquero M., Arroyo R., Rubio A. et al.* Primary association of a TNF gene polymorphism with susceptibility to multiple sclerosis // *Neurol.* 1999. Vol. 53. P. 1361-1363.
- Fisher E., Rudick R.A., Simon J.H. et al.* Eight-year follow-up study of brain atrophy in patients with MS // *Neurology*. 2002. Vol. 59. P. 1412-1420.
- Fox E.J.* Mechanism of action of mitoxantrone // *Neurology*. 2004. Vol. 63. Suppl. 6. P. S15-S18.
- Freedman M.S., Hughes B., Mikol D.D. et al.* Efficacy of Disease-Modifying Therapies in Relapsing Remitting Multiple Sclerosis: A Systematic Comparison // *Eur. Neurol.* 2008. Vol. 60. P. 1-11.
- Fukazawa T., Yabe I., Kikuchi S. et al.* Association of vitamin D receptor gene polymorphism with multiple sclerosis in Japanese // *J. Neurol. Sci.* 1999. Vol. 166. P. 47-52.
- Gabibov A.G., Belogurov A.A. Jr, Lomakin Y.A. et al.* Combinatorial antibody library from multiple sclerosis patients reveals antibodies that cross-react with myelin basic protein and EBV antigen // *FASEB J.* 2011 Vol. 25. № 12. P. 4211-21.
- Gade-Andavolu R., Comings D.E., MacMurray J. et al.* RANTES: a genetic risk marker for multiple sclerosis // *Mult. Scler.* 2004. Vol. 10. P. 536-539.
- GAMES, T.M.S.G. Cooperative. A meta-analysis of whole genome linkage screens in multiple sclerosis // *J. Neuroimmunol.* 2003. Vol. 143. P. 39-46.
- Gerritse, K., Deen C. et al.* The involvement of specific anti myelin basic protein antibody-forming cells in multiple sclerosis immunopathology // *J. Neuroimmunol.* 1994. Vol. 49. P. 153-159.
- Gomez-Lira M., Liguori M., Magnani C. et al.* CD45 and multiple sclerosis: the exon 4 C77G polymorphism (additional studies and meta-analysis) and new markers // *J. Neuroimmunol.* 2003. Vol. 140. P. 216-221.
- Goris A., Epplen C., Fiten P. et al.* Analysis of an IFN-gamma gene (IFNG) polymorphism in multiple sclerosis in Europe: effect of population structure on association with disease // *J. Interferon Cytokine Res.* 1999. Vol. 19. P. 1037-1046.
- Green A.J., Barcellos L.F., Rimmler J.B. et al.* Sequence variation in the transforming growth factor-beta1 (TGFB1) gene and multiple sclerosis susceptibility // *J. Neuroimmunol.* 2001. Vol. 116. P. 116-124.

- Gregersen J.W., Kranc K.R., Ke X. et al.* Functional epistasis on a common MHC haplotype associated with multiple sclerosis // *Nature*. 2006. Vol. 443. P. 574–577.
- Gregory S.G., Schmidt S., Seth P. et al.* Multiple Sclerosis Genetics Group. Interleukin 7 receptor alpha chain (IL7R) shows allelic and functional association with multiple sclerosis // *Nat. Genet.* 2007. Vol. 39. P. 1083-1091.
- Guerini F.R., Ferrante P., Losciale L. et al.* Myelin basic protein gene is associated with MS in DR4- and DR5-positive Italians and Russians // *Neurology*. 2003. Vol. 61. P. 520-526.
- Haahr S., Hollsberg P.* Multiple sclerosis is linked to Epstein-Barr virus infections // *Rev. Med. Virol.* 2006. Vol. 16. P. 297-310.
- Hafler, D.A.* Multiple sclerosis // *J. Clin. Invest.* 2004. Vol. 113. P. 788-794.
- Hafler, D.A., Slavik J.M. et al.* Multiple sclerosis // *Immunol. Rev.* 2005. Vol. 204. P. 208-31.
- Haines J.L., Terwedow H.A., Burgess K. et al.* Linkage of the MHC to familial multiple sclerosis suggests genetic heterogeneity // *Hum. Mol. Genet.* 1998. Vol. 7. P. 1229-1234.
- Harbo H.F., Celius E.G., Vartdal F., Spurkland A.* CTLA4 promoter and exon 1 dimorphisms in multiple sclerosis // *Tissue Antigens*. 1999. Vol. 53. P. 106-110.
- Harrington L.E., Mangan P.R., Weaver C.T.* Expanding the effector CD4 T-cell repertoire: the Th17 lineage // *Curr. Opin. Immunol.* 2006. Vol. 18. P. 349-256.
- Hartung H.P., Gonsette R., Konig N. et al.* Mitoxantrone in progressive multiple sclerosis: a placebo-controlled, double-blind, randomized multicentre trial // *Lancet*. 2002. Vol. 360. P. 2018-2025.
- Hebb A.L., Moore C.S., Bhan V. et al.* Expression of the inhibitor of apoptosis protein family in multiple sclerosis reveals a potential immunomodulatory role during autoimmune mediated demyelination // *Mult. Scler.* 2008. Vol. 14. P. 577-594.
- Herrera B.M., Ebers G.C.* Progress in deciphering the genetics of multiple sclerosis // *Curr. Opin. Neurol.* 2003. Vol. 16. P. 253-258.
- Hilton A.A., Slavin A.J., Hilton D.J., Bernard C.C.* Characterization of cDNA and genomic clones encoding human myelin oligodendrocyte glycoprotein // *J. Neurochem.* 1995. Vol. 65. P. 309-318.
- Hogh P., Oturai A., Schreiber K. et al.* Apolipoprotein E and multiple sclerosis: impact of the epsilon-4 allele on susceptibility, clinical type and progression rate // *Mult. Scler.* 2000. Vol. 6. P. 226-230.
- Hohlfeld R.* Neurotrophic cross-talk between the nervous and immune systems: relevance for repair strategies in multiple sclerosis? // *J. Neurol. Sci.* 2008. Vol. 265. P. 93-96.
- Husted C.* Structural insight into the role of myelin basic protein in multiple sclerosis // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2006. Vol. 103. P. 4339-4340.
- Hutchinson M.* Natalizumab: A new treatment for relapsing remitting multiple sclerosis // *Ther. Clin. Risk. Manag.* 2007. Vol. 3. P. 259-268.
- Ibsen S.N., Clausen J.* A repetitive DNA sequence 5' to the human myelin basic protein gene may be linked to MS in Danes // *Acta Neurol. Scand.* 1996. Vol. 93. P. 236-240.
- International Multiple Sclerosis Genetics Consortium. Risk alleles for multiple sclerosis identified by a genome-wide study // *N. Engl. J. Med.* 2007. Vol. 357. P. 851–862.
- Jacobs L.D., Cookfair D.L., Rudick R.A. et al.* Intramuscular interferon beta-1a for disease progression in relapsing multiple sclerosis. The Multiple Sclerosis Collaborative Research Group (MSCRG) // *Ann. Neurol.* 1996. Vol. 39. P. 285-294.
- Jensen J., Krakauer M., Sellebjerg F.* Cytokines and adhesion molecules in multiple sclerosis patients treated with interferon-beta1b // *Cytokine*. 2005. Vol. 7. P. 24-30.
- Ji Q., Gorman J.* Experimental autoimmune encephalomyelitis mediated by CD8+ T cells // *Ann. NY Acad. Sci.* 2007. Vol. 1103. P. 157–166.
- Johnson K.P.* Natalizumab (Tysabri) treatment for relapsing multiple sclerosis // *Neurologist*. 2007. Vol. 13. P. 182-187.
- Johnson K.P., Brooks B.R., Cohen J.A. et al.* Copolymer 1 reduces relapse rate and improves disability in relapsing-remitting multiple sclerosis: results of a Phase III multicenter, double-blind placebo-controlled trial // *Neurology*. 1995. Vol. 45. P. 1268-1276.
- Johnson K.P., Brooks B.R., Cohen J.A. et al.* Extended use of glatiramer acetate (Copaxone) is well tolerated and maintains its clinical effect on multiple sclerosis relapse rate and degree of disability. Copolymer 1 Multiple Sclerosis Study Group // *Neurol.* 1998. Vol. 50. P. 701-708.

- Kantarci O.H., Hebrink D.D., Achenbach S.J. et al. CTLA4 is associated with susceptibility to multiple sclerosis // *J. Neuroimmunol.* 2003a. Vol. 134. P. 133-141.
- Kantarci O.H., Schaefer-Klein J.L., Hebrink D.D. et al. A population-based study of IL4 polymorphisms in multiple sclerosis // *J. Neuroimmunol.* 2003b. Vol. 137. P. 134-139.
- Kantarci O.H., Hebrink D.D., Achenbach S.J. et al. CD95 polymorphisms are associated with susceptibility to MS in women. A population-based study of CD95 and CD95L in MS // *J. Neuroimmunol.* 2004. Vol. 146. P. 162-170.
- Kantarci O.H., Goris A., Hebrink D.D. et al. IFNG polymorphisms are associated with gender differences in susceptibility to multiple sclerosis // *Genes Immun.* 2005. Vol. 6. P. 153-161.
- Kaplan A.P. Chemokines, chemokine receptors and allergy // *Int. Arch. Allergy Immunol.* 2001. Vol. 124. P. 423-431.
- Kappos L., Polman C.H., Freedman M.S. et al. Treatment with interferon beta-1b delays conversion to clinically definite and McDonald MS in patients with clinically isolated syndromes // *Neurol.* 2006a. Vol. 67. P. 1242-1249.
- Kappos L., Traboulsee A., Constantinescu C. et al. Long-term subcutaneous interferon beta-1a therapy in patients with relapsing-remitting MS // *Neurol.* 2006b. Vol. 67. P. 944-953.
- Kappos L., Bates D., Hartung H.P. et al. Natalizumab treatment for multiple sclerosis: recommendations for patient selection and monitoring // *Lancet Neurol.* 2007. Vol. 6. P. 431-441.
- Kebir H., Kreyenborg K., Ifergan I. et al. Human TH17 lymphocytes promote blood-brain barrier disruption and central nervous system inflammation // *Nat. Med.* 2007. Vol. 13. P. 1173-1175.
- Kidd P. Th1/Th2 Balance: The Hypothesis, its Limitations, and Implications for Health and Disease // *Altern. Med. Rev.* 2003. Vol. 8. P. 223-246.
- Kieseier B.C., Hemmer B., Hartung H.P. Multiple sclerosis--novel insights and new therapeutic strategies // *Curr. Opin. Neurol.* 2005. Vol. 18. P. 211-220.
- Kikly K., Liu L., Na S., Sedgwick J.D. The IL-23/Th(17) axis: therapeutic targets for autoimmune inflammation // *Curr. Opin. Immunol.* 2006. Vol. 18. P. 670-675.
- Kikuchi S., Fukazawa T., Niino M. et al. Estrogen receptor gene polymorphism and multiple sclerosis in Japanese patients: interaction with HLA-DRB1*1501 and disease modulation // *J. Neuroimmunol.* 2002. Vol. 128. P. 77-81.
- Kinkel R.P., Kollman C., O'Connor P. et al. IM interferon beta-1a delays definite multiple sclerosis 5 years after a first demyelinating event // *Neurol.* 2006. Vol. 66. P. 678-684.
- Kirk C.W., Droogan A.G., Hawkins S.A. et al. Tumor necrosis factor microsatellites show association with multiple sclerosis // *J. Neurol. Sci.* 1997. Vol. 147. P. 21-25.
- Kishimoto A., K. Nishiyama, et al. Studies on the phosphorylation of myelin basic protein by protein kinase C and adenosine 3':5'-monophosphate-dependent protein kinase // *J. Biol. Chem.* 1985. Vol. 260. P. 12492-12499.
- Kleinschmidt-DeMasters B.K., Tyler K.L. Progressive multifocal leukoencephalopathy complicating treatment with natalizumab and interferon beta-1a for multiple sclerosis // *N. Engl. J. Med.* 2005. Vol. 353. P. 369-374.
- Kolls J.K., Lindén A. Interleukin-17 family members and inflammation // *Immunity.* 2004. Vol. 21. P. 467-476.
- Kopadze T., Dehmel T., Hartung H.P. et al. Inhibition by mitoxantrone of in vitro migration of immunocompetent cells: a possible mechanism for therapeutic efficacy in the treatment of multiple sclerosis // *Arch. Neurol.* 2006. Vol. 63. P. 1572-1578.
- Kornek B., Lassmann H. Neuropathology of multiple sclerosis // *Brain Res. Bull.* 2003. Vol. 61. P. 321-326.
- Kovarik P., Sauer I., Schaljo B. Molecular mechanisms of the anti-inflammatory functions of interferons // *Immunobiology.* 2007. Vol. 212. P. 895-901.
- Kreutzberg G.W. Microglia: a sensor for pathological events in the CNS // *Trends Neurosci.* 1996. Vol. 19. P. 312-318.
- Kuhle J., Lindberg R.L. et al. Antimyelin antibodies in clinically isolated syndromes correlate with inflammation in MRI and CSF // *J. Neurol.* 2007a. Vol. 254. P. 160-168.
- Kuhle J., Pohl C. et al. Lack of association between antimyelin antibodies and progression to multiple sclerosis // *N. Engl. J. Med.* 2007b. Vol. 356. P. 371-8.

- Langer-Gould A., Steinman L. Progressive multifocal leukoencephalopathy and multiple sclerosis: lessons from natalizumab // *Curr. Neurol. Neurosci. Rep.* 2006. Vol. 6. P. 253-258.
- Langrish C.L., Chen Y., Blumenschein W.M. et al. IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation // *J. Exp. Med.* 2005. Vol. 201. P. 233-40.
- Leist T.P., Vermersch P. The potential role for cladribine in the treatment of multiple sclerosis: clinical experience and development of an oral tablet formulation // *Curr. Med. Res. Opin.* 2007. Vol. 23. P. 2667-2676.
- Levine S.M., Chakrabarty A. The role of iron in the pathogenesis of experimental allergic encephalomyelitis and multiple sclerosis // *Ann. NY Acad. Sci.* 2004. Vol. 1012. P. 252-266.
- Li D.K., O'Conner P., Freedman M. et al. Oral teriflunomide is safe and effective in multiple sclerosis with relapses: results of a randomised, placebo-controlled Phase II study // *Mult. Scler.* 2004. Vol. 10. Suppl. 2. P. P685.
- Li Y., Chu N., Hu A. et al. Increased IL-23p19 expression in multiple sclerosis lesions and its induction in microglia // *Brain.* 2007. Vol. 130. P. 490-501.
- Libich, D.S., Hill C.M., et al. Myelin basic protein has multiple calmodulin-binding sites // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2003. Vol. 308. P. 313-319.
- Ligers A., Xu C., Saarinen S. et al. The CTLA-4 gene is associated with multiple sclerosis // *J. Neuroimmunol.* 1999. Vol. 97. P. 182-190.
- Lock C., Hermans G., Pedotti R. et al. Gene-microarray analysis of multiple sclerosis lesions yields new targets validated in autoimmune encephalomyelitis // *Nat. Med.* 2002. Vol. 8. P. 500-508.
- Lomakin Y.A., Zakharova M.Y., Belogurov A.A. et al. Polyreactive monoclonal autoantibodies in multiple sclerosis: functional selection from phage display library and characterization by deep sequencing analysis // *Acta Naturae.* 2013, Vol. 5. № 4. P. 94-104.
- Lomakin Y.A., Zakharova M.Y., Stepanov A.V. et al. Heavy-light chain interrelations of MS-associated immunoglobulins probed by deep sequencing and rational variation // *Mol. Immunol.* 2014. S0161-5890(14)00023-6.doi: 10.1016/j.molimm.2014.01.013
- Lorentzen A.R., Smestad C., Lie B.A. et al. The SH2D2A gene and susceptibility to multiple sclerosis // *J. Neuroimmunol.* 2008. Vol. 197. № 2. P. 152-158.
- Lovrecic L., Ristić S., Starcević-Cizmarević N. et al. PAI and TPA gene polymorphisms in multiple sclerosis // *Mult. Scler.* 2008. Vol. 14. P. 243-247.
- Lucas M., Zayaz M.D., De Costa A.F. et al. A study of promoter and intronic markers of ApoI/Fas gene and the interaction with Fas ligand in relapsing multiple sclerosis // *Eur. Neurol.* 2004. Vol. 52. P. 12-17.
- Lucchinetti C., Bruck W., Parisi J. et al. Heterogeneity of multiple sclerosis lesions: Implication for the pathogenesis of demyelination // *Ann. Neurol.* 2000. Vol. 47. P. 707-717.
- Ludewig B., Junt T., Hengartner H. et al. Dendritic cells in autoimmune diseases // *Curr. Opin. Immunol.* 2001. Vol. 13. P. 657-662.
- Lundmark F., Duvefelt K., Iacobaeus E. et al. Variation in interleukin 7 receptor alpha chain (IL7R) influences risk of multiple sclerosis // *Nat. Genet.* 2007. Vol. 39. P. 1108-1113.
- Lundry J., Craig B.M. The use of disease-modifying agents among multiple sclerosis patients enrolled in medicare from 1995 to 2002 and the impact of medicare // *Clin. Ther.* 2006. Vol. 28. P. 140-145.
- Luomala M., Elovaara J., Ukkonen M. et al. Plasminogen activator inhibitor 1 gene and risk of MS in women // *Neurology.* 2000. Vol. 54. P. 1862-1864.
- Lyons, J. A., SanM., et al. B cells are critical to induction of experimental allergic encephalomyelitis by protein but not by a short encephalitogenic peptide // *Eur. J. Immunol.* 1999. Vol. 29. P. 3432-9.
- Macciardi F., Boneschi F.M., Cohen D. Pharmacogenetics of autoimmune diseases: research issues in the case of Multiple Sclerosis and the role of IFN-beta // *J. Autoimmun.* 2005. Vol. 25. P. 1-5.
- Madsen L.S., Andersson E.C., Jansson L. et al. A humanized model for multiple sclerosis using HLA-DR2 and a human T-cell receptor // *Nat. Genet.* 1999. Vol. 23. P. 343-347.
- Maeda A., Sobel R.A. Matrix metalloproteinases in the normal human central nervous system, microglial nodules and MS lesions // *Neuropathol. Exp. Neurol.* 1996. Vol. 55. P. 300-309.
- Manel N., Unutmaz D., Littman D.R. The differentiation of human T(H)-17 cells requires transforming growth factor-beta and induction of the nuclear receptor RORgamma // *Nat. Immunol.* 2008. Vol. 9. P. 641-649.
- Martínez A., Rubio A., Urcelay E. et al. TNF-376A marks susceptibility to MS in the Spanish population: A replication study // *Neurology.* 2004. Vol. 62. P. 809-810.

- Martinez Doncel A., Rubio A., Arroyo R. et al. Interleukin-10 polymorphisms in Spanish multiple sclerosis patients // *J. Neuroimmunol.* 2002. Vol. 131. P. 168-172.
- Martínez-Naves E., Victoria-Gutiérrez M., Uría D.F., López-Larrea C. The germline repertoire of T cell receptor beta-chain genes in multiple sclerosis patients from Spain // *J. Neuroimmunol.* 1993. Vol. 47. P. 9-13.
- Matesanz F., Fedetz M., Collado-Romero M. et al. Allelic expression and interleukin-2 polymorphisms in multiple sclerosis // *J. Neuroimmunol.* 2001. Vol. 119. P. 101-105.
- Matesanz F., Caro-Maldonado A., Fedetz M. et al. IL2RA/CD25 polymorphisms contribute to multiple sclerosis susceptibility // *J. Neurool.* 2007. Vol. 254. P. 682-684.
- Mattila K.M., Luomala M., Lehtimäki T. et al. Interaction between ESR1 and HLA-DR2 may contribute to the development of MS in women // *Neurology.* 2001. Vol. 56. P. 1246-1247.
- Mattson M.P. Apoptosis in neurodegenerative disorders // *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 2000. Vol. 1. P. 120-129.
- Matuszevicius D., Kivisäkk P., He B. et al. Interleukin-17 mRNA expression in blood and CSF mononuclear cells is augmented in multiple sclerosis // *Mult. Scler.* 1999. Vol. 5. P. 101-104.
- McCuirk P., Mills K.H. Pathogen-specific regulatory T cells provoke a shift in the Th1/Th2 paradigm in immunity to infectious disease // *Trends Immunol.* 2002. Vol. 23. P. 450-455.
- McDonald W.I., Halliday A.M. Diagnosis and classification of multiple sclerosis // *Br. Med. Bull.* 1977. Vol. 33. P. 4-9.
- McDonald W.I., Compston A., Edan G. et al. Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines from the International Panel on the diagnosis of multiple sclerosis // *Ann. Neurol.* 2001. Vol. 50. P. 121-127.
- McFarland H.F., Martin R. Multiple sclerosis: a complicated picture of autoimmunity // *Nat. Immunol.* 2007. Vol. 8. P. 913-919.
- McKenzie B.S., Kastelein R.A., Cua D.J. Understanding the IL-23-IL-17 immune pathway // *Trends Immunol.* 2006. Vol. 27. P. 17-23.
- McMenamin P.G., Wealhall R.J., Deverall M. et al. Macrophages and dendritic cells in the rat meninges and choroid plexus: three-dimensional localisation by environmental scanning electron microscopy and confocal microscopy // *Cell. Tissue Res.* 2003. Vol. 313. P. 259-269.
- Medana I., Martinic M.A., Wekerle H., Neumann H. Transection of major histocompatibility complex class I-induced neurites by cytotoxic T lymphocytes // *Am. J. Pathol.* 2001. Vol. 159. P. 809-815.
- Medveczky P., Antal J. et al. Myelin basic protein, an autoantigen in multiple sclerosis, is selectively processed by human trypsin 4 // *FEBS Lett.* 2006. Vol. 580. P. 545-52.
- Mihailova S., Ivanova M., Mihaylova A. et al. Pro- and anti-inflammatory cytokine gene polymorphism profiles in Bulgarian multiple sclerosis patients // *J. Neuroimmunol.* 2005. Vol. 168. P. 138-143.
- Miller S.D., McMahon E.J., Schreiner B., Bailey S.L. Antigen presentation in the CNS by myeloid dendritic cells drives progression of relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis // *Ann. NY Acad. Sci.* 2007. Vol. 1103. P. 179-191.
- Mirel D.B., Barcellos L.F., J. Wang, S.L. et al. Analysis of IL4R haplotypes in predisposition to multiple sclerosis // *Genes Immun.* 2004. Vol. 5. P. 138-141.
- Miyagishi R., Niino M., Fukazawa T. et al. C-C chemokine receptor 2 gene polymorphism in Japanese patients with multiple sclerosis // *J. Neuroimmunol.* 2003. Vol. 145. P. 135-8.
- Motsinger A.A., Brassat D., Caillier S.J. et al. Complex gene-gene interactions in multiple sclerosis: a multifactorial approach reveals associations with inflammatory genes // *Neurogenetics.* 2007. Vol. 8. P. 11-20.
- Musse, A.A., Boggs J.M. et al. Deimination of membrane-bound myelin basic protein in multiple sclerosis exposes an immunodominant epitope // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2006. Vol. 103. P. 4422-4427.
- Mycko M., Kowalski W., Kwinkowski M. et al. Multiple sclerosis: the frequency of allelic forms of tumor necrosis factor and lymphotoxin-alpha // *J. Neuroimmunol.* 1998a. Vol. 84. P. 198-206.
- Mycko M.P., Kwinkowski M., Tronczynska E. et al. Multiple sclerosis: the increased frequency of the ICAM-1 exon 6 gene point mutation genetic type K469 // *Ann. Neurol.* 1998b. Vol. 44. P. 70-75.
- Nejentsev S., Laaksonen M., Tienari P.J. et al. Intercellular adhesion molecule-1 K469E polymorphism: study of association with multiple sclerosis // *Hum. Immunol.* 2003. Vol. 64. P. 345-349.
- Neuhaus O., Wiendl H., Kieseier B.C. et al. Multiple sclerosis: Mitoxantrone promotes differential effects on immunocompetent cells in vitro // *J. Neuroimmunol.* 2005. Vol. 168. P. 128-137.

- Niino M., Fukazawa T., Yabe I. et al. Vitamin D receptor gene polymorphism in multiple sclerosis and the association with HLA class II alleles // *J. Neurol. Sci.* 2000a. Vol. 177. P. 65-71.
- Niino M., Kikuchi S., Fukazawa T. et al. Estrogen receptor gene polymorphism in Japanese patients with multiple sclerosis // *J. Neurol. Sci.* 2000b. Vol. 179. P. 70-75.
- Niino M., Kikuchi S., Fukazawa T. et al. Genetic polymorphisms of osteopontin in association with multiple sclerosis in Japanese patients // *J. Neuroimmunol.* 2003. Vol. 136. P. 125-129.
- O'Brien K., Fitzgerald D.C., Naiken K. et al. Role of the innate immune system in autoimmune inflammatory demyelination // *Curr. Med. Chem.* 2008. Vol. 15. P. 1105-1115.
- O'Connor K., Bar-Or A., Hafler D.A. The Neuroimmunology of Multiple Sclerosis: Possible Role of T and B Lymphocytes in Immunogenesis // *J. Clin. Immunol.* 2001. Vol. 21. P. 81-92.
- O'Connor P.W., Li D., Freedman M.S. et al. A Phase II study of the safety and efficacy of teriflunomide in multiple sclerosis with relapses // *Neurol.* 2006. Vol. 66. P. 894-900.
- O'Connor P., Comi G., Montalban X. et al. Oral fingolimod (FTY720) in multiple sclerosis: two-year results of a phase II extension study // *Neurol.* 2009. Vol. 72. P. 73-79.
- O'Garra A. Cytokines induce the development of functionally heterogeneous T helper cell subsets // *Immunity.* 1998. Vol. 8. P. 275-283.
- Oksenberg R., Baranzini S.E., Sawcer S., Hauser S.L. The genetics of multiple sclerosis: SNPs to pathways to pathogenesis // *Nat. Rev. Genet.* 2008. Vol. 9. P. 516-526.
- Olsson T., Hillert J. The genetics of multiple sclerosis and its experimental models // *Curr. Opin. Neurol.* 2008. Vol. 21. № 3. P. 255-260.
- Ota, K., Matsui M. et al. T-cell recognition of an immunodominant myelin basic protein epitope in multiple sclerosis // *Nature.* 1990. Vol. 346. P. 183-187.
- Otaegui D., Sáenz A., Camaño P. et al. CD24 V/V is an allele associated with the risk of developing multiple sclerosis in the Spanish population // *Mult. Scler.* 2006. Vol. 12. P. 511-514.
- Otaegui D., Saenz A., Ruiz-Martinez J. et al. UCP2 and mitochondrial haplogroups as a multiple sclerosis risk factor // *Mult. Scler.* 2007. Vol. 13. P. 454-458.
- Panitch H., Miller A., Paty D. et al. Interferon beta-1b in secondary progressive MS: results from a 3-year controlled study // *Neurol.* 2004. Vol. 63. P. 1788-1795.
- Partridge J.M., Weatherby S.J., Woolmore J.A. et al. Susceptibility and outcome in MS: associations with polymorphisms in pigmentation-related genes // *Neurol.* 2004. Vol. 62. P. 2323-2325.
- Pihlaja H., Rantamaki T., Wikstrom J. et al. Linkage disequilibrium between the MBP tetranucleotide repeat and multiple sclerosis is restricted to a geographically defined subpopulation in Finland // *Genes Immun.* 2003. Vol. 4. P. 138-146.
- Polman C., Barkhof F., Sandberg-Wollheim M. et al. Treatment with laquinimod reduces development of active MRI lesions in relapsing MS // *Neurol.* 2005a. Vol. 64. P. 987-991.
- Polman C.H., Reingold S.C., Edan G. et al. Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2005 revisions to the «McDonald Criteria» // *Ann. Neurol.* 2005b. Vol. 58. P. 840-846.
- Polman C.H., O'Connor P.W., Havrdova E. et al. A randomized, placebo-controlled trial of natalizumab for relapsing multiple sclerosis // *N. Engl. J. Med.* 2006. Vol. 54. P. 899-910.
- Polosukhina D.I., Kanyshkova T.G. et al. Hydrolysis of myelin basic protein by polyclonal catalytic IgGs from the sera of patients with multiple sclerosis // *J. Cell. Mol. Med.* 2004. Vol. 8. P. 359-368.
- Polverini E., Rangaraj G. et al. Binding of the proline-rich segment of myelin basic protein to SH3 domains: spectroscopic, microarray, and modeling studies of ligand conformation and effects of posttranslational modifications // *Biochemistry.* 2008. Vol. 47. P. 267-282.
- Ponomarenko N.A., Durova O.M. et al. Catalytic antibodies in clinical and experimental pathology: human and mouse models // *J. Immunol. Methods.* 2002. Vol. 269. P. 197-211.
- Ponomarenko N.A., Durova O.M. et al. Autoantibodies to myelin basic protein catalyze site-specific degradation of their antigen // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2006. Vol. 103. P. 281-286.
- Poser C.M., Paty D.W., Scheinberg L. et al. New diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines for research protocols // *Ann. Neurol.* 1983. Vol. 13. P. 227-231.
- Prat A., Antel J. Pathogenesis of multiple sclerosis // *Curr. Opin. Neurol.* 2005. Vol. 18. P. 225-230.
- PRISMS Study Group. Randomized double-blind placebo-controlled study of interferon β -1a in relapsing/remitting multiple sclerosis // *Lancet.* 1998. Vol. 352. P. 1498-1504.

- Pritzker L.B., Joshi S. et al.* Deimination of myelin basic protein. 1. Effect of deimination of arginyl residues of myelin basic protein on its structure and susceptibility to digestion by cathepsin D // *Biochemistry*. 2000. Vol. 39. P. 5374-5381.
- Pugliatti M., Rosati G., Carton H. et al.* The epidemiology of multiple sclerosis in Europe // *Eur. J. Neurol*. 2006. Vol. 13. P. 700-722.
- Pulkkinen K., Luomala M., Kuusisto H. et al.* Increase in CCR5 Delta32/Delta32 genotype in multiple sclerosis // *Acta. Neurol. Scand*. 2004. Vol. 109. P. 342-347.
- Rasmussen H.B., Kelly M.A., Clausen J.* Genetic susceptibility to multiple sclerosis: detection of polymorphic nucleotides and an intron in the 3' untranslated region of the major histocompatibility complex class II transactivator gene // *Hum. Immunol*. 2001. Vol. 62. P. 371-377.
- Reindl M., Lington C. et al.* Antibodies against the myelin oligodendrocyte glycoprotein and the myelin basic protein in multiple sclerosis and other neurological diseases: a comparative study // *Brain*. 1999. Vol. 122. Pt. 11. P. 2047-2056.
- Richards R.G., Sampson F.C., Beard S.M., Tappenden P.* A review of the natural history and epidemiology of multiple sclerosis: implications for resource allocation and health economic models // *Health Technol. Assess*. 2002. Vol. 6. P. 1-73.
- Riederer B., Honegger C.G. et al.* The effect of age on the microheterogeneous pattern of human myelin basic protein // *Gerontology*. 1984. Vol. 30. P. 234-239.
- Riise T., Wolfson C.* The epidemiologic study of exogenous factors in the ethiology of multiple sclerosis // *Neurology*. 1997. Vol. 49. № 2. Suppl. 2. P. S1-S90.
- Risch N.J.* Searching for genetic determinants in the new millennium // *Nature*. 2000. Vol. 405. P. 847-856.
- Rose J.W., Foley J., Carlson N.* Monoclonal antibody treatments for multiple sclerosis // *Curr. Neurol. Neurosci. Rep*. 2008. Vol. 8. P. 419-426.
- Rotstein Z., Hazan R., Barak Y., Achiron A.* Perspectives in multiple sclerosis health care: special focus on the costs of multiple sclerosis // *Autoimmun. Rev*. 2006. Vol. 5. P. 511-516.
- Rubio J.P., Stankovich J., Field J. et al.* Replication of KIAA0350, IL2RA, RPL5 and CD58 as multiple sclerosis susceptibility genes in Australians // *Genes Immun*. 2008. Vol. 9. P. 624-630.
- Sadovnick A.D., Ebers G.C., Dymont D.A., Risch N.J.* Evidence for genetic basis of multiple sclerosis. The Canadian Collaborative Study Group // *Lancet*. 1996. Vol. 347. P. 1728-1730.
- Sandberg-Wollheim M., Ciusani E., Salmaggi A., Pociot F.* An evaluation of tumor necrosis factor microsatellite alleles in genetic susceptibility to multiple sclerosis // *Mult. Scler*. 1995. Vol. 1. P. 181-185.
- Sarial S., Shokrgozar M.A., Amirzargar A. et al.* IL-1, IL-1R and TNFalpha gene polymorphisms in Iranian patients with multiple sclerosis // *Iran J. Allergy Asthma Immunol*. 2008. Vol. 7. P. 37-40.
- Sawcer S., Ban M., Maranian M. et al.* A high-density screen for linkage in multiple sclerosis // *Am. J. Hum. Genet*. 2005. Vol. 77. P. 454-467.
- Schmidt S., Barcellos L.F., DeSombre K. et al.* Multiple Sclerosis Genetics Group. Association of polymorphisms in the apolipoprotein E region with susceptibility to and progression of multiple sclerosis // *Am. J. Hum. Genet*. 2002. Vol. 70. P. 708-717.
- Schumacher G.A., Beebe G., Kibler R.F. et al.* Problems of experimental trials of therapy in multiple sclerosis - report by the Panel on the Evaluation of Experimental Trials of Therapy in Multiple Sclerosis // *Ann. NY Acad. Sci*. 1965. Vol. 122. P. 552-568.
- Schwinzer R., Witte T., Hundrieser J. et al.* Enhanced frequency of a PTPRC (CD45) exon A mutation (77C->G) in systemic sclerosis // *Genes Immunol*. 2003. Vol. 4. P. 168-169.
- Scott L.J., Figgitt D.P.* Mitoxantrone: a review of its use in multiple sclerosis // *CNS Drugs*. 2004. Vol. 18. P. 379-396.
- Semra Y.K., Seidi O.A., Sharief M.K.* Disease activity in multiple sclerosis correlates with T lymphocyte expression of the inhibitor of apoptosis proteins // *J. Neuroimmunol*. 2002. Vol. 122. P. 159-166
- Simpson J., Rezaie P., Newcombe J., Cuzner M.L.* Expression of the beta-chemokine receptors CCR2, CCR3 and CCR5 in multiple sclerosis central nervous system tissue // *Neuroimmunol*. 2000. Vol. 108. P. 192-200.
- Siveke J.T., Hamman A.* T helper 1 and T helper 2 cells respond differentially to chemokines // *J. Immunol*. 1998. Vol. 166. P. 550-554.
- Sospedra, M., Martin R.* Immunology of multiple sclerosis // *Annu. Rev. Immunol*. 2005. Vol. 23. P. 683-747.

- Steinke J.W., Borish L. Cytokines and chemokines // *J. Allergy. Clin. Immunol.* 2006. Vol. 117. P. S441-445.
- Steinman L. Multiple sclerosis: a coordinated immunological attack against myelin in the central nervous system // *Cell.* 1996. Vol. 85. P. 299-302.
- Steinman R.M., Nussenzweig M.C. Avoiding horror autotoxicus: the importance of dendritic cells in peripheral T cell tolerance // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2002. Vol. 99. P. 351-358
- Stepanov A.V., Belogurov A.A. Jr., Ponomarenko N.A. et al. Design of targeted B cell killing agents // *PLoS One.* 2011. Vol. 6. № 6. P. e20991.
- Stuve O., Chabot S., Jung S.S. et al. Chemokine-enhanced migration of T lymphocytes is antagonized by interferon-1b through an effect on matrix metalloproteinase-9 // *J. Neuroimmunol.* 1997. Vol. 80. P. 38-46.
- Suppiah V., Goris A., Alloza I. et al. Polymorphisms in the interleukin-4 and IL-4 receptor genes and multiple sclerosis: a study in Spanish-Basque, Northern Irish and Belgian populations // *Int. J. Immunogenet.* 2005. Vol. 32. P. 383-388.
- Svejgaard A. The immunogenetics of multiple sclerosis // *Immunogenet.* 2008. Vol. 60. P. 275-286.
- Swanberg M., Lidman O., Padyukov L. et al. MHC2TA is associated with differential MHC molecule expression and susceptibility to rheumatoid arthritis, multiple sclerosis and myocardial infarction // *Nat. Genet.* 2005. Vol. 37. P. 486-494.
- Tauber S.C., Nau R., Gerber J. Systemic infections in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis // *Arch. Physiol. Biochem.* 2007. Vol. 113. P. 124-130.
- The IFNB Multiple Sclerosis Study Group. Interferon beta-1b is effective in relapsing-remitting multiple sclerosis. I. Clinical results of a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled trial // *Neurology.* 1993. Vol. 43. P. 655-661.
- Thomson G. Mapping disease genes: family-based association studies // *Am. J. Hum. Genet.* 1995. Vol. 57. P. 487-498.
- Tienary P.J., Kuokkanen S., Pastinen T. et al. Golli-MBP gene in multiple sclerosis susceptibility // *J. Neuroimmunol.* 1998. Vol. 81. P. 158-167.
- Tienary P.J., Wikstrom J., Sajantia A. et al. Genetic susceptibility to multiple sclerosis linked to myelin basic protein gene // *Lancet.* 1992. Vol. 340. P. 987-991.
- Tintoré M., Rovira A., Martínez M. et al. Isolated demyelinating syndromes: comparison of different MR imaging criteria to predict conversion to clinically definite multiple sclerosis // *Am. J. Neuroradiol.* 2000. Vol. 21. P. 702-706.
- Trapp B.D., Peterson J., Ransohoff R.M., Rudick R. Axonal transection in the lesions of multiple sclerosis // *New Engl. J. Med.* 1998. Vol. 338. P. 278-285.
- Urcelay E., Santiago J.L., Mas A. et al. Role of interleukin 4 in Spanish multiple sclerosis patients // *J. Neuroimmunol.* 2005. Vol. 168. P. 164-167.
- Vaknin-Dembinsky A., Balashov K., Weiner H.L. IL-23 is increased in dendritic cells in multiple sclerosis and down-regulation of IL-23 by antisense oligos increases dendritic cell IL-10 production // *J. Immunol.* 2006. Vol. 176. P. 7768-7774.
- Van Veen T., Kalkers N.F., Crusius J.B. et al. The FAS-670 polymorphism influences susceptibility to multiple sclerosis // *J. Neuroimmunol.* 2002. Vol. 128. P. 95-100.
- Vandenbroeck K., Fiten P., Heggarty S. et al. Chromosome 7q21-22 and multiple sclerosis: evidence for a genetic susceptibility effect in vicinity to the protachykinin-1 gene // *J. Neuroimmunol.* 2002. Vol. 125. P. 141-148.
- Vogler S., Goedde R., Mitterski B. et al. Association of a common polymorphism in the promoter of UCP2 with susceptibility to multiple sclerosis. // *J. Mol. Med.* 2005. Vol. 83. P. 806-811.
- Vyshkina T., Kalman B. Analyses of a MS-associated haplotype encompassing the CCL3 gene // *J. Neuroimmunol.* 2006. Vol. 176. P. 216-218.
- Vyshkina T., Shugart Y.Y., Birnbaum G. et al. Association of haplotypes in the beta-chemokine locus with multiple sclerosis // *Eur. J. Hum. Genet.* 2005. Vol. 13. P. 240-247.
- Wagstaff A.J., Goa K.L. Recombinant Interferon-beta-1a: A Review of its Therapeutic Efficacy in Relapsing-Remitting Multiple Sclerosis // *BioDrugs.* 1998. Vol. 10. P. 471-494.
- Wakkee M., Thio H.B. Drug evaluation: BG-12, an immunomodulatory dimethylfumarate // *Curr. Opin. Invest. Drugs.* 2007. Vol. 8. P. 955-962.
- Warren K.G., Catz I. Administration of myelin basic protein synthetic peptides to multiple sclerosis patients // *J. Neurol. Sci.* 1995. Vol. 133. P. 85-94.

- Warren K.G., Catz I. The effect of intrathecal MBP synthetic peptides containing epitope P85 VVHFFKNIIVTP96 on free anti-MBP levels in acute relapsing multiple sclerosis // *J. Neurol. Sci.* 1997. Vol. 148. P. 67-78.
- Warren K.G., Catz I., Ferenczi L.Z., Krantz M.J. Intravenous synthetic peptide MBP8298 delayed disease progression in an HLA Class II-defined cohort of patients with progressive multiple sclerosis: results of a 24-month double-blind placebo-controlled clinical trial and 5 years of follow-up treatment // *Eur. J. Neurol.* 2006. Vol. 13. P. 887-895.
- Waubant E., Gee L., Miller K. et al. IFN-beta1a may increase serum levels of TIMP-1 in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis // *J. Interferon Cytokine Res.* 2001. Vol. 21. P. 181-185.
- Weber F., Fontaine B., Cournu-Rebeix I. et al. IL2RA and IL7RA genes confer susceptibility for multiple sclerosis in two independent European populations // *Genes Immunol.* 2008. Vol. 9. P. 259-263.
- Webster H.D. Growth factors and myelin damage in multiple sclerosis // *Mult. Scler.* 1997. Vol. 2. P. 113-120.
- Weiner H.L. A shift from adaptive to innate immunity: a potential mechanism of disease progression in multiple sclerosis // *J. Neurol.* 2008. Vol. 255. Suppl. 1. P. 3-11.
- Wekerle H.C., Linington C., Lassman H., Meyermann W.B. Antigen presentation in the peripheral nervous system: Schwann cells present endogenous myelin autoantigens to lymphocytes // *Trends Neurosci.* 1986. Vol. 9. P. 271-278.
- Wellcome Trust Case Control Consortium; Australo-Anglo-American Spondylitis Consortium (TASC). Association scan of 14,500 nonsynonymous SNPs in four diseases identifies autoimmunity variants // *Nature Genet.* 2007. Vol. 39. P. 1329-1337.
- Wheeler R.D., Owens T. The changing face of cytokines in the brain: perspectives from EAE // *Curr. Pharm. Des.* 2005. Vol. 11. P. 1031-1037.
- Wilson N.J., Boniface K., Chan J.R. et al. Development, cytokine profile and function of human interleukin 17-producing helper T cells // *Nat. Immunol.* 2007. Vol. 8. P. 950-957.
- Wingerchuk D.M., Lucchinetti C.F. Comparative immunopathogenesis of acute disseminated encephalomyelitis, neuromyelitis optica, and multiple sclerosis // *Curr. Opin. Neurol.* 2007. Vol. 20. P. 343-350.
- Wise L.H., Lanchbury J.S., Lewis C.M. Meta-analysis of genome searches // *Ann. Hum. Genet.* 1999. Vol. 63. P. 263-272.
- Zand R., Li M.X. et al. Determination of the sites of posttranslational modifications in the charge isomers of bovine myelin basic protein by capillary electrophoresis-mass spectroscopy // *Biochemistry.* 1998. Vol. 37. P. 2441-2449.
- Zayas M.D., Lucas M., Solano F. et al. Association of a CA repeat polymorphism upstream of the Fas ligand gene with multiple sclerosis // *J. Neuroimmunol.* 2001. Vol. 116. P. 238-241.
- Zhang H., Zhao H., Merikangas K. Strategies to identify genes for complex diseases // *Ann. Med.* 1997. Vol. 29. P. 493-498.
- Zhang Z., Duvefelt K., Svensson F. et al. Two genes encoding immune-regulatory molecules (LAG3 and IL7R) confer susceptibility to multiple sclerosis // *Genes Immun.* 2005. Vol. 6. P. 145-152.
- Zhou Q., Rammohan K., Lin S. et al. CD24 is a genetic modifier for risk and progression of multiple sclerosis // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2003. Vol. 100. P. 15041-15046.
- Ziemssen T., Kumpfel T., Klinkert W.E. et al. Glatiramer acetate-specific T-helper 1- and 2-type cell lines produce BDNF: implications for multiple sclerosis therapy // *Brain.* 2002. Vol. 125. P. 2381-2391.

Агрегация РНК-связывающего белка FUS как патогенетический фактор развития нейродегенеративного процесса

Т.А. Шелковникова, Е.И. Леонова, Р.К. Овчинников, Н.Н. Нинкина

Содержание

1. Введение
2. Стресс-гранулы и агрегация
3. Прионоподобные домены и их роль в обратимой и необратимой агрегации белков
4. Роль РНК-связывающих белков в нейродегенеративных заболеваниях на примере БАС-FUS
5. Моделирование FUS-протеинопатий *in vitro* (клеточные культуры)
6. Моделирование FUS-протеинопатий *in vivo*
 - 6.1. Моделирование у беспозвоночных и рыб
 - 6.2. Моделирование у млекопитающих
7. Заключение

1. Введение

Недавно для ряда РНК-связывающих белков, играющих ведущую роль в развитии нейродегенеративных заболеваний, была показана высокая способность к агрегации *in vivo*: несмотря на то что эти белки не способны образовывать амилоидные фибриллы, они могут агрегировать в нервной системе с образованием патологических белковых включений. Было обнаружено, что эти белки содержат в своей структуре «прионоподобный» домен, который играет ведущую роль в их агрегации (King et al., 2012). Более того, впоследствии было показано, что прионоподобный домен необходим и для выполнения этими белками своих нормальных клеточных функций, так как он играет ключевую роль в осуществлении фазового перехода от диффузного в обратимо агрегированное состояние, необходимое для образования рибонуклеопротеиновых (РНП) комплексов – РНК-гранул (Han et al., 2012; Kato et al., 2012). Таким образом, способность к обратимой агрегации – наиболее уязвимое место в метаболизме неамилоидогенных белков, так как под воздействием ряда факторов может осуществляться переход от динамически агрегированного в необратимо агрегированное состояние. Одним из наиболее типичных представителей этой группы белков является белок fused in sarcoma (FUS). Исследования молекулярных механизмов, лежащих в основе развития FUS-протеинопатий, а также протеинопатий, вызываемых агрегацией сходных по структуре белков, стали возможны благодаря созданию ряда генетических *in vitro* и *in vivo* моделей. Последние

Сокращения: БАС – боковой амиотрофический склероз; РНП – рибонуклеопротеиновый комплекс; СГ – стресс-гранулы; ФТД – фронтотемпоральная дегенерация; FUS – белок (от англ. «fused in sarcoma»); ThT – тиофлафин Т; YFP – желтый флуоресцентный белок.

позволили не только понять механизмы токсичности FUS, но и установить роль его агрегации в норме и патологии. В настоящем обзоре обобщены и критически проанализированы экспериментальные данные, полученные в различных модельных *in vitro* и *in vivo* системах, которые подчеркивают роль агрегации FUS в развитии FUS-протеинопатий и необходимость регуляции его обратимой агрегации.

Белок FUS (*fused in surcoma*), или TLS (*translocated in liposarcoma*), был открыт в 1993 г. группой шведских ученых при изучении миксоидной липосаркомы человека (Croizat et al., 1993). В этой опухоли хромосомная транслокация приводила к слиянию двух генов, *fus* и *chop*, в результате чего синтезировался химерный белок, выполняющий роль транскрипционного фактора, усиливающего пролиферацию клеток и способствующего опухолевой прогрессии. В течение последующих 10 лет FUS изучался с целью определения механизма, с помощью которого происходила онкогенетическая трансформация. Однако относительно недавно мутации в гене, кодирующем FUS, были обнаружены при наследственных формах бокового амиотрофического склероза (БАС) (Kwiatkowski et al., 2009; Vance et al., 2009). Практически одновременно патология белка FUS, но уже в большинстве случаев не связанная с мутациями, была выявлена при другом нейродегенеративном заболевании, фронтотемпоральной дегенерации (ФТД) (Neumann et al., 2009). Кроме того, агрегация FUS была зарегистрирована при болезни Хантингтона, спиноцеребеллярной атаксии и дентаторубральной паллидарной атрофии (Doi et al., 2010). Общим для БАС и ФТД с патологией FUS является присутствие FUS-позитивных белковых включений в пораженных участках нервной системы, что дает возможность объединить заболевания с абсолютно различными клиническими проявлениями в одну группу – FUS-протеинопатий, или FUSопатий (англ. FUS proteinopathy или FUSopathy) (Shelkovnikova, 2013).

FUS принадлежит к семейству белков FET/TET, к которому также относятся EWS (*Ewing's sarcoma*) и TAF15 (*TATA-binding protein-associated factor 2N*). Название FET/TET происходит от трех заглавных букв FUS/TLS, EWSR1 и TAF15 (Andersson et al., 2008) (рис. 1). Представители этого семейства – структурно очень сходные РНК-связывающие белки, имеющие в своей структуре следующие основные домены: SYGQ-богатый N-концевой домен (Zinszner et al., 1994), РНК-связывающий мотив (RNA-recognition motif, RRM), мотив «цинковый палец» и несколько RGG-доменов, богатых глицином (Bentmann et al., 2012; Lerga et al., 2001; Iko et al., 2004). Также все три белка имеют С-концевой сигнал ядерной локализации (*nuclear location signal, NLS*), который узнается ядерным рецептором транспортом (другое название – кариоферин-β2) и отвечает за транспорт белков из цитоплазмы в ядро и обратно (Dormann et al., 2010; Gal et al., 2011; Ito et al., 2011; Kino et al., 2011; Niu et al., 2012; Lee et al., 2006). Несмотря на постоянную циркуляцию между ядром и цитоплазмой основной пул белков FET находится в ядре клетки (Andersson et al., 2008; Dormann, Haass, 2013). Сравнение структур трех генов показало, что экзоны, кодирующие RRM и мотив «цинковый палец», являются высококонсервативными, из чего можно сделать вывод, что все три гена произошли от одного предшественника (Morohoshi et al., 1998; Dormann, Haass, 2013). Гены семейства FET экспрессируются практически повсеместно. Белки FET вовлечены в

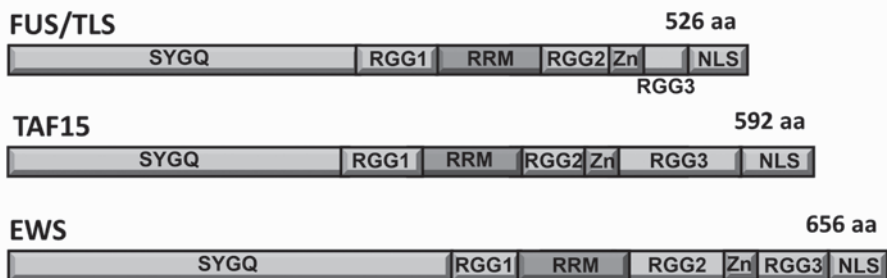


Рис. 1. Структура белков семейства FET. SYGQ – тирозин/глицин-богатый (прионоподобный) домен; RRM – РНК-узнающий мотив; RGG – домены, участвующие в связывании РНК; Zn – мотив «цинковый палец»; NLS – сигнал ядерной локализации

регуляцию различных этапов экспрессии гена, включая транскрипцию, сплайсинг пре-мРНК, транспорт мРНК, а также участвуют в репарации ДНК (Ishigaki et al., 2012; Rogelj et al., 2012; Fujii et al., 2005).

Спектр клеточных функций FUS-белка еще не охарактеризован, однако очевидно, что он важен для нормальной функции нервной системы. Мутации в гене *fus* были обнаружены в ряде случаев БАС, чаще всего наследственных и очень редко – при спорадических случаях заболевания. Большинство ассоциированных с БАС мутаций расположены в сигнале ядерной локализации (nuclear localization signal, NLS) и приводят к нарушению ядерного импорта, в результате чего FUS накапливается в цитоплазме (Dormann et al., 2010; Gal et al., 2011; Ito et al., 2011; Kino et al., 2011; Niu et al., 2012; Zhang, Chook, 2012). Несмотря на то что наличие FUS-позитивных включений считается надежным маркером FUS протеинопатий, их роль в патогенезе FUS-протеинопатий до сих пор остается неясной. Еще более загадочным остается процесс образования патологических белковых агрегатов и механизмы, лежащие в основе их токсичности.

2. Стресс-гранулы и агрегация

Учитывая что стресс – это частое явление в жизни любого живого организма, неудивительно, что эукариотическая клетка разработала сложную систему защиты от неблагоприятных внешних воздействий: теплового шока, окислительного стресса, ультрафиолетового облучения, вирусной инфекции и многих других факторов (Morimoto, 2011). Так как основная задача клетки во время стресса – это сохранение энергии, то в первую очередь прекращается трансляция клеточных мРНК и синтезируются только те белки, которые необходимы клетке для выживания во время стресса (Lindquist, 1981). Для осуществления этой задачи в клетке выработался механизм, при котором нетранслируемая мРНК и сопровождающие ее РНК-связывающие белки собираются в особые рибонуклеопротеидные (РНП) комплексы

– стресс-гранулы (СГ) и РНК-процессирующие органеллы (Р-тельца) (Anderson, Kedersha, 2006, 2008; Kedersha et al., 2005; Kedersha, Anderson, 2007; Li et al., 2013). Если СГ функционируют как некие временные «хранилища» для мРНК и защищающих ее белков, то Р-тельца осуществляют селективную деградацию мРНК во время стресса и в восстановительный период (Parker, Sheth, 2007).

СГ представляют собой временные немембранные цитоплазматические агрегаты, в состав которых входят нетранслируемые мРНК, РНК-связывающие белки, РНК-хеликазы, нуклеазы, киназы и различные сигнальные молекулы. Обычно СГ образуются в ответ на сублетальный стресс. Происходит это следующим образом: сначала прекращается трансляция белков «домашнего хозяйства», в то время как мРНК, кодирующие факторы, принимающие участие в ответе на стресс, например белки теплового шока, продолжают активно транслироваться (Lindquist, 1981). На следующем этапе происходит агрегация белков, образующих преинициаторные комплексы, с быстрой сборкой СГ. После окончания действия стресса СГ быстро распадаются, трансляция восстанавливается и клетка возобновляет свои функции (Kedersha et al., 1999, 2000). Многие РНК-связывающие белки, необходимые для образования СГ, содержат прионоподобные домены, которые за счет белок-белкового взаимодействия образуют динамические кросс- β -структуры. Последние способны как быстро агрегировать, так и быстро распадаться, что очень важно для правильного функционирования СГ (Gilks et al., 2004). FUS является одним из РНК-связывающих белков в составе СГ, однако в норме ввиду его низкого содержания в цитоплазме его концентрация в СГ также низка. БАС-ассоциированные мутации, локализованные чаще всего в сигнале ядерной локализации и вызывающие перераспределение белка из ядра в цитоплазму, приводят к его более эффективной секвестрации в СГ (Dormann et al., 2010; Gal et al., 2011; Ito et al., 2011; Kino et al., 2011; Niu et al., 2012; Zhang, Chook, 2012). Такие СГ с высоким содержанием FUS недавно стали называть патологическими, или конститутивными, СГ (Liu-Yesucevitz et al., 2011; Li et al., 2013). Была также выдвинута гипотеза о непосредственной трансформации FUS-содержащих СГ в нерастворимые, иногда убиквитинированные белковые агрегаты, характерные для FUS-протеинопатий (Dormann et al., 2010).

3. Прионоподобные домены и их роль в обратимой и необратимой агрегации белков

Прионы – это белки, способные принимать амилоидогенную конформацию и способные становиться матрицей для преобразования других белков в прионы. Более того, они способны «сеять» агрегацию не только внутри клетки, но и между клетками – то есть обладают свойством трансмиссивности. Более того, возможен перенос патогенных прионов между особями одного вида и даже между разными видами (Gendoo, Harrison, 2011; King et al., 2012). Ранее считалось, что для млекопитающих прионы – это патогенные факторы, которые могут привести к смерти от поражения нервной системы, тогда как прионы дрожжей, например, помогают им приспособляться к различным условиям окружающей среды (Halfmann et al., 2010). Однако, как было

установлено недавно, агрегация некоторых белков по прионному механизму у млекопитающих также важна для ряда их физиологических функций (Kato et al., 2012; Han et al., 2012), в том числе – она играет важную роль при образовании СГ и других РНК-гранул, при врожденном клеточном иммунитете (например белок MAVS), при обеспечении долговременной памяти (например белок СРЕВ) (Kato et al., 2012; Hou et al., 2011; Bailey et al., 2004).

Установление причинно-следственной связи между развитием ряда нейродегенеративных заболеваний и дисфункцией РНК-связывающих белков, имеющих в своей структуре прионоподобные домены, полностью изменило прежнее представление о механизмах возникновения и прогрессии нейродегенеративных процессов и привело к возникновению новой, революционной, концепции молекулярных механизмов, ведущих к развитию этих расстройств. Нарушение конформации ряда белков, ведущее к образованию патологических агрегатов, является общей чертой многих нейродегенеративных заболеваний. С помощью биоинформатических методов в протеоме человека было выявлено около 250 белков, содержащих прионоподобные домены (King et al., 2012). До 12% из этого пула белков приходится на РНК-связывающие белки, из которых 12 ассоциированы с нейродегенеративными заболеваниями – протеинопатиями.

Существование прионоподобного домена в N-концевой области FUS (1-239) было предсказано с помощью алгоритма, разработанного (Alberti et al., 2009), который основан на выборе участков белка, сходных по аминокислотному составу с прионными доменами дрожжевых белков, таких как Sup35, Ure2, Rnq1p (Shorter, Lindquist, 2004). Как правило, эти участки содержали большое количество гидрофильных аминокислотных остатков, таких как аспарагин, глутамин и тирозин. В последующих экспериментах выяснилось, что подобные домены наделяют FUS и сходные РНК-связывающие белки способностью переходить из полностью развернутой пространственной структуры в промежуточные по фолдингу состояния, в том числе с образованием динамических кросс- β -структур и амилоидных фибрилл. Последние, в свою очередь, могут выступать в качестве «матрицы» для сворачивания по типу прионов (Halfmann et al., 2011, Lanson et al., 2011; Han et al., 2012). Важно отметить, что подвижные кросс- β -структуры проявляют свойства жидкостей, но могут образовывать и гелеобразные формы, способствуя удержанию как РНК, так и РНК-связывающих белков (Kato et al., 2012; Sun et al., 2011; Han et al., 2012). Эти два переходных состояния (жидкость–гель) важны для образования различных немембранных РНП-структур, включая транспортные РНК-гранулы, тельца Кахалья (Cajal bodies), родственные им структуры Gems (Gemini of Cajal bodies), СГ и т.д. (Kaiser et al., 2008; Shevtsov, Dundr, 2011).

При нормальном функционировании клетки именно это переходное состояние необходимо для включения FUS в РНП-комплексы. Следовательно, факторы, которые могут повлиять на сдвиг баланса в сторону агрегированного состояния, могут оказаться решающими для запуска неконтролируемой, каскадной агрегации. Тем не менее, вопрос о возможности непосредственной трансформации СГ в патологические нерастворимые агрегаты остается открытым. Главным аргументом против такого сценария является динамический характер СГ, а также тот факт, что их основная функция – защита клетки во период стресса. Ряд способных к агре-

гации белков с прионоподобными доменами, например TIA-1, собираются в СГ без последующей необратимой агрегации и быстро диссоциируют по окончании действия стресса (Gilks et al., 2004). Следует также отметить, что СГ, содержащие FUS, крайне нестабильны в культуре клеток, например, они быстро распадаются в присутствии ингибиторов трансляции. Было также замечено, что при наличии мутаций в FUS, приводящих к нарушению связывания РНК, стремительно агрегируют *in vivo* (Shelkovnikova et al., 2013a). Это дает возможность предположить, что секвестрация в СГ может защищать белки от патологической агрегации. Присутствие в патологических белковых включениях при FUS-протеинопатиях ряда белков, характерных для СГ (Dormann et al., 2010), также не противоречит подобному сценарию, так как при агрегации FUS в цитоплазме СГ также могут пассивно вовлекаться в этот процесс. В любом случае причины необратимой агрегации FUS в цитоплазме остаются до конца неясными, и поиск механизмов продолжается.

Наряду с прионоподобными доменами, богатыми аспарагином, глутамином и тирозином, многие РНК-связывающие белки, в том числе и FUS, содержат участки с большим количеством глицина. Эти участки, предположительно, способствуют образованию РНП-комплексов и участвуют в сплайсинге пре-мРНК, а также влияют на посттрансляционные модификации белков (Rogelj et al., 2012; Fiset et al., 2012; Kino et al., 2011). Учитывая, что большое количество глицина способствует поддержанию белка в развернутом виде, то соседние аминокислотные остатки определяют ту или иную его функцию. Так, например, в структуре FUS присутствуют домены, богатые глицином и аргинином (RGG), отвечающие за белок-белковые и белок-РНК взаимодействия. Эти процессы регулируются метелированием аргинина (Bedford, 2007). Также в составе FUS был выявлен участок, богатый глицином и серином, функция которого еще не установлена, однако предполагается, что фосфорилирование сериновых остатков в этом участке влияет на взаимодействие прионоподобных доменов между собой (Rogelj et al., 2012; Han et al., 2012).

Таким образом, при взаимодействии между различными макромолекулами может достигаться переход в жидкое промежуточное состояние, которое способствует росту микрокапли с образованием гелеобразной макроструктуры, и этот процесс может регулироваться метилированием и фосфорилированием (Li et al., 2012; Bedford, 2007). Можно предположить, что это состояние становится основой биогенеза РНП-гранул и представляет собой способ организации различных немембранных органелл как в цитоплазме, так и в ядре (Human, Simons, 2012). Вполне вероятно, что под воздействием определенных факторов данные немембранные структуры могут преобразоваться в патологические белковые агрегаты с замещением аморфной структуры амилоидной (Li et al., 2013). Возможно, что некоторые СГ становятся предшественниками патологических белковых включений при нейродегенеративных протеинопатиях именно по такому механизму. Во время стресса ряд РНК-связывающих белков способствуют организации СГ и депонированию в них мРНК с помощью способности их прионоподобных доменов к самоорганизации (Dormann et al., 2010). После окончания действия стресса СГ быстро распадаются и «освобожденная» мРНК возобновляет свои функции. Если же по каким-то причинам резидентное время подобных белков в СГ увеличивается, либо их кон-

центрация в СГ повышена, то распад СГ может затрудняться из-за прочных белок-белковых взаимодействий прионоподобных доменов между собой. Таким образом, может возникнуть «центр инициации агрегации», который дает начало патологической белковой агрегации (Bosco et al., 2010). Этот процесс можно описать как своего рода «стабилизацию» СГ с последующей их эволюцией по патологическому пути. На основании имеющихся данных можно говорить о существовании очень тонкой грани между физиологической и патологической агрегацией белков, при этом оба типа агрегации направляются прионоподобными доменами. Важной задачей на сегодня является установление факторов, способствующих «пересечению» этой границы и ведущих к запуску каскадного процесса неконтролируемой агрегации РНК-связывающих белков.

4. Роль РНК-связывающих белков в нейродегенеративных заболеваниях на примере БАС-FUS

Боковой амиотрофический склероз (БАС) является неизлечимым дегенеративным заболеванием центральной нервной системы, при котором происходит поражение двигательных нейронов спинного мозга и моторной коры головного мозга (Boillée et al., 2006). Как и в случае других нейродегенеративных заболеваний, развитие БАС сопровождается патологической агрегацией некоторых белков, в том числе и FUS (Kwiatkowski et al., 2009; Vance et al., 2009). Следует отметить, патологические включения FUS не обладают свойствами амилоида, однако с помощью электронно-микроскопических исследований и рентгеноструктурного анализа была выявлена амилоидная природа FUS фибрилл *in vitro* (Kato et al., 2012). Возможен вариант, когда накопленный в больших количествах FUS агрегирует в цитоплазме независимо от его способности к секвестрации в СГ. Накоплению белка может также способствовать дисфункция внутриклеточных систем деградации белка, которая часто сопровождает нейродегенеративные расстройства (Bossy-Wetzel et al., 2004). Следует отметить, что при спорадических случаях БАС наблюдается нарушение регуляции сплайсинга существенного числа генов (Rabin et al., 2010). Белок FUS регулирует в том числе и альтернативный сплайсинг, связываясь, как правило, с транскриптами, содержащими протяженные интроны. Таким образом, накопление FUS в цитоплазме может приводить к потере его функции в ядре и, соответственно, нарушению альтернативного сплайсинга ряда генов, например, кодирующих белки, связанные с ростом и развитием аксонов и цитоскелета клетки (Orozco, Edbauer, 2013).

Если учитывать возможную роль СГ как предшественников нерастворимых агрегатов FUS, а также физиологическую роль FUS в ядре, то можно предложить следующие механизмы развития БАС-FUS (рис. 2).

- Чрезмерное накопление FUS в СГ может приводить к нарушению их структуры и функции, в результате чего клеточная РНК не получает должной защиты в период стресса и разрушается (Bentmann et al., 2013; Li et al., 2013; Wolozin, 2012).
- Секвестрация FUS в СГ может защищать его от патологической агрегации,

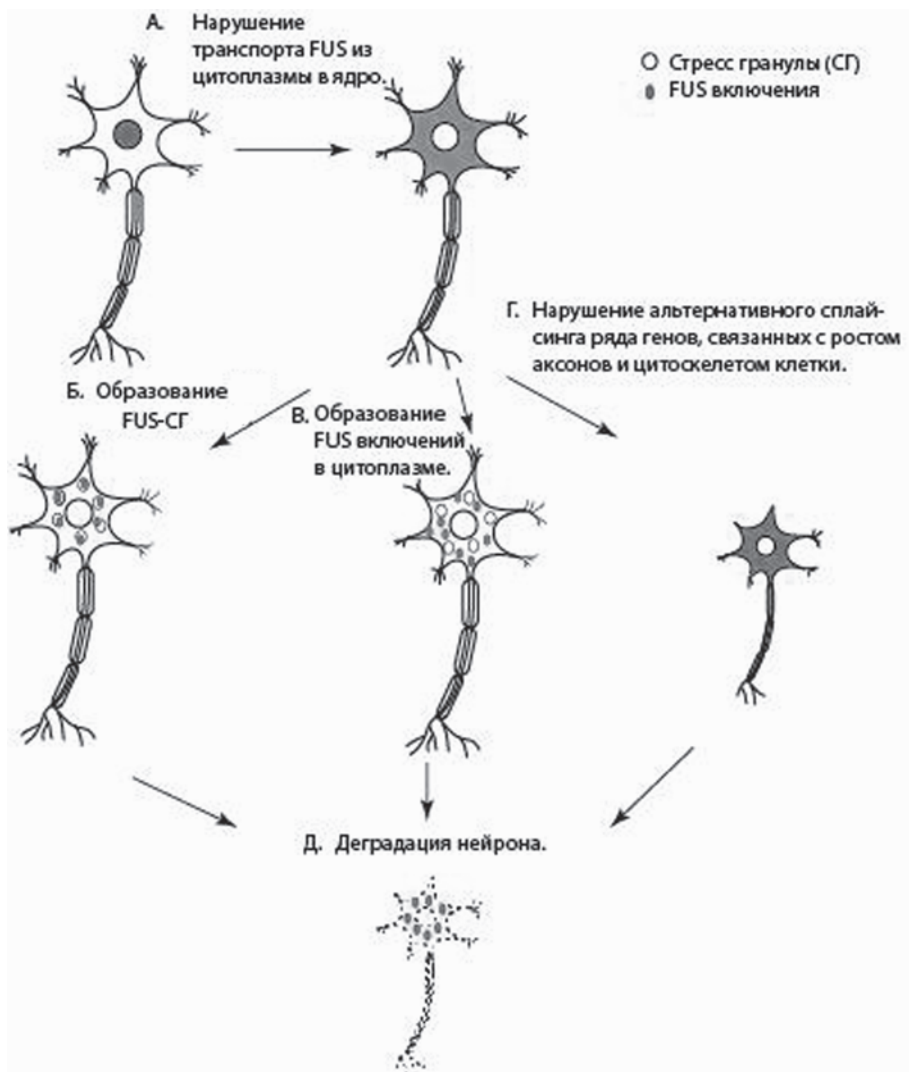


Рис. 2. Возможные механизмы развития FUS-протеинопатии

но количество белка, которое они могут связать, ограничено. В результате накопившиеся в цитоплазме FUS-молекулы необратимо агрегируют (Shelkovnikova et al., 2013a).

● Белок FUS играет важную роль в ядре, включая такие процессы, как сплайсинг пре-РНК, поддержание стабильности РНК, регуляция транскрипции. Соответственно снижение концентрации FUS в ядре может существенно сказаться на клеточных функциях и привести к гибели клетки (Orozco, Edbauer, 2013).

По-видимому, все указанные механизмы в той или иной степени вносят свой вклад в развитие дисфункции нервной системы при FUS-протеинопатиях.

5. Моделирование FUS-протеинопатий *in vitro* (клеточные культуры)

Основные данные по механизмам агрегации FUS были получены в результате исследований в культивируемых клетках, в том числе в дрожжах. Обычно для изучения агрегации и токсичности используют повышенную экспрессию того или иного гена – модели, основанные на его сверхэкспрессии (Powers et al., 2009).

В самых ранних работах для изучения способности к агрегации и токсичности белка FUS дрожжевые клетки трансформировали плазмидой для экспрессии FUS человека, слитого с желтым флуоресцентным белком (YFP). Чтобы избежать преждевременной гибели клеток дрожжей во время роста из-за возможной токсичности экзогенного FUS, для экспрессии FUS-YFP использовали галактоза-индуцируемый промотор. В отличие от клеток млекопитающих, в дрожжевых клетках нормальный белок FUS человека был большей частью сосредоточен в цитоплазме (Ju et al., 2011), что, возможно, связано с тем, что его NLS не узнается ядерными рецепторами дрожжей (Sun et al., 2011). В этих работах было показано, что повышенная концентрация FUS приводит к его агрегации в цитоплазме и токсична для дрожжевых клеток. При транслокации FUS в ядро, для достижения которой использовали FUS с NLS от SV40 (Goldfarb et al., 1986), уровень токсичности значительно снижался. Низкий уровень FUS, достигнутый с использованием слабого промотора, не был токсичен и не приводил к агрегации белка (Sun et al., 2011). Было также отмечено, что цитоплазматические агрегаты FUS-YFP в дрожжевых клетках были нестабильными, динамичными, напоминая Р-тельца и СГ. Под влиянием стресса FUS перераспределялся в Р-тельца и СГ. Более того, повышенная экспрессия FUS-YFP увеличивала частоту образования как Р-телец, так и СГ. Было показано, что для формирования агрегатов и токсичности FUS необходимы прионоподобный домен, РНК-связывающий мотив и домен RGG 2 (FUS1-422). При этом вариант, содержащий только прионоподобный домен и РНК-связывающий мотив (FUS1-371), не агрегировал и белок находился в ядре. При удалении N-конца токсичность не проявлялась, несмотря на то что белок накапливался в цитоплазме и агрегировал. Мутации в РНК-связывающем домене (Phe305, 341, 359, 368Leu) значительно уменьшали токсичность, при этом белок также агрегировал в цитоплазме.

И в дрожжевых клетках, и фибробластах домен RGG2 был необходим для агрегации в цитоплазме. Однако в клеточной культуре нейробластомы SH-SY5Y укороченный белок, FUS1-359, меченный GFP, агрегировал в цитоплазме (Shelkovnikova et al., 2013a). Белок FUS-YFP (50-526) также агрегировал в дрожжах и фибробластах, но образованные включения были меньше по размеру (Kino et al., 2011). FUS1-422 был токсичен *in vivo*, однако для проявления токсичности требовалась более высокая его концентрация по сравнению с полноразмерным белком. В обоих случаях образовавшиеся агрегаты варьировали от 15 до 20 нм в диаметре и по структуре напоминали патологические включения в пораженной нервной ткани больных БАС (Bäumler et al., 2010; Huang et al., 2010). Ассоциированные с БАС мутации в FUS не оказывали существенного влияния ни на формирование агрегатов, ни на их токсичность (Sun et al., 2011; Shelkovnikova et al., 2013a).

В ходе исследований *in vitro* с использованием очищенного рекомбинантного белка FUS было показано, что он обладает очень высокой агрегационной способностью. Выделение немеченного белка было трудно осуществимо из-за его быстрой агрегации, однако присутствие GST (глутатион-S-трансферазы) на N-конце повышало растворимость FUS и позволило получить очищенный белок, который был способен к связыванию РНК. При этом при отщеплении GST с помощью протеазы TEV белок быстро агрегировал без какой-либо дополнительной стимуляции, например перемешивания. Агрегация также зависела от концентрации белка. Полученные агрегаты не окрашивались амилоидными красителями и растворялись в присутствии SDS, в отличие от агрегатов дрожжевого белка Sup35, несущего прионоподобный домен. Таким образом, был сделан вывод, что агрегаты FUS имеют неамилоидную природу (Sun et al., 2011). Тем не менее, вопрос о природе агрегатов FUS до сих пор остается открытым, в том числе и потому, что точный механизм интеркаляции красителей конго красного и тиофлафина Т (ThT) неизвестен (Biancalana, Koide, 2010), а рентгеноструктурный анализ и электронная микроскопия показали, что FUS образует β -слои, подобно амилоидам (Kato et al., 2012).

Еще в одной серии экспериментов (Sun et al., 2011) попытались установить гены, способные модулировать токсичность FUS. В ходе скрининга в дрожжах было выявлено 10 генов, продукты которых повышали токсичность FUS, и 24 гена, продукты которых ее ослабляли, при этом все они были вовлечены в метаболизм РНК. Некоторые из этих генов имеют гомологи у человека, которые, возможно, могут также влиять на токсичность FUS у человека. Это подтвердилось на примере генов, кодирующих убиквитин-лигазу FBXW7 и фактор инициации трансляции EIF4A1 (гомологи дрожжей Cdc4 и Tif2, соответственно), которые супрессировали токсичность FUS и его мутантов R521C и R521H в культуре клеток млекопитающих HEK293T (Sun et al., 2011). Сходные результаты были получены на культуре клеток COS7 (Sun et al., 2011). Кроме того, в список супрессоров вошли гены, продукты которых вовлечены в формирование СГ у дрожжей, – это факторы инициации трансляции Tif2, Tif3 и Pab и дрожжевой аналог белка PABP-1 (polyA-binding protein 1) человека (Sun et al., 2011).

Несмотря на обширную информацию, полученную при анализе *in vitro* моделей, ряд вопросов по-прежнему оставался открытым, например, временные характеристики агрегации FUS, токсичность для разных типов клеток, в том числе и разных типов нейронов и т.д. Для ответа на эти вопросы необходимы были создание и характеристика *in vivo* моделей.

6. Моделирование FUS-протеинопатий *in vivo*

В настоящее время известно более 40 мутаций в гене FUS, ассоциированных с БАС, однако при ФТД-мутации в FUS встречаются крайне редко, при этом нормальный, немутированный, FUS агрегирует и образует патологические включения (Neumann et al., 2009). В связи с этим ряд моделей FUS-протеинопатий у животных был получен на основе повышенной экспрессии нормального белка FUS. Так как

БАС-ассоциированные мутации в NLS встречаются гораздо чаще, чем в других доменах FUS, то в большинстве исследований были использованы именно такие варианты, либо NLS был полностью удален. Модели FUS-протеинопатий были получены с использованием всех распространенных модельных организмов, включая дрозофилу, нематоду *Caenorhabditis elegans*, *Danio rerio*, мышь и крысу.

6.1. Моделирование у беспозвоночных и рыб

Для повышенной экспрессии гена *fus* и его мутантов у дрозофилы была использована дрожжевая бинарная система экспрессии Gal4/UAS (Brand et al., 1994). Этот метод заключается в том, что в геном дрозофилы интегрируется кассета, содержащая исследуемый ген, поставленный под дрожжевой промотор UAS (upstream activation sequence). Так как UAS не узнается факторами транскрипции дрозофилы, для активации экспрессии гена эта линия скрещивается с другой линией, несущей интегрированную кассету с дрожжевым фактором транскрипции Gal4. Для экспрессии генов в отдельных тканях использовались тканеспецифичные факторы транскрипции под контролем GAL4: для повсеместной экспрессии – *act5C-Gal4*, для экспрессии в эмбриональных нервных клетках – *Elav-Gal4*, в мотонейронах – *D42-Gal4*, в фоторецепторах глаза – *GMR-Gal4*. По этой же схеме активировалась экспрессия ортолога *fus* дрозофилы под названием *cabeza (caz)* (Stolow, Haynes, 1995). Несмотря на то что у дрозофилы белок Cabeza синтезируется в большом количестве в мозге во время эмбриогенеза, использование бинарной Gal4/UAS-системы позволяет поддерживать экспрессию гена на определенном уровне. Кроме этого, был использован генетический нокдаун *caz* с помощью РНК-интерференции.

В ряде работ было показано, что повышенная повсеместная экспрессия FUS/CAZ, в том числе и мутантного FUS, токсична и вызывает прогрессирующую дисфункцию в разных тканях, приводя к моторным нарушениям как у личинок, так и у взрослых особей, апоптозу и снижению продолжительности жизни (Chen et al., 2011; Wang et al., 2011; Xia et al., 2012). Тем не менее, в ряде исследований экспрессия нормального FUS не оказывала особого влияния на фенотип мух (Lanson et al., 2011). Необходимо отметить, что при тканеспецифичной экспрессии токсичность FUS существенно зависела от типа клеток. Так, в одной из работ мутации FUS R518K, R521H и R521C приводили к нарушению организации омматидий при экспрессии в фоторецепторах глаза, а также летальности на стадии куколки при экспрессии в нейронах (Lanson et al., 2011). В другом исследовании повышенная экспрессия нормального FUS, FUS R521G и CAZ также приводила к повреждениям омматидия, которые прогрессировали с возрастом, а при нейрональной экспрессии значительно нарушалась подвижность личинок и взрослых особей, усиливался апоптоз в мотонейронах, сокращалась продолжительность жизни. Летальность на стадии куколки наблюдалась только при повышенной экспрессии гена *caz* (Xia et al., 2012; Miguel et al., 2012). Результаты по нокдауну CAZ с помощью РНК-интерференции также весьма противоречивы. В работе (Lanson et al., 2011) он не оказал влияния на двигательную активность мух, в то время как в работе (Xia et al., 2012)

при делеции гена *caz* нарушалось формирование омматидий, уменьшалась подвижность как личинок, так и взрослых особей, нарушались связи между нейронами, сокращалась продолжительность жизни. Следовательно, белок CAZ необходим для нормального формирования глаз и функционирования мотонейронов, по крайней мере у дрозофилы (Xia et al., 2012).

Совершенно неожиданные результаты получены в работе (Xia et al., 2012) относительно цитоплазматической токсичности FUS. Возможно, это связано с тем, что в данной работе были использованы специфические для дрозофилы NES и NLS, что не было учтено в других экспериментах. В данной работе при нарушении локализации FUS в ядре из-за мутации FUSY526F наблюдалось подавление токсичности. Следует отметить, что тирозин Y526 на С-конце подвергается фосфорилированию тирозинкиназой и присутствует как в FUS, так и в CAZ. При удалении NLS в комбинации с RGG3-доменом (FUS1-453) токсичность FUS полностью подавлялась и особи сохраняли жизнеспособность. Противоположные результаты получили в работе (Lanson et al., 2011), где было отмечено уменьшение токсичности при накоплении FUS в ядре. Возможно, это было также связано с тем, что у белка был удален NES, который расположен внутри РНК-связывающего мотива, что могло нарушить взаимодействие с РНК и таким образом уменьшить токсичность (Xia et al., 2012; Lanson et al., 2011). Р. Хи с сотрудниками (Xia et al., 2012) показали, что при полном удалении NLS белок накапливался в цитоплазме, что привело к незначительному снижению подвижности трансгенных животных, при этом выживаемость особей была соизмерима с таковой для дикого типа, а фенотип глаз практически не отличался от дикого типа.

В работе (Miguel et al., 2012) у *Drosophila* было показано, что растворимость полноразмерного немутированного белка FUS человека зависит от типа клеток, где происходит его экспрессия. Так, например, в клетках сетчатки глаза белок в основном присутствовал в растворимой форме, при этом наблюдалось незначительное изменение фенотипа глаза. В то же время, при повышенной экспрессии в нейронах существенная фракция FUS образовывала нерастворимые формы на фоне отсутствия FUS-позитивных включений в цитоплазме, при этом сильно сокращалась продолжительность жизни дрозофил. Нейротоксичность в значительной степени ослабляется шаперонами за счет увеличения содержания растворимого белка FUS. Р. Хи с коллегами не удалось достичь агрегации и образования включений для мутанта FUS R522G и белка FUS дикого типа у дрозофилы, тогда как в работе (Lanson et al., 2011) упоминались убиквитин-позитивные включения у трансгенных мух, экспрессирующих FUS человека.

У нематод *Caenorhabditis elegans* трансгенные животные были получены с помощью микроинъекций вектора, в котором FUS был поставлен под контроль промоторов везикулярного ГАМК-транспортера (*unc-47*) или пан-нейрональных генов (*unc-119*, *Ptgef-1* и др.).

Для исследования механизма токсичности в мотонейронах А. Ваккаро и др. использовали трансгенных *C. elegans*, у которых экспрессия гена FUS и мутанта FUS S57del осуществлялась под контролем промотора *unc-47*. Мутация FUS S57del была обнаружена у больных при спорадической форме БАС (Belzil et al., 2009). Се-

рин, удаленный при данной мутации, является потенциальным сайтом фосфорилирования и находится в пределах прионоподобного домена (Belzil et al., 2009; Alberti et al., 2009). Двигательные нарушения у трансгенных нематод наблюдались только по достижении ими половозрелого возраста, дегенерация мотонейронов нарастала с возрастом, при этом при экспрессии FUS S57del мутантов паралич наступал намного быстрее, без видимого эффекта на продолжительность жизни, которая была соизмерима с нетрансгенными животными (Vaccaro et al., 2012). Более того, FUS S57del был способен образовывать нерастворимые агрегаты, в то время как немутированный FUS не появлялся в нерастворимой фракции. Тем не менее, в последующих работах на трансгенной модели *Danio rerio* патогенность мутации S57del была поставлена под сомнение, что, возможно, связано с введением мРНК FUS у последних на стадии эмбриона (Kabashi et al., 2011; Vaccaro et al., 2012).

Т. Мураками с коллегами создали ряд моделей у *C. elegans* с использованием FUS дикого типа и мутантных вариантов R514G, R521G, R522G, R524S и P525L, а также укороченных форм FUS1-513 и FUS1-501, под контролем пан-нейронального промотора *Prgef*. FUS был также помечен GFP. В этих условиях FUS дикого типа и варианты R514G и R521G накапливались в ядре, FUS R522G был диффузно распределен в ядре и цитоплазме, и все остальные варианты присутствовали главным образом в цитоплазме. При этом при экспрессии FUS с мутациями R514G и R521G, которые у человека ассоциированы с менее агрессивным течением заболевания (Kwiatkowski et al., 2009), нематоды фенотипически не отличались от особей, экспрессирующих нормальный FUS. Мутация P525L и удаление NLS (FUS1-513 и FUS1-501) приводили к более быстрой прогрессии моторных нарушений и более ранней летальности по сравнению с нормальным FUS. Также у этих особей с возрастом образовывались FUS-позитивные гранулы, и их образование ускорялось при действии стресса. Более того, после окончания действия стресса наступала прогрессирующая моторная дисфункция, чего не наблюдалось для особей, экспрессирующих FUS WT, FUS R514G и FUS R521G, которые быстро восстанавливались после теплового шока.

Для исследования возможной потери ядерной функции при делокализации FUS в цитоплазму Т. Мураками с сотрудниками создали «двойных» трансгенных животных. Нормальный FUS и FUS P525L, меченые разными флуорохромами, ко-экспрессировались в одном животном. Однако токсический эффект FUS P525L не ослаблялся в присутствии нормального белка, на основании чего был сделан вывод, что накопление и агрегация FUS в цитоплазме являюся более нейротоксическими, чем его отсутствие в ядре (Murakami et al., 2012).

Суммируя вышесказанное, даже с учетом различия в методологических подходах и, следовательно, некоторого расхождения в результатах и их интерпретации, повышенная экспрессия FUS человека и его мутантов, ассоциированных с БАС, как правило, токсична, приводит к сокращению продолжительности жизни, моторным нарушениям, повреждению аксонов и гибели клеток. В разных видах беспозвоночных уменьшение растворимости при повышенной экспрессии белка наблюдалось во всех случаях. Тот факт, что у беспозвоночных было достаточно легко достичь агрегации FUS, может быть связан с эффектом «окружения». Как уже упоминалось

ранее, FUS может быть защищен от агрегации в цитоплазме за счет включения в СГ и прочие РНП-комплексы, в то время как потеря способности связывать РНК и, следовательно, входить в состав подобных комплексов способствуют агрегации. Учитывая, что FUS человека экспрессировался в отдаленных организмах, таких как дрозофила, можно предположить, что доступный пул предполагаемых белков-партнеров по РНП-комплексам мог быть ограничен, что способствовало агрегации «свободных», не включенных в комплексы молекул FUS. Можно сделать вывод, что образование включений не является необходимыми для проявления нейротоксичности. Таким образом, описанные выше модели позволили подтвердить нейротоксичность олигомеров FUS, однако для дальнейшего понимания механизмов нейротоксичности необходимо было моделирование у более высокоорганизованных, долгоживущих животных.

6.2. Моделирование у млекопитающих

Первая трансгенная модель у млекопитающих на основе сверхэкспрессии FUS была получена на крысах (Huang et al., 2011). Чтобы избежать возможной токсичности FUS во время эмбрионального развития, был использован доксициклин-зависимый промотор. Трансгенным самкам на период беременности и кормления добавляли в воду доксициклин, который подавлял активность промотора и, соответственно, экспрессию FUS. Несмотря на накопление белка FUS в спинном и головном мозге трансгенных крыс FUS-позитивных включений обнаружено не было. Тем не менее, у крыс, экспрессирующих FUS R521C, были идентифицированы убиквитин-позитивные/FUS-негативные включения в нейронах коры и в спинном мозге. Как правило, крысы линии R521C умирали рано, в возрасте 2–3 месяцев, от паралича, тогда как у трансгенных крыс, экспрессирующих немутированный FUS, в возрасте 1 год моторная функция оставалась нормальной. У последних, однако, была зарегистрирована гибель нейронов в лобной коре и некоторых других участках мозга, а также нарушение памяти и способности ориентироваться в пространстве. Эти данные позволили предположить, что сверхэкспрессия как белка FUS дикого типа, так и его мутанта приводит к нейродегенерации. Тем не менее, мутантный белок FUS R521C более токсичен для нейронов. Для белка FUS дикого типа требовалось больше времени для накопления в цитоплазме на уровне, достаточном для проявления токсичности и для образования включений (Huang et al., 2011).

Первая мышьяная модель с повышенной экспрессией FUS и его мутантов была создана с помощью двухстороннего введения в мозг новорожденным мышам аденовирусного вектора (rAAV). В качестве мутантных вариантов использовались R521C и FUS1-478 (Verbeeck et al., 2012), обе мутации ассоциированы с БАС. При мутации (g.10747A>G; IVS13-2A>G) нарушается сплайсинг и удаляется экзон 14, что приводит к образованию изоформы FUS1-478 с удаленным NLS и частью домена RGG3. Данная мутация была обнаружена при ранней форме заболевания, с дебютом в 20 лет и продолжительностью жизни после дебюта 22 месяца (DeJesus-Hernandez et al., 2010; Verbeeck et al., 2012). Забор тканей для анализа производили через три ме-

сяца после инъекции gAAV. Экспрессия FUS1-478 у мышей также способствовала накоплению белка в цитоплазме и образованию нерастворимых включений FUS, также положительно окрашивающихся на убиквитин, p62, интернексин- α и PABP-1. Авторы работы сделали вывод, что повышенная концентрация FUS в цитоплазме может влиять на метаболизм РНК, способствуя, например, вовлечению других РНК-связывающих белков, таких как TAF15 и PABP-1, в агрегацию (Verbeeck et al., 2012). Для сравнения, при экспрессии FUS дикого типа и мутантной формы FUS R521C патологические включения не образовывались, возможно, это связано с более медленным накоплением белка в цитоплазме.

Трансгенная мышинная модель на основе сверхэкспрессии FUS под контролем PrP промотора была получена и охарактеризована в работе (Mitchell et al., 2013). Гемизиготные hFUS+/- трансгенные животные были нормальными, в том числе у них не было зарегистрировано уменьшения продолжительности жизни. При этом гомозиготные животные hFUS+/+ развивали выраженный моторный фенотип и имели сниженную продолжительность жизни. Суммарная экспрессия FUS (человеческого и мышинного) в нервной системе гемизиготных мышей была в 1,7 раза выше по сравнению с эндогенным FUS у мышей дикого типа, и в нервной системе гомозиготных особей – в 2,0 раза выше, чем у гетерозиготных животных, указывая на регуляцию экспрессии FUS по принципу отрицательной обратной связи. В гомозиготных животных hFUS+/+ FUS агрегировал, формируя кольцеподобные околоядерные убиквитин-негативные включения в нейронах головного и спинного мозга. Агрегацию FUS в гомозиготных животных и отсутствие патологии у гемизиготных животных можно объяснить диспропорциональным увеличением содержания белка FUS в цитоплазме у гомозигот, так как для агрегации (и токсического воздействия), по-видимому, необходима определенная пороговая концентрация белка. Если вернуться к гипотезе, что белки/РНК, в норме взаимодействующие с FUS, могут препятствовать его агрегации, то пороговая концентрация может достигаться при «истощении» данных молекул и приводить к агрегации «свободного» FUS.

Согласно данным, полученным с использованием различных моделей у беспозвоночных и млекопитающих, нарушения цитоплазматических функций FUS, в том числе и в отсутствие видимых белковых включений, достаточно, чтобы вызвать патологию и фенотипические проявления токсичности. Тем не менее, в этих моделях невозможно отделить негативный эффект функционального, но делокализованного FUS от непосредственного влияния его агрегированных форм. Чтобы ответить на этот вопрос, была создана трансгенная мышинная модель на основе укороченной формы белка FUS человека, FUS1-359, в которой отсутствовали домены, участвующие в связывании РНК – RGG2, RGG3 и «цинковый палец». У гемизиготных животных, экспрессирующих FUS1-359 в нервной системе под контролем Thy1 промотора, уровень белка FUS1-359 был существенно ниже, чем эндогенного FUS. Тем не менее, этого уровня экспрессии было достаточно для развития БАС-подобного фенотипа. Животные достигали терминальной стадии заболевания (паралич конечностей, неспособность передвигаться) в возрасте 3–4 месяцев, при этом у них наблюдалась избирательная гибель мотонейронов ядер ствола головного мозга, денервация и атрофия мышц и повреждение нервов. Более того, у животных разви-

валась FUS-протеинопатия с многочисленными FUS-позитивными/убиквитин-негативными и FUS/убиквитин-позитивными включениями в пораженных участках нервной системы, главным образом в мотонейронах. Эта работа позволила заключить, что агрегация FUS как таковая, без прямого воздействия на метаболизм РНК, может стать причиной патологии, типичной для FUS-протеинопатий у человека (Shelkovnikova et al., 2013б).

В ходе работ при поддержке программы «ФНМ» были получены обширные данные по механизмам физиологической и патологической агрегации белка FUS и его роли в СГ. Наряду с другими исследовательскими группами было описано цитоплазматическое перераспределение мутированных форм FUS и зависимость возраста дебюта заболевания от степени делекации белка. Последующие исследования укороченных, с делециями в С-концевом участке белка, форм FUS указали на повышение агрегационных свойств белка при прогрессивном нарушении способности к связыванию РНК. Дальнейшая работа в этом направлении позволила установить, что изменение агрегационных свойств связано со снижением способности FUS к секвестрации в стресс-гранулы (Shelkovnikova et al., 2013а). Известно, что FUS-протеинопатии плохо поддаются моделированию *in vivo* – агрегации белка в нервной системе животных очень трудно достичь (Shelkovnikova, 2013), поэтому мы предположили, что использование формы с нарушенным РНК-связыванием, которая быстро агрегирует в клеточных культурах, позволит эффективно воспроизвести FUS-протеинопатию у млекопитающих. В сотрудничестве с Институтом биологии гена РАН и Кардиффским университетом была создана трансгенная мышьяная модель на основе нейроспецифической экспрессии FUS с нарушенным РНК-связыванием (Shelkovnikova et al., 2013б), которая подтвердила ведущую роль агрегации FUS и образующихся белковых включений в развитии FUS-протеинопатии. Исследования роли FUS в различных **НУГ-комплексах** позволили установить, что FUS является важным компонентом ядерных параспеклов (англ. paraspeckles) – функция белка, нарушаемая мутациями, ассоциированными с БАС (Shelkovnikova et al., 2014а). **Последующие исследования цитоплазматических агрегатов мутантного белка FUS** позволили установить ряд важных отличий от СГ и выдвинуть гипотезу о механизмах образования патологических агрегатов при FUS-протеинопатиях (Shelkovnikova et al., 2014б).

7. Заключение

Значительный прогресс в понимании механизмов развития FUS-протеинопатий был достигнут благодаря исследованиям на трансгенных животных моделях. Тем не менее, остается ряд открытых вопросов, прежде всего касающихся молекулярных механизмов перехода нативной конформации FUS в различных РНП-комплексах в патологическую. Необходимы дальнейшие детальные исследования на имеющихся *in vivo* моделях наряду с созданием новых моделей. Необходимо выполнение сравнительных исследований влияния различных мутаций в одной и той же животной модели, например, сравнение фенотипа животного, экспрессирующего

FUS с мутацией в NLS с таковым животного, экспрессирующего FUS с мутацией в прионоподобном домене. Также необходимо провести систематический анализ белков, входящих в состав патологических агрегатов при FUS-протеинопатиях. Белок FUS является во многих аспектах прекрасной моделью для изучения процессов, вовлеченных в конформационные переходы с участием прионоподобных доменов и образование белковых РНП-комплексов в норме и при патологии. Без сомнения, дальнейшее исследование данного белка внесет вклад в наше понимание механизмов развития различных протеинопатий.

Литература

- Alberti S., Halfmann R., King O. et al.* A systematic survey identifies prions and illuminates sequence features of prionogenic proteins // *Cell*. 2009. Vol. 137. № 1. P. 146-158.
- Anderson P., Kedersha N.* RNA granules // *J. Cell. Biol.* 2006. Vol. 172. № 6. P. 803-808.
- Anderson P., Kedersha N.* Stress granules: the Tao of RNA triage // *Trends Biochem. Sci.* 2008. Vol. 33. № 3. P. 141-150.
- Andersson M.K., Stahlberg A., Arvidsson Y, et al.* The multifunctional FUS, EWS and TAF15 proto-oncoproteins show cell type-specific expression patterns and involvement in cell spreading and stress response // *BMC Cell. Biol.* 2008. Vol. 9. P. 37.
- Bailey C.H., Kandel E.R., Si K.* The persistence of long-term memory: a molecular approach to self-sustaining changes in learning-induced synaptic growth // *Neuron*. 2004. Vol. 44. № 1. P. 49-57.
- Baumer D., Hilton D., Paine S.M. et al.* Juvenile ALS with basophilic inclusions is a FUS proteinopathy with FUS mutations // *Neurol.* 2010. Vol. 75. № 7. P. 611-6118.
- Bedford M.T.* Arginine methylation at a glance // *J. Cell. Sci.* 2007. Vol. 120. Pt. 24. P. 4243-4246.
- Belzil V.V., Valdmanis P.N., Dion P.A. et al.* Mutations in FUS cause FALS and SALS in French and French Canadian populations // *Neurology*. 2009. Vol. 73. № 15. P. 1176-1179.
- Bentmann E., Neumann M., Tahirovic S. et al.* Requirements for stress granule recruitment of fused in sarcoma (FUS) and TAR DNA-binding protein of 43 kDa (TDP-43) // *J. Biol. Chem.* 2012. Vol. 287. № 27. P. 23079-23094.
- Bentmann E., Haass C., Dormann D.* Stress granules in neurodegeneration--lessons learnt from TAR DNA binding protein of 43 kDa and fused in sarcoma // *FEBS J.* 2013. Vol. 280. № 18. P. 4348-4370.
- Biancalana M., Koide S.* Molecular mechanism of Thioflavin-T binding to amyloid fibrils // *Biochim. Biophys. Acta.* 2010. Vol. 1804. № 7. P. 1405-1412.
- Boillee S., Vande Velde C., Cleveland D.W.* ALS: a disease of motor neurons and their nonneuronal neighbors // *Neuron*. 2006. Vol. 52. № 1. P. 39-59.
- Bosco D.A., Lemay N., Ko H.K. et al.* Mutant FUS proteins that cause amyotrophic lateral sclerosis incorporate into stress granules // *Hum. Mol. Genet.* 2010. Vol. 19. № 21. P. 4160-4175.
- Bossy-Wetzell E., Schwarzenbacher R., Lipton S.A.* Molecular pathways to neurodegeneration // *Nat. Med.* 2004. Vol. 10. P. S2-9.
- Brand A.H., Manoukian A.S., Perrimon N.* Ectopic expression in *Drosophila* // *Methods Cell. Biol.* 1994. Vol. 44. P. 635-654.
- Chai Y., Koppenhafer S.L., Bonini N.M., Paulson H.L.* Analysis of the role of heat shock protein (Hsp) molecular chaperones in polyglutamine disease // *J. Neurosci.* 1999. Vol. 19. № 23. P. 10338-10347.
- Chen Y., Yang M., Deng J. et al.* Expression of human FUS protein in *Drosophila* leads to progressive neurodegeneration // *Protein Cell.* 2011. Vol. 2. № 6. P. 477-486.
- Couthouis J., Hart M.P., Shorter J. et al.* A yeast functional screen predicts new candidate ALS disease genes // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2011. Vol. 108. № 52. P. 20881-20890.
- Crozat A., Aman P., Mandahl N., Ron D.* Fusion of CHOP to a novel RNA-binding protein in human myxoid liposarcoma // *Nature.* 1993. Vol. 363. № 6430. P. 640-644.
- DeJesus-Hernandez M., Kocerha J., Finch N. et al.* De novo truncating FUS gene mutation as a cause of sporadic amyotrophic lateral sclerosis // *Hum. Mutat.* 2010. Vol. 31. № 5. P. E1377-1389.

- Doi H., Koyano S., Suzuki Y. et al. The RNA-binding protein FUS/TLS is a common aggregate-interacting protein in polyglutamine diseases // *Neurosci. Res.* 2010. Vol. 66. № 1. P. 131-133.
- Dormann D., Haass C. Fused in sarcoma (FUS): an oncogene goes awry in neurodegeneration // *Mol. Cell. Neurosci.* 2013. Vol. 56. P. 475-486.
- Dormann D., Rodde R., Edbauer D. et al. ALS-associated fused in sarcoma (FUS) mutations disrupt Transportin-mediated nuclear import // *EMBO J.* 2010. Vol. 29. № 16. P. 2841-2857.
- Fisette J.F., Montagna D.R., Mihailescu M.R., Wolfe M.S. A G-rich element forms a G-quadruplex and regulates BACE1 mRNA alternative splicing // *J. Neurochem.* 2012. Vol. 121. № 5. P. 763-773.
- Fujii R., Okabe S., Urushido T. et al. The RNA binding protein TLS is translocated to dendritic spines by mGluR5 activation and regulates spine morphology // *Curr. Biol.* 2005. Vol. 15. № 6. P. 587-593.
- Gal J., Zhang J., Kwinter D.M. et al. Nuclear localization sequence of FUS and induction of stress granules by ALS mutants // *Neurobiol. Aging.* 2011. Vol. 32. № 12. P. 2323 e27-40.
- Gendoo D.M., Harrison P.M. Origins and evolution of the HET-s prion-forming protein: searching for other amyloid-forming solenoids // *PLoS One.* 2011. Vol. 6. № 11. P. e27342.
- Gilks N., Kedersha N., Ayodele M. et al. Stress granule assembly is mediated by prion-like aggregation of TIA-1 // *Mol. Biol. Cell.* 2004. Vol. 15. № 12. P. 5383-5398.
- Goldfarb D.S., Garipey J., Schoolnik G., Kornberg R.D. Synthetic peptides as nuclear localization signals // *Nature.* 1986. Vol. 322. № 6080. P. 641-644.
- Halfmann R., Alberti S., Lindquist S. Prions, protein homeostasis, and phenotypic diversity // *Trends Cell. Biol.* 2010. Vol. 20. № 3. P. 125-133.
- Halfmann R., Alberti S., Krishnan R. et al. Opposing effects of glutamine and asparagine govern prion formation by intrinsically disordered proteins // *Mol. Cell.* 2011. Vol. 43. № 1. P. 72-84.
- Han T.W., Kato M., Xie S., et al. Cell-free formation of RNA granules: bound RNAs identify features and components of cellular assemblies // *Cell.* 2012. Vol. 149. № 4. P. 768-779.
- Hou F., Sun L., Zheng H. et al. MAVS forms functional prion-like aggregates to activate and propagate antiviral innate immune response // *Cell.* 2011. Vol. 146. № 3. P. 448-461.
- Huang E.J., Zhang J., Geser F. et al. Extensive FUS-immunoreactive pathology in juvenile amyotrophic lateral sclerosis with basophilic inclusions // *Brain. Pathol.* 2010. Vol. 20. № 6. P. 1069-1076.
- Huang C., Zhou H., Tong J. et al. FUS transgenic rats develop the phenotypes of amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal lobar degeneration // *PLoS Genet.* 2011. Vol. 7. № 3. P. e1002011.
- Hyman A.A., Simons K. Cell biology. Beyond oil and water--phase transitions in cells // *Science.* 2012. Vol. 337. № 6098. P. 1047-1049.
- Iko Y., Kodama T.S., Kasai N. et al. Domain architectures and characterization of an RNA-binding protein, TLS // *J. Biol. Chem.* 2004. Vol. 279. № 43. P. 44834-44840.
- Ishigaki S., Masuda A., Fujioka Y. et al. Position-dependent FUS-RNA interactions regulate alternative splicing events and transcriptions // *Sci. Rep.* 2012. Vol. 2. P. 529.
- Ito D., Seki M., Tsunoda Y., Uchiyama H., Suzuki N. Nuclear transport impairment of amyotrophic lateral sclerosis-linked mutations in FUS/TLS // *Ann. Neurol.* 2011. Vol. 69. № 1. P. 152-162.
- Ju S., Tardiff D.F., Han H. et al. A yeast model of FUS/TLS-dependent cytotoxicity // *PLoS Biol.* 2011. Vol. 9. № 4. P. e1001052.
- Kabashi E., Bercier V., Lissouba A., et al. FUS and TARDBP but not SOD1 interact in genetic models of amyotrophic lateral sclerosis // *PLoS Genet.* 2011. Vol. 7. № 8. P. e1002214.
- Kaiser T.E., Intine R.V., Dundr M. De novo formation of a subnuclear body // *Science.* 2008. Vol. 322. № 5908. P. 1713-1717.
- Kato M., Han T.W., Xie S. et al. Cell-free formation of RNA granules: low complexity sequence domains form dynamic fibers within hydrogels // *Cell.* 2012. Vol. 149. № 4. P. 753-767.
- Kedersha N., Anderson P. Mammalian stress granules and processing bodies // *Methods Enzymol.* 2007. Vol. 431. P. 61-81.
- Kedersha N.L., Gupta M., Li W. et al. RNA-binding proteins TIA-1 and TIAR link the phosphorylation of eIF-2 alpha to the assembly of mammalian stress granules // *J. Cell. Biol.* 1999. Vol. 147. № 7. P. 1431-1442.
- Kedersha N., Cho M.R., Li W. et al. Dynamic shuttling of TIA-1 accompanies the recruitment of mRNA to mammalian stress granules // *J. Cell. Biol.* 2000. Vol. 151. № 6. P. 1257-1268.

- Kedersha N., Stoecklin G., Ayodele M. et al.* Stress granules and processing bodies are dynamically linked sites of mRNP remodeling // *J. Cell. Biol.* 2005. Vol. 169. № 6. P. 871-884.
- King O.D., Gitler A.D., Shorter J.* The tip of the iceberg: RNA-binding proteins with prion-like domains in neurodegenerative disease // *Brain Res.* 2012. Vol. 1462. P. 61-80.
- Kino Y., Washizu C., Aquilanti E. et al.* Intracellular localization and splicing regulation of FUS/TLS are variably affected by amyotrophic lateral sclerosis-linked mutations // *Nucleic. Acids. Res.* 2011. Vol. 39. № 7. P. 2781-2798.
- Klionsky D.J., Emr S.D.* Autophagy as a regulated pathway of cellular degradation // *Science.* 2000. Vol. 290. № 5497. P. 1717-1721.
- Korolchuk V.I., Menzies F.M., Rubinsztein D.C.* Mechanisms of cross-talk between the ubiquitin-proteasome and autophagy-lysosome systems // *FEBS Lett.* 2010. Vol. 584. № 7. P. 1393-1398.
- Kwiatkowski T.J.Jr., Bosco D.A., Leclerc A.L. et al.* Mutations in the FUS/TLS gene on chromosome 16 cause familial amyotrophic lateral sclerosis // *Science.* 2009. Vol. 323. № 5918. P. 1205-1208.
- Lanson N.A.Jr., Maltare A., King H. et al.* A Drosophila model of FUS-related neurodegeneration reveals genetic interaction between FUS and TDP-43 // *Hum. Mol. Genet.* 2011. Vol. 20. № 13. P. 2510-2523.
- Lee B.-J., Cansizoglu A.E., Suel K.E. et al.* Rules for nuclear localization sequence recognition by karyopherin beta 2 // *Cell.* 2006. Vol. 126. № 3. P. 543-558.
- Lehman N.L.* The ubiquitin proteasome system in neuropathology // *Acta. Neuropathol.* 2009. Vol. 118. № 3. P. 329-347.
- Lerga A., Hallier M., Delva L. et al.* Identification of an RNA binding specificity for the potential splicing factor TLS // *J. Biol. Chem.* 2001. Vol. 276. № 9. P. 6807-6816.
- Li P., Banjade S., Cheng H.C. et al.* Phase transitions in the assembly of multivalent signalling proteins // *Nature.* 2012. Vol. 483. № 7389. P. 336-40.
- Li Y.R., King O.D., Shorter J., Gitler A.D.* Stress granules as crucibles of ALS pathogenesis // *J. Cell. Biol.* 2013. Vol. 201. № 3. P. 361-372.
- Lindquist S.* Regulation of protein synthesis during heat shock // *Nature.* 1981. Vol. 293. № 5830. P. 311-314.
- Liu-Yesucevitz L., Bassell G.J., Gitler A.D. et al.* Local RNA translation at the synapse and in disease // *J. Neurosci.* 2011. Vol. 31. № 45. P. 16086-16093.
- Miguel L., Avequin T., Delarue M. et al.* Accumulation of insoluble forms of FUS protein correlates with toxicity in Drosophila // *Neurobiol. Aging.* 2012. Vol. 33. № 5. P. 1008-e1-15.
- Mitchell J.C., McGoldrick P., Vance C. et al.* Overexpression of human wild-type FUS causes progressive motor neuron degeneration in an age- and dose-dependent fashion // *Acta. Neuropathol.* 2013. Vol. 125. № 2. P. 273-288.
- Morimoto R.I.* The heat shock response: systems biology of proteotoxic stress in aging and disease // *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 2011. Vol. 76. P. 91-99.
- Morohoshi F., Ootsuka Y., Arai K. et al.* Genomic structure of the human RBP56/hTAFII68 and FUS/TLS genes // *Gene.* 1998. Vol. 221. № 2. P. 191-198.
- Murakami T., Yang S.P., Xie L. et al.* ALS mutations in FUS cause neuronal dysfunction and death in *Caenorhabditis elegans* by a dominant gain-of-function mechanism // *Hum. Mol. Genet.* 2012. Vol. 21. № 1. P. 1-9.
- Neumann M., Rademakers R., Roeber S. et al.* A new subtype of frontotemporal lobar degeneration with FUS pathology // *Brain.* 2009. Vol. 132. Pt. 11. P. 2922-2931.
- Niu C., Zhang J., Gao F. et al.* FUS-NLS/Transportin 1 complex structure provides insights into the nuclear targeting mechanism of FUS and the implications in ALS // *PLoS One.* 2012. Vol. 7. № 10. P. e47056.
- Orozco D., Edbauer D.* FUS-mediated alternative splicing in the nervous system: consequences for ALS and FTLN // *J. Mol. Med. (Berl).* 2013. Vol. 91. № 12. P. 1343-54.
- Parker R., Sheth U.* P bodies and the control of mRNA translation and degradation // *Mol. Cell.* 2007. Vol. 25. № 5. P. 635-646.
- Powers E.T., Morimoto R.I., Dillin A. et al.* Biological and chemical approaches to diseases of proteostasis deficiency // *Annu. Rev. Biochem.* 2009. Vol. 78. P. 959-991.
- Rabin S.J., Kim J.M., Baughn M. et al.* Sporadic ALS has compartment-specific aberrant exon splicing and altered cell-matrix adhesion biology // *Hum. Mol. Genet.* 2010. Vol. 19. № 2. P. 313-328.
- Rogelj B., Easton L.E., Bogu G.K. et al.* Widespread binding of FUS along nascent RNA regulates alternative splicing in the brain // *Sci. Rep.* 2012. Vol. 2. P. 603.

- Shelkovnikova T.A.* Modelling FUSopathies: focus on protein aggregation // *Biochem. Soc. Trans.* 2013. Vol. 41. № 6. P. 1613-1617.
- Shelkovnikova T.A., Peters O.M., Deykin A.V. et al.* Fused in sarcoma (FUS) protein lacking nuclear localization signal (NLS) and major RNA binding motifs triggers proteinopathy and severe motor phenotype in transgenic mice // *J. Biol. Chem.* 2013a. Vol. 288. № 35. P. 25266-25274.
- Shelkovnikova T.A., Robinson H.K., Connor-Robson N., Buchman V.L.* Recruitment into stress granules prevents irreversible aggregation of FUS protein mislocalized to the cytoplasm // *Cell. Cycle.* 2013b. Vol. 12. № 19. P. 3194-3202.
- Shelkovnikova T.A., Robinson H.K., Southcombe J.A. et al.* Multistep process of FUS aggregation in the cell cytoplasm involves RNA-dependent and RNA-independent mechanisms // *Hum. Mol. Genet.* 2014a.10.1093/hmg/ddu243.
- Shelkovnikova T.A., Robinson H.K., Troakes C. et al.* Compromised paraspeckle formation as a pathogenic factor in FUSopathies // *Hum. Mol. Genet.* 2014b. Vol. 23. № 9. P. 2298-2312.
- Shevtsov S.P., Dundr M.* Nucleation of nuclear bodies by RNA // *Nat. Cell. Biol.* 2011. Vol. 13. № 2. P. 167-173.
- Shorter J., Lindquist S.* Hsp104 catalyzes formation and elimination of self-replicating Sup35 prion conformers // *Science.* 2004. Vol. 304. № 5678. P. 1793-1797.
- Stolow D.T., Haynes S.R.* Cabeza, a Drosophila gene encoding a novel RNA binding protein, shares homology with EWS and TLS, two genes involved in human sarcoma formation // *Nucleic. Acids. Res.* 1995. Vol. 23. № 5. P. 835-843.
- Sun Z., Diaz Z., Fang X. et al.* Molecular determinants and genetic modifiers of aggregation and toxicity for the ALS disease protein FUS/TLS // *PLoS Biol.* 2011. Vol. 9. № 4. P. e1000614.
- Vaccaro A., Tauffenberger A., Aggad D. et al.* Mutant TDP-43 and FUS cause age-dependent paralysis and neurodegeneration in *C. elegans* // *PLoS One.* 2012. Vol. 7. № 2. P. e31321.
- Vance C., Rogelj B., Hortobagyi T. et al.* Mutations in FUS, an RNA processing protein, cause familial amyotrophic lateral sclerosis type 6 // *Science.* 2009. Vol. 323. № 5918. P. 1208-1211.
- Verbeeck C., Deng Q., Dejesus-Hernandez M. et al.* Expression of Fused in sarcoma mutations in mice recapitulates the neuropathology of FUS proteinopathies and provides insight into disease pathogenesis // *Mol. Neurodegener.* 2012. Vol. 7. P. 53.
- Wang J.W., Brent J.R., Tomlinson A. et al.* The ALS-associated proteins FUS and TDP-43 function together to affect Drosophila locomotion and life span // *J. Clin. Invest.* 2011. Vol. 121. № 10. P. 4118-4126.
- Wolozin B.* Regulated protein aggregation: stress granules and neurodegeneration // *Mol. Neurodegener.* 2012. Vol. 7. P. 56-61.
- Xia R., Liu Y., Yang L. et al.* Motor neuron apoptosis and neuromuscular junction perturbation are prominent features in a Drosophila model of Fus-mediated ALS // *Mol. Neurodegener.* 2012. Vol. 7. P. 10.
- Zhang Z.C., Chook Y.M.* Structural and energetic basis of ALS-causing mutations in the atypical proline-tyrosine nuclear localization signal of the Fused in Sarcoma protein (FUS) // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2012. Vol. 109. № 30. P. 12017-12021.
- Zinszner H., Albalat R., Ron D.* A novel effector domain from the RNA-binding protein TLS or EWS is required for oncogenic transformation by CHOP // *Genes. Dev.* 1994. Vol. 8. № 21. P. 2513-2526.

Научное издание

Коллектив авторов

**НЕЙРОДЕГЕНЕРАТИВНЫЕ ЗАБОЛЕВАНИЯ:
от генома до целостного организма**

Под редакцией академика РАН М.В. Угрюмова

В 2-х томах

ТОМ 1

ООО «Издательство «Научный мир»
127055, Москва, Тихвинский пер., д. 10/12, корп. 4, офис 91
Тел. +7(499) 973-25-13, +7(499) 973-26-70
E-mail: naumir@naumir.ru
Internet: <http://www.naumir.ru>

Подписано к печати 29.01.2014
Формат 70×100/16
Гарнитура Times New Roman. Печать офсетная. Усл. п.л. 46,76
Доп. тираж 300 экз. Заказ 1021-а

Издание отпечатано в типографии
ООО «Галлея-Принт»
111024, Москва, ул. 5-я Кабельная, 2-б