

**НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ  
ІНСТИТУТ ФІЗІОЛОГІЇ ІМ. О.О. БОГОМОЛЬЦЯ**

**НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ  
ІНСТИТУТ ФІЗІОЛОГІЇ ІМ. О.О. БОГОМОЛЬЦЯ**

Кваліфікаційна наукова праця  
на правах рукопису

**ПУТІЙ Юлія Володимирівна**

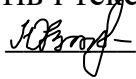
УДК 612.82:576.54:577.3

**ДИСЕРТАЦІЯ**

**ОСОБЛИВОСТІ КЛІТИННО-МОЛЕКУЛЯРНИХ ПЕРЕБУДОВ В  
ТКАНИНАХ ОРГАНІЗМУ ПРИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМУ  
ПАРКІНСОНІЗМІ ТА ХВОРОБІ ПАРКІНСОНА**

Спеціальність 091 – Біологія та біохімія  
Галузь знань 09 - Біологія

Подається на здобуття наукового ступеня доктора філософії

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело  Путь Ю.В.

Науковий керівник: **Розова Катерина Всеволодівна**, доктор біологічних наук, провідний науковий співробітник

Київ – 2024

## АНОТАЦІЯ

**Путій Ю.В. Особливості клітинно-молекулярних перебудов в тканинах організму при експериментальному паркінсонізмі та хворобі Паркінсона.** – Рукопис. Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю 091 – біологія та біохімія. – Інститут фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України, Київ, 2024.

Останні досягнення в області фізіології, молекулярної фізіології та біохімії дозволяють стверджувати, що значну частину нейродегенеративних форм патології можна віднести до так званих мітохондріальних захворювань. Саме до числа таких нейродегенеративних порушень, без сумніву, можна віднести і хворобу Паркінсона (ХП), що є однією з найбільш поширених патологій такого типу, після хвороби Альцгеймера. Механізми виникнення хвороби Паркінсона до теперішнього часу лишаються до кінця не з'ясованими. Однак існує декілька гіпотез відносно її патогенезу. Вони пов'язують захворювання, зокрема, з дисфункцією мітохондрій і убіквітин-протеосомальною дисфункцією, дією окисного стресу, запаленням, апоптозом. Разом з тим, визначити, яким конкретно чином настільки різні патогенетичні події викликають ХП, поки що не вдалося, тому це питання є досить актуальним на сьогодні. Різні генотипи пацієнтів, що страждають на ХП, свідчать про наявність не одного, а декількох молекулярно-патогенетичних шляхів розвитку захворювання.

У зв'язку із зазначеним, мета представленого дисертаційного дослідження полягала у визначенні особливостей клітинно-молекулярних перебудов в тканинах головного мозку, міокарду і легень при експериментальному паркінсонізмі, в клітинах крові при хворобі Паркінсона та з'ясуванні можливості застосування нових коригуючих підходів.

Для досягнення поставленої мети нами вирішувалися наступні завдання:

1. Оцінити ультраструктуру міокарду, тканин довгастого мозку, стріатуму, легень та структурні зміни мітохондрій (МХ) в них при моделюванні експериментального паркінсонізму.

2. З'ясувати роль модуляції активності АТФ-залежних мітохондріальних  $K^+$ -каналів в розвитку нейродегенерації при експериментальному паркінсонізмі.

3. Дослідити функціональний стан мітохондрій в тканинах при експериментальному паркінсонізмі.

4. Вивчити зміни експресії генів (PINK1, DJ1,) при експериментальному паркінсонізмі.

5. Оцінити морфологічний стан клітин крові (тромбоцитів та лейкоцитів) у пацієнтів з хворобою Паркінсона.

6. З'ясувати можливості попередження розвитку супутніх патологій та корекції пошкоджень, що виникають в тканинах, при експериментальному паркінсонізмі та у пацієнтів з хворобою Паркінсона за допомогою препарату Капікор.

Об'єкт дослідження: тканини довгастого мозку, серця та легень, при експериментальному паркінсонізмі, а також клітини крові пацієнтів з хворобою Паркінсона.

Предмет дослідження: зміни структур та властивостей тканин мозку, серця, легень та клітин крові при моделюванні паркінсоноподібного стану та при хворобі Паркінсона.

При проведенні досліджень застосовувалися наступні методи: електронна мікроскопія з наступним морфометричним аналізом; полярографічне дослідження функцій МХ; генетичні дослідження при оцінці рівня експресії мРНК генів DJ1 та PINK1, задіяних у розвитку паркінсонізму; статистичні методи аналізу отриманих результатів.

Дослідження проведені на 57 статевозрілих щурах-самцях лінії Вістар масою 250-300 г. Всі тварини утримувалися в віварії Інституту Фізіології ім. О. О. Богомольця та мали вільний доступ до їжі та води. Щури були розподілені на 6 груп: 1) контрольна (n=8), 2) тварини, котрим ротенон вводили однократно п/ш в дозі 0,3 мг/100 г маси тіла (n=10), 3) тварини, котрим ротенон вводили п/ш, щоденно протягом 2-х тижнів в дозі 0,3 мг/100 г маси тіла (n=10), 4) тварини, котрим ротенон вводили п/ш, щоденно протягом 2-х тижнів в дозі 0,3 мг/100 г маси тіла з паралельним застосуванням уридину – активатора АТФ-залежного  $K^+$  каналу, в/о в дозі 0,3 мг/100 г маси тіла (n=10), 5) тварини, котрим ротенон вводили п/ш, щоденно протягом 2-х тижнів в дозі 0,3 мг/100 г маси тіла з паралельним застосуванням уридину – в/о в дозі 0,3 мг/100 г маси тіла та 5-гидроксидеканоат (5НД) – інгібітора АТФ-залежного  $K^+$  каналу, в дозі 0,5 мг/100 г маси тіла (n=7), 6) тварини котрим ротенон вводили п/ш, щоденно протягом 2-х тижнів в дозі 0,3 мг/100 г маси тіла з паралельним застосуванням препарату капікор - в/о, щоденно протягом 2-х тижнів в дозі 0,5 мг/100 г маси тіла (n=12).

Також було проведено обстеження пацієнтів (n = 22), що мали встановлений діагноз хвороби Паркінсона зі стадією хвороби 3,0 за Хен-Яром, котрі перебували на базисній терапії леводопамісними препаратами в комбінації з іншими протипаркінсонічними засобами (агоністи дофамінових рецепторів, амантадин, холінолітики тощо). Після обстеження пацієнтам застосовували препарат Капікор за схемою: 2 капсули на добу протягом 2 міс. (АТ «Олайн-фарм», Латвія); 1 капсула містить - 180 мг мельдоній дигідрату і 60 мг гамма-бутиробетаїн дигідрату.

Капікор позиціонується виробниками як комбінований антиішемічний цереброкардіоваскулярний препарат, відновлюючий функцію ендотелію. Проте він має ширші можливості, оскільки мельдонію дигідрат впливає на індукцію біосинтезу NO, захищає клітини від токсичного впливу вільних радикалів, нормалізує оксидантний гомеостаз на клітинному рівні, позитивно

впливає на функцію ендотелію; гамма-бутиробетайну дигідрат гальмує транспорт довголанцюгових жирних кислот і їх метаболітів в мітохондріях, завдяки зниженню біосинтезу карнітину, що сприяє збереженню аеробного шляху метаболізму в умовах тканинної гіпоксії, запобігає виснаженню запасів АТФ і креатинфосфату в клітинах. Отже цей препарат може одночасно позитивно впливати на зменшення вираженості як ендотеліальної, так і мітохондріальної дисфункцій.

Під час аналізу стану тканин у групі тварин з однократним введення ротенону наявність мітохондріальної, а також ендотеліальної дисфункції та оксидативного стресу було виявлено у повній мірі у мозковій тканині, частково — у тканині серця; у тканині легень такий вплив виражених змін не викликав.

Електронномікроскопічні дослідження проведені на ротеноновій моделі у щурів з пролонгованою дією ротенону показали істотні зміни в морфологічному стані тканин довгастого мозку, стріатуму, серця та легень. Одними з основних ознак початку деструктивних змін були якісні та кількісні зміни характеристик мітохондрій у клітинах досліджуваних тканин. До ознак паркінсоноподібного стану при моделюванні паркінсоніму слід також віднести порушення ультраструктури мієліну у тканинах мозку, з набряком та деструкцією мієлінових волокон, зміни гематоенцефалічного, аерогематичного та гістогематичного бар'єрів.

В роботі вперше вивчені та комплексно охарактеризовані органоспецифічні зміни ультраструктури тканин мозку - довгастого мозку та стріатуму, і вісцеральних органів – серця та легень при моделюванні паркінсоноподібного стану. Доведено, що при експериментальному паркінсонізмі відбуваються процеси демієлінізації в тканинах мозку. Вперше показано, що мітохондріальна дисфункція та пошкодження мієліну пов'язані з модуляцією активності мітохондріальних АТФ-залежних  $K^+$  каналів. Процес активації мітохо-

ндриальних  $K_{ATP}$  - каналів за допомогою їх активатора уридину призводила до суттєвої нормалізації ультраструктури мієліну.

Доведено, що при розвитку паркінсоноподібного стану порушення ультраструктури тканин, розвиток мітохондріальної, а також ендотеліальної дисфункції спостерігається не тільки у відділах головного мозку – більш виражено в довгастому мозку, менш в стріатумі, але й в інших тканинах організму – більш виражено в міокарді, меншою мірою в тканині легень.

Вперше описано та кількісно проаналізовано експресію мРНК генів DJ1 та PINK1 в тканинах довгастого мозку, стріатуму, серця та легень при паркінсонізмі і виявлена їх різноспрямованість та органоспецифічність.

Проведено дослідження окисного фосфорилування в мітохондріях головного мозку, міокарді та тканині легень за окиснення різних субстратів. Використання екзогенних субстратів окиснення дало змогу оцінити функціонування всіх ланок дихального ланцюга мітохондрій.

Проведені генетичні дослідження вперше показали, що зміни рівня експресії мРНК гена DJ1 при експериментальному паркінсонізмі (ЕП) були односпрямованими в усіх досліджуваних тканинах, а саме - підвищеними. Попри односпрямованість змін, підвищення експресії мРНК гена DJ1 при ЕП, як не дивно, було переважно більш вираженим не у тканинах мозку, а у тканинах досліджуваних вісцеральних органів. В тканинах мозку зміни експресії мРНК гена PINK1 – зниження - також була суттєво менш вираженою, ніж в легенях та міокарді.

Електронномікроскопічне та морфометричне вивчення тромбоцитів (Т) у пацієнтів з ХП може вказувати на дисфункцію серотонінергічної системи, а також бути свідченням порушення регуляторних ефектів серотоніну відносно скоротливої здатності судинної стінки, оскільки Т є резервуарами серотоніну, що надходить з плазми крові, його кількість, накопичена в д-гранулах, опосередковано свідчить про обмін серотоніну, котрий у обстежуваних пацієнтів значно знижений. Також показано, що Т пацієнтів з ХП зна-

чно збільшена кількість  $\alpha$ -гранул, які серед іншого містять фактори згортання крові. Отже мабуть, підвищується і схильність до тромбоутворення, що в комплексі може сприяти формуванню патології серцево-судинної системи. Значні порушення були виявлені в ультраструктурі мітохондрій в клітинах крові у пацієнтів, що є прямим свідченням того, що при ХП, принаймні в клітинах крові, розвивається мітохондріальна дисфункція. Отримані результати можуть вказувати на деякі механізми, що приймають участь у формуванні та перебігу патологічного процесу при хворобі Паркінсона.

Ознаки мітохондріальної (МД), а також ендотеліальної (ЕД) дисфункції з органоспецифічним характером сприяють розвитку вторинної тканинної гіпоксії. За таких умов коригуючі заходи мають включати антигіпоксанти, до яких, зокрема, належить препарат Капікор (К). В роботі показано, що під впливом Капікору дійсно суттєво зменшувалися прояви мітохондріальної, а також ендотеліальної дисфункції, причому більш помітна нормалізація ультраструктури спостерігалася в тканинах з первісно вираженішими пошкодженнями, а саме – в довгастому мозку та міокарді.

Було встановлено, що Капікор може, як виявилось, ефективно знижувати не тільки вираженість мітохондріальної дисфункції, а й впливати на рівень експресії мРНК генів, в нашому випадку DJ1 і PINK1, тим самим, впливаючи на механізми розвитку паркінсонізму, що ймовірно може сприяти поліпшенню якості життя пацієнтів з ХП і попереджувати розвиток супутніх патологій.

При електронномікроскопічному дослідженні клітин крові у пацієнтів з ХП після лікування за допомогою Капікору встановлено його безсумнівний позитивний вплив. Особливо це стосується стану мітохондріального апарату тромбоцитів та лейкоцитів, котрі також були долучені до дослідження. Включення в комплексну терапію ХП препарату, який не впливає на основну патогенетичну ланку захворювання (нейродегенерація), ймовірно, може попередити формування (або зменшити прояви) супутньої патології, обумовле-

ної порушеннями, що спостерігаються в судинній стінці, і розвитком мітохондріальної дисфункції.

**Ключові слова:** хвороба Паркінсона, експериментальний паркінсонізм, нервова система, нейродегенерація, ротенон, мітохондріальна дисфункція, ендотеліальна дисфункція, мітохондрії, тромбоцити, лейкоцити, мієлін, морфологічні зміни, оксидативний стрес, АТФ-залежні  $K^+$ -канали, гіпоксія, уридин, капікор.

**Putiy Yu.V. Features of cell-molecular rearrangements in tissues of organism under experimental Parkinsonism and Parkinson's disease.** – Manuscript. A dissertation submitted to acquire the degree doctor of philosophy, speciality – 091 – Biology and biochemistry – Bogomoletz Institute of Physiology NASU, Kyiv, 2024.

Recent advances in physiology, molecular physiology and biochemistry suggest that a significant proportion of neurodegenerative forms of pathology can be attributed to the so-called mitochondrial diseases. Such neurodegenerative disorders undoubtedly include Parkinson's disease (PD), which is one of the most common pathologies of this type after Alzheimer's disease. The mechanisms of Parkinson's disease are still unclear. However, there are several hypotheses regarding its pathogenesis. They have linked diseases, in particular, to mitochondrial dysfunction and ubiquitin-proteosomal dysfunction, oxidative stress, inflammation, and apoptosis. However, it has not yet been possible to determine exactly how such different pathogenetic events cause PD, so this question is quite relevant today. Different genotypes of patients with PD indicate the presence of not one but several molecular pathogenetic pathways of the disease development.

In this regard, the aim of the presented dissertation research was to determine the features of cell-molecular rearrangements in brain, myocardial and lung tissues in experimental Parkinsonism, in blood cells in Parkinson's disease and to clarify the possibility of using some corrective approaches.

To achieve this goal we solved the following tasks:

1. To evaluate the ultrastructure of tissues and structural changes of mitochondria under the modeling of experimental Parkinsonism.
2. To find out the role of the modulation of mitochondrial K<sup>+</sup>ATP-dependent channels activity in the development of neurodegeneration in experimental Parkinsonism.
3. To investigate the functional state of mitochondria in tissues in experimental Parkinsonism.
4. To study changes in gene expression (PINK1, DJ1,) under experimental Parkinsonism.
5. Assess the morphofunctional state of blood cells in patients with Parkinson's disease.
6. To find out the possibilities of preventing the development of concomitant pathologies and correction of tissue damage under experimental Parkinsonism and in patients with Parkinson's disease with the help of the drug Capicor.

Object of study: tissues of the medulla oblongata, heart and lungs, in experimental Parkinsonism, as well as blood cells of patients with Parkinson's disease.

Subject of research: changes in the structures and properties of brain, heart, lung tissues and blood cells when modeling of Parkinson's condition and Parkinson's disease.

The following methods were used in the research: electron microscopy followed by morphometric analysis; polarographic study of mitochondrial functions; molecular genetic studies in assessing the level of expression of genes involved to the development of Parkinsonism; statistical methods for analysis of the obtained results.

The study was conducted on 57 sexually mature male Wistar rats weighing 250-300 g. All animals were kept in the vivarium of the Bogomoletz Institute of Physiology NASU and had free access to food and water. The rats were divided into 6 groups: 1) control (n=8), 2) animals that received rotenone once

subcutaneously at a dose of 0.3 mg/100 g of body weight (n=10), 3) animals, to which rotenone was administered subcutaneously, daily for 2 weeks at a dose of 0.3 mg/100 g of body weight (n=10), 4) animals to which rotenone was administered subcutaneously, daily for 2 weeks at a dose of 0.3 mg/100 g of body weight with the simultaneous use of uridine, an activator of the ATP-dependent K<sup>+</sup> channel, i.v. at a dose of 0.3 mg/100 g of body weight (n=10), 5) animals to which rotenone was administered subcutaneously, daily for 2 weeks at a dose of 0.3 mg/100 g of body weight with parallel application of uridine - i.v. at a dose of 0.3 mg/100 g of body weight and 5-hydroxydecanoate (5ND) - an ATP inhibitor -dependent K<sup>+</sup> channel, at a dose of 0.5 mg/100 g of body weight (n=7), 6) animals to which rotenone was administered subcutaneously, daily for 2 weeks at a dose of 0.3 mg/100 g of body weight with the simultaneous use of the drug Kapikor - intramuscularly, daily for 2 weeks at a dose of 0.5 mg/100 g of body weight (n=12).

An examination of patients (n = 22) who had an established diagnosis of Parkinson's disease with stage 3.0 according to Ho-Yar, who were on basic therapy with levodopa-containing drugs in combination with other antiparkinsonian drugs (dopamine receptor agonists, amantadine, cholinolytics, etc.). After the examination, the patients were given the drug Kapikor according to the scheme: 2 capsules per day for 2 months. (OJSC "Oline-pharm", Latvia); 1 capsule contains - 180 mg of meldonium dihydrate and 60 mg of gamma-ma-butyrobetaine dihydrate.

Kapikor is positioned by the manufacturers as a combined anti-ischemic cerebrocardiovascular drug that restores the function of the endothelium. However, it has wider possibilities, since meldonium dihydrate affects the induction of NO biosynthesis, protects cells from the toxic effects of free radicals, normalizes oxidant homeostasis at the cellular level, and has a positive effect on the function of the endothelium; gamma-butyrobetaine dihydrate inhibits the transport of long-chain fatty acids and their metabolites in mitochondria, due to the reduction of

carnitine biosynthesis, which contributes to the preservation of the aerobic pathway of metabolism in conditions of tissue hypoxia, prevents the depletion of ATP and creatine phosphate reserves in cells.

Therefore, this drug can simultaneously have a positive effect on reducing the severity of both endothelial and mitochondrial dysfunction.

So, during the analysis of tissue state in a group of animals with a single injection of rotenone, the presence of mitochondrial and endothelial dysfunction and oxidative stress was detected in full in brain tissue, in part - in heart tissue; in lung tissue such influence did not cause the expressed changes.

Electron microscopic studies performed on the rotenone model in rats with prolonged action of rotenone showed significant changes in the morphofunctional state of the tissues of the medulla oblongata, heart and lungs. One of the main signs of the beginning of destructive changes were qualitative and quantitative changes in the characteristics of mitochondria in the cells of the studied tissues. Signs of parkinson-like condition in modeling parkinsonism should also include violations of the ultrastructure of myelin in brain tissues, with edema and destruction of myelin fibers, changes in blood-brain, aerohematological and histohematological barriers. In the dissertation for the first time, organ-specific changes in the ultrastructure of brain tissues - medulla oblongata and striatum, and visceral organs - heart and lungs in modeling the Parkinson-like state were studied and comprehensively characterized. It is proved that in experimental Parkinsonism (EP) the processes of demyelination in brain tissues occur. It has been shown for the first time that mitochondrial dysfunction and myelin damage are associated with modulation of the mitochondrial  $K^+$ ATP-dependent channels activity. The process of activation of mitochondrial  $K^+$ ATP-dependent channels by their activator uridine led to a significant normalization of the myelin ultrastructure.

It is proved that under the development of Parkinson's condition violation of the tissues ultrastructure, the development of mitochondrial and endothelial dysfunction were observed not only in the brain - more pronounced in the medulla ob-

longata, less in the striatum, but also in other tissues of the organism - more pronounced in the myocardium, less in lung tissue.

For the first time, mRNA expression of DJ1 and PINK1 genes in the tissues of the medulla oblongata, striatum, heart and lungs in Parkinsonism was described and quantified, and their diversity and organ specificity were revealed.

A study of oxidative phosphorylation in mitochondria of brain, myocardium and lung tissue for the oxidation of various substrates was conducted. The use of exogenous oxidation substrates made it possible to assess the functioning of all parts of the respiratory chain of mitochondria.

Genetic studies have shown for the first time that changes in the level of mRNA expression of the DJ1 gene in experimental Parkinsonism were unidirectional in all tissues studied, namely, elevated. Despite the unidirectionality of the changes, the increase in mRNA expression of the DJ1 gene under EP, unexpectedly, was mostly more pronounced not in brain tissue, but in the tissues of the studied visceral organs. In brain tissues, changes in PINK1 gene mRNA expression - a decrease - were also significantly less pronounced than in the lungs and myocardium.

Electron microscopic and morphometric examination of platelets (P) in patients with PD may indicate dysfunction of the serotonergic system, as well as evidence of a violation of the regulatory effects of serotonin on the contractile capacity of the vascular wall, because P is a reservoir of serotonin in the blood  $\delta$ -granules, indirectly indicates S metabolism, which is significantly reduced in the examined patients. It is also shown that in P of patients with PD significantly increased the number of  $\alpha$ -granules, which, among other things, contain coagulation factors. Thus, apparently, the tendency to thrombosis increases, which in the complex may contribute to the formation of pathology of the cardiovascular system. Significant abnormalities were found in the ultrastructure of mitochondria in blood cells of patients with PD, which is direct evidence that PD, at least in blood cells, mitochondrial dysfunction develops. The results obtained may indicate some

mechanisms involved in the formation and course of the pathological process in Parkinson's disease.

Signs of mitochondrial (MD) while endothelial (ED) dysfunction with organ-specific nature contribute to the development of secondary tissue hypoxia. Under such conditions, corrective measures should include antihypoxanites, which include, in particular, the drug Capicor (C). In our work it was shown that under the influence of C the manifestations of MD while ED really decreased significantly, and a more noticeable normalization of the ultrastructure was observed in tissues with initially more pronounced damage, namely in the medulla oblongata and myocardium.

It was found that C can, as it turned out, effectively reduce not only the severity of mitochondrial dysfunction, but also affect the expression of mRNA genes, in our case DJ1 and PINK1, thereby affecting on the mechanisms of Parkinsonism formation, which is likely to improve quality of life patients with PD and prevent the development of concomitant pathologies.

Electron microscopic examination of blood cells in patients with PD after treatment with Capicor revealed its undoubted positive effect. This is especially true of the state of the mitochondrial apparatus of P and leukocytes (L), which were also included in the study. The inclusion to the complex therapy of PD, a drug that does not effect on the main pathogenetic link of the disease (neurodegeneration), probably can to some extent prevent the formation (or reduce the manifestations) of comorbidities caused by disorders occurring in the vascular wall and the development of mitochondria dysfunction.

**Key words:** Parkinson's disease, experimental parkinsonism, nervous system, neurodegeneration, rotenone, mitochondrial dysfunction, endothelial dysfunction, mitochondria, platelets, leukocytes, myelin, morphological changes, oxidative stress, ATP-dependent K<sup>+</sup> channels, hypoxia, uridine, capicor.

## СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

### В яких опубліковані основні результати роботи:

1. Розова КВ., Гончар ОО, Путій ЮВ, Маньковська ІМ. Вплив альфа-ліпоєвої кислоти на про- та антиоксидантний баланс і активність тромбоцитів у пацієнтів з цукровим діабетом 2-го типу. *Експериментальна і клінічна медицина*. 2016; (2): 161 – 5. (Особистий внесок здобувача полягає у аналізі наукової літератури).
2. Belikova M, Rozova K, Putii Y. Possible ways of reducing the manifestation of mitochondrial dysfunction in patients with type 2 diabetes and parkinson's disease. *American Journal for Fundamental, Applied and Experimental Researches*. 2016; (1): 21– 29. (Особистий внесок здобувача полягає у проведенні експериментальних досліджень, статистичній обробці результатів дослідження і підготовці матеріалів статті до публікації).
3. Розова КВ, Путій ЮВ, Беликова МВ. Морфофункціональні порушення у тромбоцитах у пацієнтів з цукровим діабетом другого типу та хворобою Паркінсона. *Патологія Реабілітація Адаптація*. 2017; 15 (2): 94 –106. (Особистий внесок здобувача полягає у проведенні експериментальних досліджень, статистичній обробці результатів дослідження, формулюванні висновків).
4. Маньковська ІМ, Гончар ОО, Носар ВІ, Розова КВ, Братусь ЛВ, Колеснікова ЄЕ, Путій ЮВ, Карабань ІМ. Мітохондріальна дисфункція та оксидативні порушення у мозку щурів при моделюванні паркінсоноподібного синдрому: коригувальна дія капікору. *Фізіол.журн*. 2018; 64 (4): 82-90. DOI: <https://doi.org/10.15407/fz64.04.082>; Q4 (Особистий внесок здобувача полягає у аналізі наукової літератури та формулюванні висновків щодо сучасного стану проблеми).

5. Путій ЮВ, Сидоряк НГ, Розова КВ. Корируючий вплив препарату капікор на структурні компоненти мітохондріальної та ендотеліальної дисфункції при експериментальному паркінсонізмі. *Ліки - людині*. «Сучасні проблеми фармакотерапії і призначення лікарських засобів». Харків: НФаУ, 2020. 455 –8. *(Особистий внесок здобувача полягає у проведенні експериментальних досліджень, статистичній обробці результатів дослідження, формулюванні висновків і підготовці матеріалів статті до публікації)*.

6. Rozova K, Putii Y. Is there an organ-specific expression of candidate genes (Dj1, PINK1) in tissues of the organism under experimental parkinsonism and its pathogenetic therapy? *Sci. Rev.* 2021; 36 (1): 31–7. doi: 10.31435/rsglobal\_sr/30012021/7378 *(Особистий внесок здобувача полягає у проведенні експериментальних досліджень, статистичній обробці результатів дослідження, формулюванні висновків і підготовці матеріалів статті до публікації)*.

7. Mosentsov AA, Rozova EV, Belosludtseva NV, Mankovskaya IN, Putiy YuV, Karaban IN., Mikheeva IB., Mironova GD. Does the Operation of Mitochondrial ATP-Dependent Potassium Channels Afect the Structural Component of Mitochondrial and Endothelial Dysfunctions in Experimental Parkinsonism? *Bul. Experim. Biol. Med.* 2021; 170 (4): 431 – 5. doi: 10.1007/s10517-021-05081-y.; Q3. *(Особистий внесок здобувача полягає у аналізі наукової літератури та формулюванні висновків щодо сучасного стану проблеми)*.

8. Путій ЮВ, Миронова ГД, Розова КВ. Дослідження впливу активності мітохондріального АТФ-залежного  $K^+$  каналу на ультраструктуру мієліну при експериментальному паркінсонізмі. *Internat. Sci. J. «Grail of science»*. 2021; (4): 141–51. DOI: 10.3074/grail-of-science.07.05.2021.026

9. Путій ЮВ, Фучко ОЛ, ВащенкоНМ, Розова КВ. Формування ультраструктурних адаптивних реакцій у тканинах організму при експериментальному паркінсонізмі. *Фізіол. журн.* 2023; 69 (3): 74-82. doi: <https://doi.org/10.15407/fz69.03.074>; Q4 *(Особистий внесок здобувача полягає*

у проведенні експериментальних досліджень, статистичній обробці результатів дослідження, формулюванні висновків і підготовці матеріалів статті до публікації).

**Які засвідчують апробацію матеріалів дисертаційного дослідження:**

Путій ЮВ, Носар ВІ, Белікова МВ, Розова КВ. Зміни дихання мітохондрій у довгастому мозку щурів при експериментальному паркінсонізмі. *Фізіол. журн.* 2016; 65 (3, додаток): 204-5. *(Публікація тез)*.

Rozova K, Putii Y. The ultrastructural peculiarities of the cardio-pulmonary insufficiency in experimental Parkinsonism and diabetes: the possibility of correction. *Comorbidity in Pulmonology*. Truskavetz, 2017 (25-27 квітня); 20-2. *(Публікація тез)*.

Розова КВ, Путій ЮВ, Белікова МВ. Морфофункціональні порушення в тромбоцитах у пацієнтів з цукровим діабетом другого типу та хворобою Паркінсона: можливості корекції. Наукова конференція, Київ, 2017 (15 травня). *(Публікація тез)*.

Путій ЮВ. Стан мітохондріального апарату в тканинах легень, довгастого мозку та серця при моделюванні гострого паркінсоноподібного стану. Всеукраїнська науково-практична конференція молодих учених «Медична наука в практику охорони здоров'я». Полтава, 2017 (17 листопада). *(Публікація тез)*.

Путій ЮВ, Розова КВ. Формування порушень ультраструктури в різних тканинах організму при ротенон-токсичній моделі паркінсонізму. X Міжнародний симпозіум «Актуальні проблеми біофізичної медицини». Київ, 2018 (16-18 травня); 54 – 6. *(Публікація тез)*.

Путій ЮВ, Носар ВІ, Розова КВ. Функціональний стан мітохондрій у мозку, міокарді та легенях щурів при моделюванні паркінсоноподібного син-

дром: корегувальна дія капікору. IV International Scientific and Practical Conference. Vancouver, Canada, 2019 (18-20 December); 631 –41. *(Публікація тез)*.

Путій ЮВ, Клименко ОО, Розова КВ. Деякі генетичні основи формування експериментального паркінсонізму. VIII Національний Конгрес патологів України «Патологічна фізіологія – охороні здоров'я України». Одеса, 2021 (13-15 травня); 166-8. *(Публікація тез)*.

Путій ЮВ. Деякі генетичні передумови формування мітохондріальної дисфункції при експериментальному паркінсонізмі. XII Всеукраїнська науково-практична конференція «Актуальні питання патології за умов дії надзвичайних факторів на організм». Тернопіль, 2020 (29-30 жовтня); 90 –1. *(Публікація тез)*.

## ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ	21
ВСТУП	22
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	29
1.1. Молекулярно-патогенетичні шляхи розвитку нейродегенеративних захворювань	29
1.2. Загальна характеристика хвороби Паркінсона	31
1.3. Особливості ультраструктури клітин різних тканин організму при хворобі Паркінсона	37
1.4. Генетично обумовлені зміни структури клітин та клітинних органел при паркінсонізмі та хворобі Паркінсона	44
1.4.1. Роль генів PARKIN в розвитку хвороби Паркінсона	46
1.4.2. Залучення гена PINK1 до формування хвороби Паркінсона	48
1.4.3. Участь гена DJ1 у розвитку хвороби Паркінсона	50
1.5. Хвороба Паркінсона і порушення активності мітохондріальних ферментів	56
1.6. Загальноприйняті експериментальні моделі хвороби Паркінсона	60
1.6.1 Експериментальні ротенонові моделі хвороби Паркінсона на щурах	63
1.7. Деякі підходи до лікування хвороби Паркінсона та супутньої вісцеральної патології	66
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ	68
2.1. Об'єкти дослідження	68
2.1.1. Експериментальні дослідження	68

2.1.2. Обстеження пацієнтів з хворобою Паркінсона	69
2.2. Підготовка препаратів для електронномікроскопічних та морфометричних досліджень	71
2.3. Полярнографічний метод дослідження функціонального стану мітохондрій	71
2.4. Генетичні методи дослідження	73
2.5. Дослідження клітин крові у пацієнтів з хворобою Паркінсона	74
2.6. Методи статистичного аналізу	74
<b>РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ</b>	<b>75</b>
3.1. Вивчення впливу ротенону на ультраструктуру тканин мозку, серця та легень	75
3.1.1. Дослідження впливу однократного введення ротенону на ультраструктуру тканин довгастого мозку, серця та легень	75
3.1.2. Дослідження впливу тривалого введення ротенону на ультраструктуру тканин довгастого мозку, стріатуму, серця та легень	83
3.2. Дослідження механізму нейродегенерації, пов'язаного з активністю мітохондріального АТФ-залежного $K^+$ каналу	94
3.3. Функціональний стан мітохондрій у мозку, міокарду та легень щурів при експериментальному паркінсонізмі	103
3.4. Експресія генів-кандидатів (DJ1, PINK1) у тканинах організму при експериментальному паркінсонізмі	110
3.5. Дослідження особливостей ультраструктури тромбоцитів у пацієнтів з хворобою Паркінсона	116
3.6. Застосування препарату Капікор при тривалому застосуванні Ротенону та хворобі Паркінсона	120
3.6.1. Вплив препарату Капікор при експериментальному паркінсонізмі	120

3.6.2. Застосування препарату Капікор при лікуванні пацієнтів з хворобою Паркінсона	127
РОЗДІЛ 4. ОБГОВОРЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ	131
ВИСНОВКИ	148
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	151

## ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

- АФК – активні форми кисню  
ЕД – ендотеліальна дисфункція  
ЕП – екпериментальний паркінсонізм  
К - капікор  
Л - лейкоцити  
М - мієлін  
мРНК – матрична рибонуклеїнова кислота  
МХ – мітохондрія  
МД – мітохондріальна дисфункція  
МХЗ – мітохондріальні захворювання  
НАД – нікотинамідаденіндинуклеотид  
ПОЛ – перикисне окислення ліпідів  
Р - ротенон  
С – серотонін  
Т - тромбоцити  
ТЛ – тільця Леві  
УД - уридин  
ХП – хвороба Паркінсона  
5НД - 5-гідроксидеканоат  
AIF – apoptosis-inducing factor  
DDC - 4-дигідрокси-L-фенілаланіндекарбоксилаза  
NF-κB - ядерний фактор «каппа-бі»  
ROS – вільні окисні радикали  
SN – substua nigra  
SNCA - альфа-синуклеїн  
ТН – тирозингідроксилаза  
6-OHDA – 6-гідроксидопамін

## ВСТУП

Хвороба Паркінсона (ХП) - це патологічний стан з прогресуючою нейродегенеративною складовою, що зобов'язаний своїм виникненням переважно оксидативному стресу. Захворювання характеризується сповільненістю і нестабільністю руху (брадикінезія), ригідністю м'язів, тремтінням тіла в спокої і неврівноваженою поставою. Розвивається, як правило, на 6-му чи 7-му десятиліттях життя з повільним прогресуванням до акінезії, сильним тремором, фізичною втратою працездатності та смертю протягом 10-25 років від початкових симптомів. Проте, хоча все ж найчастіше перші симптоми захворювання з'являються в 55-60 років, однак хвороба може розвинутиися і у віці до 40 років (хвороба Паркінсона з раннім початком) або й до 20 років (ювенільний форма захворювання) [2, 11]. Частота виявлення ХП коливається від 60 до 140 осіб на 100 тисяч населення, і кількість хворих значно збільшується серед представників старшої вікової групи: у віковій групі старше 60 років розповсюдженість становить 1 %, а старше 85 років — від 2,6 % до 4 %. Згідно зі статистичними даними МОЗ, натеper в Україні зареєстровано понад 23 000 людей з хворобою Паркінсона, або 61,4 на 100 000 населення. Кожного року про цей діагноз дізнаються від лікарів 2 500 українців [48].

Причини, котрі викликають хворобу Паркінсона, достеменно невідомі, але відзначається деструкція та втрата нейронів, що містять дофамін в substantia nigra pars compacta стовбура мозку та втратою нормальної дофамінергічної нейротрансмісії. Донедавна вважали, що патологія містить переважно дофамінергічний компонент, проте в останні роки показано, що в формуванні ХП задіяні ще холінергічний, серотонінергічний та норадренергічний шляхи [248]. Залишається незрозумілим, чи діють вони окремо, чи «зливаються» в один або декілька кінцевих шляхів [247]. Отже, зрозумілим є необхідність продовження дослідження причин виникнення хвороби Паркінсона задля формування сталої завершеної картини. Тим більше, що терапія

хвороби Паркінсона продовжує розвиватися і спрямована принаймні на поліпшення якості життя та виживання пацієнтів [110].

Останні досягнення в області фізіології, молекулярної фізіології та біохімії дозволяють стверджувати, що значну частину нейродегенеративних форм патології можна віднести до так званих мітохондріальних захворювань. Саме до числа таких нейродегенеративних порушень, без сумніву, можна віднести і ХП, що є однією з найбільш поширених патологій такого типу, після хвороби Альцгеймера [63, 222].

Таким чином, механізми виникнення хвороби Паркінсона до теперішнього часу лишаються до кінця нез'ясованими. Однак існує декілька гіпотез відносно її патогенезу. Вони пов'язують захворювання, зокрема, з дисфункцією мітохондрій і убіквітин-протеосомальною дисфункцією, дією окисного стресу, запаленням, апоптозом. Разом з тим, визначити, яким конкретно чином настільки різні патогенетичні події викликають ХП, поки що не вдалося, тому це питання є досить актуальним на сьогодні. Різні генотипи пацієнтів, що страждають на ХП, свідчать про наявність не одного, а декількох молекулярно-патогенетичних шляхів розвитку захворювання.

Особливий інтерес представляє збільшення рівня дефектних білків у клітині під впливом мітохондріальної дисфункції, що, можливо, свідчить про формування взаємозв'язку між продукцією дефектних протеїнів і дисфункцією мітохондрій. Досить широко відомий експеримент з впливом на мітохондрії щурів ротенону [25]. Дана речовина сприяє генерації синтезу мітохондріями антифосфоліпідного комплексу та агрегації альфа-синуклеїну, а також накопиченню в нервових клітинах тау-білка. Мітохондріальна дисфункція і синтез мутантних білків є дуже складним і багатогранним процесом. Досі залишається невідомим як відбувається індукція синтезу мутантних білків. Основним припущенням на даний момент є індукція запрограмованої загибелі клітин за рахунок пригнічення I дихального комплексу та розвиток оксидативного стресу, активація протеасом і неповне руйнування мітохондрій.

Причому, останніми роками розглядається можливий механізм виникнення мітохондріальної дисфункції (МД), пов'язаний з змінами у динамічних процесах в мітохондріальному апараті нейронів, а саме пошкодження процесу fission-fusion мітохондрій (МХ) [135, 206].

Як підсумок, натеper все ж вважають, що найпоширеніший шлях — загибель нейронів нервової системи та зниження продукції дофаміну, що й призводить до розвитку хвороби Паркінсона. Розглянуті закономірності потребують подальшого вивчення, що сприятиме створенню цілісної картини патогенезу не тільки хвороби Паркінсона, але й інших нейродегенеративних захворювань. Різноманіття механізмів мітохондріальної дисфункції і універсальність її для різних захворювань становить значний науково-практичний інтерес для формування стратегії діагностики та лікування хвороби Паркінсона і інших захворювань, пов'язаних з дегенерацією нейронів центральної нервової системи [45].

**Актуальність.** Хвороба Паркінсона відноситься до числа найбільш частих нейродегенеративних захворювань людини. Останнім часом спостерігається зростання числа хворих ідіопатичним паркінсонізмом і зниження віку початку захворювання. Незважаючи на інтенсивні молекулярно-біологічні дослідження, причини розвитку захворювання залишаються до кінця не з'ясованими. Різноманіття механізмів формування мітохондріальної дисфункції і універсальність її для різних захворювань становить значний науково-практичний інтерес для формування стратегії діагностики та лікування хвороби Паркінсона і інших захворювань, пов'язаних з дегенерацією нейронів центральної нервової системи.

#### **Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.**

Роботу виконано в рамках наукової тематики відділу з гіпоксії «Механізми розвитку та компенсації гіпоксичних та оксидативних тканинних

пошкоджень при нейродегенеративних і метаболічних розладах», 2017-2019 (№ держреєстрації 0116U004474). Дослідження зміни експресії генів, залучених до формування експериментального паркінсонізму, виконувалися спільно з лабораторією генетики Інституту геронтології ім. Д.Ф. Чеботарьова АМН України у відповідності з «Угодою про сумісні наукові дослідження» між ним та Інститутом фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України.

**Мета дослідження.** Визначення особливостей клітинно-молекулярних перебудов в тканинах головного мозку, міокарду і легень при експериментальному паркінсонізмі, в клітинах крові при хворобі Паркінсона та з'ясування можливості застосування деяких коригуючих підходів.

**Завдання дослідження:**

1. Оцінити ультраструктуру тканин та структурні зміни мітохондрій при моделюванні експериментального паркінсонізму.
2. З'ясувати роль модуляції активності АТФ-залежних мітохондріальних  $K^+$  каналів в розвитку нейродегенерації при експериментальному паркінсонізмі.
3. Дослідити функціональний стан мітохондрій в тканинах при експериментальному паркінсонізмі.
4. Вивчити зміни експресії генів (PINK1, DJ1,) при експериментальному паркінсонізмі.
5. Оцінити морфологічний стан клітин крові у пацієнтів з хворобою Паркінсона.
6. З'ясувати можливості попередження розвитку супутніх патологій та корекції пошкоджень, що виникають в тканинах, при експериментальному паркінсонізмі та у пацієнтів з хворобою Паркінсона за допомогою препарату Капікор.

**Методи дослідження:** електронна мікроскопія з наступним морфометричним аналізом; полярографічне дослідження функцій МХ; молекулярно-генетичні дослідження при оцінці рівня експресії генів, задіяних у розвитку паркінсонізму, статистичні методи аналізу отриманих результатів.

**Об'єкт дослідження:** тканини довгастого мозку, серця та легень, при експериментальному паркінсонізмі, а також клітини крові пацієнтів з хворобою Паркінсона.

**Предмет дослідження:** зміни структур та властивостей тканин мозку, серця, легень та клітин крові при моделюванні паркінсоноподібного стану та при хворобі Паркінсона.

**Наукова новизна одержаних результатів.** В дисертаційній роботі вперше вивчені та комплексно охарактеризовані органоспецифічні зміни ультраструктури тканин мозку - довгастого мозку та стріатуму, і вісцеральних органів – серця та легень при моделюванні паркінсоноподібного стану. Доведено, що при експериментальному паркінсонізмі відбуваються процеси демієлінізації в тканинах мозку. Вперше показано, що мітохондріальна дисфункція та пошкодження мієліну пов'язані з модуляцією активності мітохондріальних АТФ-залежних  $K^+$  каналів. Вперше описано та кількісно проаналізовано експресію мРНК генів DJ1 та PINK1 в тканинах довгастого мозку, стріатуму, серця та легень при паркінсонізмі і виявлена їх різноспрямованість та органоспецифічність. Проведений та уточнений морфометричний стан клітин крові у пацієнтів з хворобою Паркінсона. На основі отриманих результатів розроблені методичні підходи до корегування патологічного стану для зниження ймовірності супутніх захворювань при паркінсоноподібному стані. Показано, що за допомогою препарату капікор можна суттєво зменшити мітохондріальну та ендотеліальну дисфункцію, поліпшити процеси окисного фосфорилування через переважну активацію НАД-залежних

субстратів. Вперше показана можливість змін рівня експресії досліджуваних генів за допомогою застосування антиоксиданту широкого спектру дії.

**Теоретичне та практичне значення отриманих результатів.** Результати дисертаційної роботи представляють цінність у практичному аспекті; оскільки отримано дані стосовно ефекту препарату капікор на стан організму під дією хвороби Паркінсона, вплив якого дає позитивний ефект на морфофункціональний стан органів та попереджує виникнення супутніх захворювань організму. Дані дисертаційної роботи можуть бути використані для досягнення терапевтичних ефектів у терапії попередження ускладнень при хворобі Паркінсона та паркінсоноподібних станів. З'ясування ролі мітохондріальних АТФ-залежних  $K^+$  каналів в розвитку нейродегенерації може допомогти у пошуку нових ефективних шляхів лікування подібної патології. Важливість роботи у фундаментальному плані полягає у виявленні зміни експресії генів DJ1 та PINK1 у тканинах мозку, серця та легень; у з'ясуванні наявності органоспецифічності змін ультраструктури тканин організму та їх мітохондріального апарату при експериментальному паркінсонізмі; у встановленні змін ультраструктури тромбоцитів, котрі можуть слугувати для оцінки мітохондріальної та ендотеліальної дисфункції при хворобі Паркінсона.

**Особистий внесок здобувача.** Опрацювання літературних джерел, виконання експериментів, інтерпретація отриманих результатів проводились здобувачем особисто за участі керівника наукової роботи. Статистична обробка отриманих даних, підготовка наукової роботи до друку та написання всіх розділів дисертації проводились здобувачем особисто.

**Апробація результатів дисертації.** Результати дослідження були представлені на 8 наукових форумах, вітчизняних, міжнародних та з міжнародною участю.

**Публікації.** За результатами роботи було опубліковано 9 статей у фахових наукових журналах, затверджених ВАК України, та у виданнях країн Євросоюзу, у тому числі три статті у наукових виданнях, віднесених до третього-четвертого квартилю відповідно до класифікації SCImago Journal and Country Rank, та вісім тез доповідей на конференціях.

**Структура та обсяг дисертації.** Дисертація складається зі вступу, огляду літератури, опису матеріалів та методів дослідження, викладення результатів досліджень, аналізу та обговорення результатів, висновків та списку використаних джерел із 269 найменувань. Робота містить 13 таблиць, 37 рисунків. Загальний обсяг дисертації становить 181 сторінка.

## РОЗДІЛ 1.

### ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

#### **1.1. Молекулярно-патогенетичні шляхи розвитку нейродегенеративних захворювань**

Нейродегенеративні захворювання складають групу захворювань нервової системи, які пов'язані з прогресуючою загибеллю нейронів, що відносяться до різних типів. До числа таких нейродегенеративних патологій, без сумніву, можна віднести хвороби Паркінсона (ХП), Альцгелмера і Хантингтона, синдром Кернса-Сейра, також ряд інших захворювань, не враховуючи психічні розлади. Останні досягнення в області цитології, молекулярної біохімії дозволяють стверджувати, що значну частину нейродегенеративних форм патології можна віднести до так званих мітохондріальних захворювань. Ці хвороби значною мірою завдячують порушенням структури і функцій мітохондрій (МХ), а отже розладам системи тканинного дихання. Тобто спостерігається розвиток мітохондріальної дисфункції (МД).

Як відомо, МХ продукують велику частину енергії для організму в цілому і нейронів зокрема шляхом окисного фосфорилування відповідних субстратів, забезпечуючи макроергами АТФ–залежні субклітинні структури і процеси на рівні функціонування клітин (функціонування іонних каналів, клітинних рецепторів, клітинних насосів, вивільнення та утилізацію трансмітерів тощо) [79]. Зазначене відіграє практично ключову роль в забезпеченні існування та загибелі клітин, зокрема за апоптотичним типом [96]. Зважаючи на виражену гліколітичну залежність, функція нейронів залежать від енергопродукції МХ в значно більшому ступені, чим інші клітини людського організму. Крім того МХ залучаються у здійснення таких клітинних функцій як гомеостаз кальцію, регуляція внутрішньоклітинного окисно–відновного по-

тенціалу, синаптична пластичність тощо. Як правило, нейрони мають велику кількість мітохондрій, накопичення яких особливо важливе в місцях синаптичних контактів. Скупчення мітохондрій в області синапсів відіграє значну роль у підтримці механізмів синаптичної передачі, окрім всього іншого, за рахунок здатності цих органел функціонувати як буферні системи по відношенню до іонів  $\text{Ca}^{2+}$ . Володіючи власним (хоч і обмеженим та своєрідним) апаратом ДНК, мітохондрії можуть ділитись, зливатись, мігрувати, забезпечувати енергією різноманітні процеси в нейронах, тобто мають власні динамічні процеси. Як показали результати робіт останніх років, координоване злиття мітохондрій сприяє підтриманню стабільності мітохондріальної ДНК [87, 100, 103, 136]. Навпаки, порушення динаміки мітохондрій може визначати розвиток нейродегенеративних процесів.

Разом з тим, при здійсненні мітохондріями своєї фізіологічної функції виникає ефект своєрідної відкритої «скриньки Пандори». Мітохондрії є основним продуцентом вільних окисних радикалів (reactive oxygen species – ROS); в той же час білки самих цих органел особливо вразливі до дії таких радикалів, тобто утворюється своєрідне хибне коло щодо пошкодження структури та функції мітохондрій [91, 96]. До числа потенційних мішеней ROS в середині самих МХ можна віднести їх ДНК, ліпіди та білки мембран мітохондрій. Окремі МХ містять в собі від 1000 до 10000 копій ДНК, що кодують 13 білків дихального ланцюга цих органел. Сім із даних білків відносяться до I комплексу, один — до III комплексу, три — IV комплексу і два до V комплексу. В МХ присутні два види рибосомальних РНК і 22 види транспортних РНК [104]. Найбільш поширені типи пошкоджень мітохондріальної ДНК — точкові мутації, модифікації і делеції — викликають дисфункцію мітохондрій і запускають механізми апоптозу. Відомо, що пошкодження МХ ДНК та окисний стрес сприяють появі пор (мегаканалів) в мембрані мітохондрій (mitochondrial transition pores – МТР) з наступним вивільненням цитохрому *c* і фактора індукції апоптозу (apoptosis-inducing factor – AIF) із транс-

мембранного матриксу в цитозоль. Ознаками дисфункції мітохондрій при нейродегенеративних процесах можуть слугувати ультраструктурні зміни в цих органелах, інгібування комплексів їх дихального ланцюга, зниження інтенсивності продукції АТФ, підвищення рівня продукції ROS, інтенсифікація процесу перекисного окислення ліпідів (ПОЛ), оксидативна модифікація протеїнів, індукція відкриття МТР, делеції в ДНК мітохондрій, порушення їх буферної функції відносно іонів  $Ca^{2+}$ , зниження мембранного потенціалу МХ [79]. Враховуючи ту кількість процесів, які забезпечують МХ, не викликає подиву факт незаперечного зв'язку між дисфункцією мітохондрій і патогенезом нейродегенеративних захворювань.

## 1.2. Загальна характеристика хвороби Паркінсона

Симптоми ХП вперше були описані ще в Аюрведі — древньоіндійському медичному тракті, в матеріалах, що датуються 4000-2000 р. до н. е. [4, 12]. У 1817 р. Паркінсон (за прізвищем якого хвороба і отримала свою сучасну назву) детально описав клінічну картину захворювання в монографії «An Assay of the Shaking Palsy». В теперішній час ХП розглядають як хронічне прогресуюче нейродегенеративне захворювання, пов'язане з порушенням діяльності переважно базальних гангліїв головного мозку [63]. Як відомо, зовнішні прояви ХП характеризуються тріадою клінічних ознак — акінезія, ригідність, тремор м'язів [18]. Частота розвитку захворювання складає 65-187 випадків на 100000 населення; початок розвитку захворювання проходить в середньому у віці 57 років. Через 10 років після початку ХП дві третини хворих стають тяжкими інвалідами або помирають; через 15 років відповідна пропорція досягає 80%.

До наших днів ХП кваліфікували як негенетичне захворювання. Враховуючи ж той факт, що ХП відома протягом стількох віків істотних змін у симптоматиці не виявлено (навіть після промислової революції і початку ви-

користання широкого спектру різноманітних фармакологічних агентів), можна вважати, що фактори середовища відіграють не на стільки вже значну роль в генезі симптомів ХП. Механізми виникнення ХП до теперішнього часу лишаються до кінця нез'ясованими. Однак існує декілька гіпотез відносно її патогенезу. Вони пов'язують захворювання, зокрема, з дисфункцією МХ, а також часть з ендотеліальною дисфункцією, з убіквітин-протеосомальною дисфункцією, дією окисного стресу, запаленням, апоптозом, дією токсинів середовища чи підвищеною вразливістю і, як наслідок, ряду інфекцій [116, 140]. Разом з тим, визначити, яким конкретно чином настільки різні патогенетичні події викликають ХП, поки що не вдалося. Різні генотипи пацієнтів, страждаючих ХП, свідчать про наявність не одного, а декількох молекулярно-патогенетичних шляхів розвитку захворювання. Залишається незрозумілим, чи діють вони окремо, чи «зливаються» в один або декілька кінцевих шляхів. Всі такі патогенетичні ланки діють на виживання та/або загибель нейронів у деяких вразливих локусах мозку — перш за все чорної субстанції (*substantia nigra* – SN, ЧС), блакитної плями (*locus coeruleus*), дорсального моторного ядра вагусного нерва. Відомо, що деякі симптоми рухомих порушень при ХП починають проявлятися вже при втраті 60% дофамінергічних нейронів ЧС, але чітко вираженими вони стають лише після загибелі близько 80% цих клітин. Однак на теперішній час доведено, що причинами виникнення ХП та різноманітність її симптоматики обумовлюються ще й адренергічними, норадренергічними та серотонінергічними компонентами [246].

Гістологічною ознакою ХП вважають наявність тілець Леві в тілах нейронів, що вижили, компактної частини ЧС. Тільця Леві — еозинофільні фібрилярні внутрішньоклітинні включення, які складаються з білків, жирних кислот, полісахаридів. Функція тілець, описаних Леві в 1912 році, в патогенезі ХП аж до теперішнього часу не встановлена. Основними білковими компонентами тілець Леві є  $\alpha$ -синуклеїн, білки нейрофіламентів і убіквітин. Про-

те тепер показано, що 25% випадків розвитку ХП не пов'язані (або не супроводжуються) утворенням тілець Леві [113].

Близько 5-10% всіх випадків ХП мають пряму спадкову моногенну основу (фамільна форма ХП), тоді як значна більшість клінічних випадків захворювання відповідають спорадичній (ідіопатичній) формі ХП мультифакторної природи. В теперішній час накопичено достатньо доказів того, що саме дисфункція мітохондрій та окисний стрес (як результат продукції надлишку вільних радикалів в МХ) мають вирішальне значення для патогенетичного каскаду подій при ХП. Зокрема, постійними феноменами в клітинах пацієнтів з ХП є пошкодження субодиниць і дефіцит активності I комплексу дихального ланцюга МХ [106].

Одним із джерел недостатності мітохондрій в дофамінергічних нейронах ЧС може слугувати клональне накопичення в цих клітинах втрат ділянок (делецій) мітохондріальної ДНК. Зокрема, наприклад, направлена делеція гена транскрипційного фактора *A* МХ в дофамінергічних нейронах призводить до розвитку у тварин симптомів ХП, обумовлених порушенням експресії ДНК мітохондрій і дефектами функціонування дихального ланцюга. Було виконано картування 15 локусів моногенних форм ХП, причому лише частина установлених локусів (проте, досить значна, близько 10) можуть бути «відповідальними» за розвиток, наприклад, фамільної форми ХП. Значно менше вивчена роль картованих локусів в розвитку найбільш часто зустрічної спорадичної форми ХП. Оскільки при обох формах ХП спостерігається спільна картина дегенерації дофамінергічних нейронів ЧС, згаданий факт дозволяє припускати існування ряду спільних патогенетичних механізмів [76].

Зв'язок згаданої вище МД і відтак розвиток окисного стресу з патогенезом ХП підтверджується виявленою роллю основних «паркінсонічних» генів — *PARK1* і *PARK4* (кодують  $\alpha$ -синуклеїн), *PARK2* (кодує паркін), *PARK7* (кодує білок DJ-1), *PARK5* (кодує убіквітин-карбоксил-термінальну естеразу L1 — UCH-L1, що складає близько 2% розчинних білків мозку), *PARK6* (ко-

дує білок *PINK1* — мітохондріальну протеїнкіназу) і *PARK8* (кодує протеїн *LRRK2*) [98, 166, 248]. Як згадувалось раніше, з розладами синтезу  $\alpha$ -синуклеїну пов'язують процеси аномальної білкової деградації і розвитку дисфункції мітохондрій. Встановлено, що  $\alpha$ -синуклеїн накопичується в нейронах ЧС і стріатума, знижуючи активність I комплексу дихального центру мітохондрій (звертаємо на це особливу увагу, оскільки такий механізм лежить в основі моделювання експериментального паркінсонізму за допомогою ротенону, про що буде сказано нижче; саме така модель була застосована в нашій роботі), і сприяючи розвитку інтенсивного окисного стресу. Нокаутні по гену паркіна тварини демонструють підвищений рівень біохімічних маркерів окисного стресу і наявності дисфункцій МХ. В той же час асоціація інтенсивно експресуючого паркіна з білком TFAM в культурі клітин істотно покращує біогенез в МХ. Підвищена чутливість DJ-1 – нокаутних мишей до дії токсину МРТР (1-метил-4-феніл-1,2,3,6-тетрагідропіридина) дозволяє припускати участь DJ-1 в антиоксидантному захисті нервових клітин, а також певну роль DJ-1 якості можливого «сенсора» окисного стресу. Результати вивчення генів які кодують протеїнкінази, *PINK1* і *LRRK2*, свідчать про залучення кіназного механізму в реалізацію мітохондріального сценарію клітинної загибелі при ХП. Крім того, в дослідях на культурі дофамінергічних нейронів було показано вплив дефіциту *PINK1* на розвиток морфометрично виявлених аномальних мітохондрій. В той же час було виявлено, що у мишей делеція гена, кодуючого *PINK1*, супроводжується порушенням дихання мітохондрій і підвищенням чутливості до окисного стресу клітин стріатума, але не кори великих півкуль. Це вказувало на специфічність проявлення такого дефекту для дофамінергічних нейронів. Подібна картина дофамінергічної дегенерації і множинних аномалій мітохондрій відмічалася у дрозофіл з мутаціями гена паркіна. Очевидно, *PINK1* і паркін спільно сприяють нормальному діленню мітохондрій і інгібують їх злиття, таким чином, регулюючи динаміку кількості мітохондрій, необхідну для нормальної життєдіяльності нейронів [269].

Як виявилось, гени *PARK* достатньо часто можуть піддаватися невеликим мутаціям, які самі по собі не приводять до маніфестації ХП, але разом з тим істотно підвищує ризик розвитку даної патології. Ця обставина потребує подальших детальних досліджень порушень експресії *PARK* – генів і проявлень їх функції на рівні мітохондрій в специфічних регіонах мозку.

При першому повногеномному аналізі людей з ХП було проведено скринінг близько 200000 однонуклеотидних поліморфізмів у парах відмінних за цією ознакою сиблінгів [96]. Для перевірки сформульованої гіпотези причини розвитку ХП на основі певних однонуклеотидних поліморфізмів та для встановлення внеску 3035 гіпотетичних поліморфізмів, ідентифікованих у парах сиблінгів, дослідження були повторені на незалежній вибірці, що складалася зі хворих та здорових людей. Комбіновані результати обох наведених досліджень дозволили визначити обмежену кількість однонуклеотидних поліморфізмів у різних генах, які істотно корелюють із розвитком ХП. При другому повногеномному дослідженні ХП було розглянуто близько 200 млн. генотипів у хворих та здорових людей (більше 500 осіб) [248].

При картуванні локусу 6q25.2-27, названого *PARK2*, було встановлено його зв'язок з аутосомно-рецесивними формами ювенільного паркінсонізму з типовим віком маніфестації близько 40 років [30]. Ген, що є причиною цього явища, був названий пізніше *PARKIN* (*PRKN*). Він містить 12 екзонів, має розмір 1,53 млн. п.н. та кодує білок із 463 залишків амінокислот (52 кДа) [130]. В японських родинах з аутосомно-рецесивними формами ювенільного паркінсонізму була встановлена наявність гомозиготних делецій у 1-му та 5-му екзонах гена, а у 2 індивідуумів з грецьких родоводів з ранніми маніфестаціями паркінсонізму — делеції в 5-му, 6-му та 7-му екзонах [131, 159]. З того часу багато мутацій гена *PRKN* (таких, як делеції, мультиплікації екзонів, точкові мутації та зсув рамки зчитування) пов'язують з причинами раннього прояву паркінсонізму (у віці до 50 років) [31]. Носії мутації *PRKN* мають типові симптоми ХП з більш повільною прогресією хвороби, більш симетричними

проявами, а також проявом дистонії. На сьогоднішній день у гені PRKN було ідентифіковано вже більше 100 мутацій, що призводять до ранньої маніфестації ХП; вони проявляються приблизно у 50 % випадків при спадковій формі ХП та у 20 % випадків, коли хворих у родині не було [186]. Було показано, що гетерозиготні мутації в PRKN присутні в 50 % випадків, причому як у хворих, так і в контрольній групі. Дослідження проведені на українській популяції також показують високу гетерозиготність за делеціями в PRKN у пацієнтів з ХП [17]. Паркін — це убіквітин лігаза E3, що є відповідальною за приєднання убіквітину до специфічних субстратів, які після цього деградують у протеасомі в убіквітин-протеасомній системі. Мутації в гені PRKN призводять до зменшення функціональності лігази, що, в свою чергу, призводить до убіквітинізації та деградації протеїну, підтверджуючи гіпотезу про те, що деградація та агрегація білків може відігравати провідну роль у патогенезі ХП [83]. Посмертний аналіз мозку хворих вказує на типовість для них втрати нейронів у чорній субстанції, але нейрити Леві у носіїв мутації спостерігаються зрідка. До того ж було показано, що паркін є компонентом тілець Леві при ХП та при деменції з тільцями Леві [90]. Поліморфізм у промоторі гена PRKN (-28T/G) є фактором ризику ХП і впливає на вік маніфестації захворювання.

Посмертне обстеження пацієнтів відзначається втратою нейронів субстанції Нігра, але без вираженої патології тілець Леві. Огляд 77 випадків, проведених Прамсталлером та співавт., зазначив втрату нейронів у пігментованих ядрах стовбура мозку (SN pars compacta [SNpc]), але типову патологію тілець Леві лише у частині випадків [207]. Зовсім недавно Доєрті та співавт. провели патологоанатомічне обстеження пацієнтів із ХП, хворих на іХП та контролів [121]. Серед випадків захворювання, вони виявили вогнищеву дегенерацію чорної субстанції з вентральним переважанням та відсутністю або рідкісною деградацією тілець Леві, при цьому кількість SNpc демонструє

втрату нейронів настільки серйозною, як при іХП, але з відносним збереженням дорсального рівня, легкою втратою нейронів у ТЛ.

Окрім неврологічної патології ХП часто супроводжується вегетативною патологією. Розвиваються певні ускладнення, викликані переважно наступними причинами. Обмеження роботи мускулатури при хворобі Паркінсона неминуче призводить до зменшення інтенсивності кровотоку і зниження рівня обміну речовин. Вже на середніх стадіях розвитку захворювання значно підвищується ризик утворення тромбів і розвитку небезпечних станів. В першу чергу це інфаркт міокарда, стенокардія, серцева недостатність; тромбоемболія легеневої артерії. Рідше спостерігаються ішемічні або геморагічні інсульти. Прикуті до ліжка або малорухомі пацієнти нерідко стикаються з важкими ускладненнями, типу застійної пневмонії; аспіраційної пневмонії (через порушення ковтання їжа потрапляє в дихальні шляхи); інфікування пролежнів і сепсису [54]. Вважають, що найчастішими причинами летальності у хворих з ХП та паркінсонізмом є саме серцево-судинна і легенева патологія [221].

### **1.3. Особливості ультраструктури клітин різних тканин організму при хворобі Паркінсона**

Якщо проаналізувати данні щодо структурних зміни в міокарді при нейродегенеративних захворюваннях, зокрема при ХП, то можна прийти до думки, що основна увага дослідниками приділяється провідній системі серця, а отже атиповим кардіоміоцитам [136]. Причому, препарати серцевої тканини отримують при розтині померлих, або при хірургічних втручаннях лише на одиничних об'єктах, що вказує на необхідність експериментальних досліджень. Імуногістохімічні дослідження на матеріалі, отриманому від пацієнтів з ХП та контрольних осіб дозволили встановити, що захворювання супроводжується помітним зниженням імунореактивності тирозингідроксилази у

нервових волокнах на відміну від встановленої її щільності у здорових осіб. Виснаження тирозингідроксилазної імунореактивності охоплює провідну систему не тільки шлуночків, але також провідну систему та передсердя, що демонструє глобальні зміни в серцевих нервових волокнах при ХП.

Дослідженню піддається дегенерація серцевого симпатичного нерва, котра виникає як при хворобі Паркінсона, так і при деменції з тільцями Леві і починається на ранніх стадіях прогресування ХП [197]. Дегенерація дистальних аксонів серцевого симпатичного нерва передуює втраті їхніх материнських нейронів у паравертебральних симпатичних гангліях, що свідчить про дистальну домінуючу дегенерацію серцевого симпатичного нерва при ХП. В епікардіальних нервових пучках, а саме дистальних аксонах серцевого симпатичного нерва, виявляються агрегати альфа-синуклеїну, і наявність останніх є тісно пов'язаною зі зникненням у аксонах імунореактивності тирозингідроксилази.

Дослідники вважають, що накопичення агрегатів альфа-синуклеїну в дистальних аксонах серцевої симпатичної нервової системи передуює накопиченню нейрональних сомат або нейритів у паравертебральних симпатичних гангліях, що вказує на доцентрову дегенерацію серцевої симпатичної нервової системи [198]. Цей хронологічний і динамічний зв'язок між агрегатами альфа-синуклеїну та дистально-домінуючою дегенерацією серцевої симпатичної нервової системи може представляти патологічний механізм, що лежить в основі загального дегенеративного процесу у серці при ХП.

Як бачимо, основна увага при дослідженні тканини серця все ж приділяється провідній системі серця.

Незважаючи на те, що ХП, яка вважається в основному неврологічним захворюванням, дослідження показують, що пацієнти з ХП мають високу частоту серцево-судинних патологій, які призводять до серцевої недостатності, і що саме вона є другою за частотою причина смерті таких осіб, існують лише поодинокі дослідження змін ультраструктури міокарду за такої патології

[182]. Ремоделювання серця відбувається при накопиченні у кардіоміоцитах нерозчинних агрегатів неправильно згорнутих амілоїдоподібних білків, що є типовими ознаками хвороби Альцгеймера, Паркінсона та Хантінгтона [137]. Однак механізм, що призводить до серцевої дисфункції в клінічних і доклінічних умовах ХП, залишається досі невідомим. Виявляють, що у тварин досимптомно розвивається переміщення коннексину-43 і значна дерегуляція гіпертрофічних маркерів і транскриптів *Vdnf*. Це може супроводжуватись повторною експресією фетальних генів, апоптотичною втратою кардіоміоцитів та помірним ступенем інтерстиціального фіброзу. Автори припускають, що кардіоміопатія, пов'язана з ХП, спричинена зміненими центральними вегетативними шляхами, хоча патогенні ефекти, що діють внутрішньо в серці, також можуть бути фактором, що сприяє розвитку серцевої патології.

Також показано, що артеріальний тиск і барорефлекторна чутливість у щурів, значно знижуються при моделюванні вегетативної дисфункції, що супроводжувалося залежною від часу зміною ортостатичного артеріального тиску, що узгоджується зі змінами ехокардіографії та ультраструктури мітохондрій кардіоміоцитів. Залежні від часу та спільні зміни в *Mon-/Tri- $\alpha$ -синуклеїну* були паралельні з морфологічним чергуванням змін у *NG* вузлі та *nucleus tractus solitarius* [240]. Дослідники вказують на вірогідну етіологію ХП, ініційованої з периферичної, а не центральної ділянки. Дослідження такого механізму забезпечить фізіологічну основу для профілактики та ранньої діагностики ХП.

Ще складнішою є справа відносно досліджень змін ультраструктури легеневої тканини при паркінсонізмі та ХП. Вивчення змін в легенях можна знайти в наукових публікаціях. Проте навіть морфологічні та електронномікроскопічні дослідження головним чином стосуються умов зі змінами багатої лейцином повторної кінази 2. До певної міри це є зрозумілим, оскільки відомо, що багата лейцином повторна кіназа 2 (*LRRK2*) відіграє певну роль у патогенезі різних захворювань, включаючи хворобу Паркінсона, хво-

робу Крона, проказу, рак тощо. Припускають, що LRRK2 бере участь у ряді клітинних біологічних процесів, таких як везикулярний обіг, транскрипція, аутофагія та так звані «лізосомні» шляхи загибелі клітин [185].

Розглядається зв'язок LRRK2 з тау та  $\alpha$ -синуклеїном. Той факт, що всі три білки пов'язані з аутофагією, вказує на стратегію ідентифікації фізіологічного субстрату(ів) LRRK2 [209]. Фенотиповий аналіз мишей з нокаутом LRRK2 виявляє морфологічні зміни в легенях і нирках. Нокаут або інгібування кінази викликає аномальне накопичення в цитоплазмі клітин секреторних органел, пов'язаних з лізосомами, також пластинчастих тілець, у пневмоцитах типу II легень. Результати свідчать про роль LRRK2 в регуляторних процесах, пов'язаних з лізосомами та пластинчастими тільцями і що легенева патологія може бути критичною проблемою безпеки у пацієнтів з ХП при інгібуванні кінази LRRK2 [128].

Навіть електронномікроскопічні дослідження переважно спираються на щурів з нокаутом LRRK2 і показують аномальний фенотип нирок, легенів і печінки. При цьому, у серці та селезінці щурів з нокаутом LRRK2 отримано неоднозначні дані, що може вказувати на один з механізмів органоспецифічності структурних змін при ХП [75]

Нещодавні гістологічні дослідження легенів мишей знову ж з нокаутом LRRK2 (LRRK2  $-/-$ ) виявили значно збільшені пластинчасті (ламелярні – LB) тільця в епітеліальних клітинах альвеолярного типу II. LB – це великі органи, що сприяють синтезу та збереженню легеневого сурфактанту, котрий виділяється в просвіт альвеол при екзоцитозі LB. Подібно до результатів щодо мишей, клітини АТІІ щурів з нокаутом LRRK2  $-/-$  містили значно збільшені (на 50% за об'ємом) LB. Стимуляція клітин АТІІ за допомогою АТФ здатна викликати збільшення екзоцитозу LB. Паралельно також відбувається підвищене внутрішньоклітинне вивільнення  $Ca^{2+}$  при обробці АТФ. Ці висновки свідчать про сильну  $Ca^{2+}$  залежність активності злиття LB і припускають, що LRRK2  $-/-$  впливає на екзоцитарну відповідь у клітинах АТІІ шляхом моду-

ляції внутрішньоклітинної передачі сигналів  $\text{Ca}^{2+}$ . Можливо, таким чином відбувається регуляція секреції та/або екскреції поверхнево-активної речовини, що може покращувати функцію дихання при ХП. Автори відмічають цікавий факт, що компресія везикул з сурфактантом для сприяння вигнанню поверхнево-активної речовини подібні в клітинах з LRRK2 -/- і контрольних тварин. Також дивно, що вивільнення поверхнево-активної речовини (фосфоліпідів) з клітин LRRK2 -/- було знижено після стимуляції екзоцитозу LB, можливо, через порушення дозрівання LB та завантаження LB поверхнево-активними речовинами. Отже досі не сформовано сталої картини відносно змін в легенях при ХП, навіть відносно досить досліджуваного питання – впливу наявності чи відсутності LRRK2. У підсумку результати показують, що LRRK2 -/- впливає на розмір LB, модулює внутрішньоклітинну передачу сигналів  $\text{Ca}^{2+}$  і сприяє екзоцитозу LB при стимуляції клітин АТІІ АТФ [183]. Інші дослідження ультраструктури клітин та клітинних елементів при ХП та паркінсонізмі практично відсутні.

Ще одне питання щодо змін ультраструктури при ХП стосується мієліну. Дослідження нейронів та їх особливостей нами описано, таких відомостей досить багато, вони включають зміни на тканинному, клітинному, органелярному, молекулярному рівнях тощо. Однак, оскільки ХП офіційно не належить до демієлінізуючих захворювань, це питання вимагає розгляду.

Спочатку слід навести загальноживані відомості: «Мієлінову оболонку утворюють гліальні клітини: у периферичній нервовій системі – Шванновські клітини, у центральній нервовій системі – олігодендроцити. Мієлінова оболонка формується з плоского виросту тіла гліальної клітини, що багаторазово обертає аксон подібно до ізоляційної стрічки. Цитоплазма у вирості практично відсутня, у результаті мієлінова оболонка є, по суті, безліч шарів клітинної мембрани» [226]. Приблизно на 70—75 % мієлін складається з ліпідів, на 25—30 % — з білків. Такий високий вміст ліпідів відрізняє мієлін від інших біологічних мембран. Ще одна унікальна особливість мієліну є його

го формування в результаті спірального обвивання відростків гліальних клітин навколо аксонів, настільки щільного, що між двома шарами мембрани практично не залишається цитоплазми. Мієлін є цією подвійною мембраною, тобто складається з ліпідного бішару і білків, пов'язаних з ним. Серед білків мієліну виділяють так звані внутрішні та зовнішні білки. Внутрішні інтегровані в мембрану, зовнішні розташовані поверхово, і тому пов'язані з нею слабше. Мієлін також містить глікопротеїди та гліколіпіди. Така структура мієліну притаманна організму без патології. Демієлінізація характерна для патологічних станів, зокрема нейродегенеративних, до яких належить ХП. Однак досліджень механізмів та причин демієлінізації при ХП існує недостатньо.

Оскільки в нашій роботі ми досліджуватимемо структури головного мозку, то й приділимо увагу саме як ХП, так і ролі олігодендроцитів. Зміни мієліну можуть бути патологічною ознакою нейродегенеративних захворювань. Хоча мікроструктурні відмінності білої речовини описані при хворобі Паркінсона (БП), невідомо, чи включають такі відмінності зміни вмісту та структури мієліну в мозку [119].

Демієлінізацію прийнято розділяти на 2 типи:

- 1) Мієлінопатія - руйнування мієліну через генетичну схильність до швидкого руйнування мієлінової оболонки.
- 2) Мієлінокластія — руйнування вже сформованого мієліну через різні причини, навіть не пов'язані безпосередньо з мієліном (наприклад, при демієлінізуючих захворюваннях).

Ознаки демієлінізації як патологічного процесу виділити не можливо. Симптоми залежать від локалізації демієлінізації у структурах центральної чи периферичної нервової системи [144]. Нас цікавить саме 2-й тип демієлінізації в центральній нервовій системі.

Олігодендроцити тісно пов'язані з нервовими клітинами, і, як і інші гліальні клітини, олігодендроцити надають опору нейронам, а також трофічну підтримку шляхом продукування гліального нейротрофічного фактора

(GDNF), мозкового нейротрофічного фактора (BDNF) та інсуліноподібного фактора росту-1 (IGF-1). При демієлінізуючих захворюваннях олігодендроцити, як вважають, ушкоджуються надмірним вивільненням нейромедіатора глутамату. Також було показано, що пошкодження клітин опосередковане NMDA-рецепторами глутамату [168]. Олігонеїроцити та реактивні астроцити індукуються захворюваннями центральної нервової системи, але їх роль недостатньо вивчена. Клітини індукуються шляхом секреції  $IL-1\alpha$ , TNF і  $C1q$ . Якщо астроцити (реактивні астроцити) втрачають здатність сприяти виживанню нейронів, росту, синаптогенезу та фагоцитозу, то індукують загибель нейронів і олігодендроцитів. Астроцити можуть з'являтися у великій кількості при різних нейродегенеративних захворюваннях людини, включаючи хворобу Альцгеймера, Хантінгтона та Паркінсона. Реактивні астроцити сприяють загибелі нейронів і олігодендроцитів при нейродегенеративних розладах, що призводить до демієлінізації. Дослідники вважають, що вивчення процесів демієлінізації надасть можливості для розробки нових методів лікування захворювань, зокрема й ХП [237].

Однак, наявні на тепер знання, котрі свідчать про те, що неврологічна патологія може бути пов'язана з ураженням мієліну, аксонів і мітохондрій, але молекулярні механізми, що лежать в основі нейропатій, залишаються вивченими вкрай недостатньо. Неповні часто механістичні знання заважають розробці методів лікування, здатних полегшити симптоми та уповільнити прогресування захворювань в довгостроковій перспективі. Слід зазначити, що останнім часом окислювальний стрес був залучений як ключовий компонент пошкодження нервової тканини, зокрема мієліну [249].

Мітохондрії відіграють кілька вирішальних ролей у житті олігодендроцитів, а їх пошкодження сприяє розвитку оксидативних порушень. Доведено, що під час розвитку мієлінової оболонки МХ є основними постачальниками вуглецевих скелетів та енергії для синтезу ліпідів. Під час нормальної роботи мозку їх споживання пірувату буде ключовим фактором, який визначає кіль-

кість лактату, доступного для олігодендроцитів з метою енергетичної підтримки аксонів. Під час розвитку патології мітохондрії можуть індукувати апоптоз. Незважаючи на їх важливі функції, про властивості мітохондрій олігодендроцитів відомо дуже мало, а мітохондрії ніколи не спостерігалися в мієлінових оболонках. Однак нещодавно показано, що мітохондрії здатні входити і рухатися всередині мієлінової оболонки, і їх найбільша кількість визначається в цитоплазматичних гребнях вздовж мієлінової оболонки. На відміну від їхньої поведінки в нейронах та астроцитах, їх рух збільшується, а не пригнічується рецепторами NMDA, що активують глутамат. Ці дані вказують на фундаментальні властивості системи окисного фосфорилування в олігодендроцитах, метаболічну підтримку аксонів, процеси котрі ще тільки почали досліджуватися, особливо в патологічних умовах [213].

#### **1.4. Генетично обумовлені зміни структури клітин та клітинних органел при паркінсонізмі та хворобі Паркінсона**

Як вже зазначалося, ХП радше вікова хвороба, якою страждають 1% людей старше 60 років, зростаючи до 4% у віці 80 років. Однак і особи 18-30 років можуть страждати від ювенільного паркінсонізму, який включає симптоматичний паркінсонізм через пошкодження мозку (травми, токсини, енцефаліт, гіпоксія) та паркінсонізм, що розвивається при інших нейродегенеративних захворюваннях (хорея Хантінгтона, деменція з тілами Леві, мульти-системна атрофія ).

Крім порушень рухової функції, ХП супроводжується порушеннями роботи шлунково-кишкового тракту, нюху, сну, когнітивних та інших розладів. Ці симптоми є результатом втрати функції та / або смерті більшості дофамінергічних нейронів середнього мозку з подальшим порушенням дофамінергічної нейромедіації в спинному стріатумі, де розташовані пресинаптичні закінчення цих нейронів. ХП характеризується прогресивною смертю дофа-

мінергічних нейронів середнього мозку *substantia nigra pars compacta* (SNc) [77] та наявністю внутрішньоклітинних включень, званих тілами Леві, що складаються в основному з агрегованого  $\alpha$ -синуклеїну ( $\alpha$ -Syn) [180, 256].

Спорадична форма ХП пов'язана з різними факторами навколишнього середовища, включаючи вплив нейротоксинів (МРТР), пестицидів та гербіцидів, таких як ротенон та паракват [161, 242].

Спадкові форми, спричинені мутаціями кількох генів, складають 10-15% усіх випадків ХП. В даний час виявлено більше 15 генів спадкових форм паркінсонізму. Мутації в генах LRRK2 (збагачені лейцином повторює кіназу 2) і SNCA (альфа-синуклеїн) є добре відомими причинами аутосомно-домінантної хвороби Паркінсона, мутації в генах Паркін, PINK1 і DJ-1, опосередковують аутосомно-рецесивні та ранні форми ХП [68]. Мутації цих генів тісно пов'язані з дисфункцією мітохондрій та окислювальним стресом [61]. Аксони нігровіагумної системи утворюють один з найдовших шляхів мозку і потребують додаткового АТФ для транспортування компонентів до дистально розташованих синаптичних терміналів, тому патологічні зміни мітохондрій у цьому сенсі слід розглядати як одну з провідних причин нейрональної патології [127, 202]. Дефіцит АТФ і мітохондріального перевантаження  $Ca^{2+}$  може бути пусковим механізмом для нейродегенеративних захворювань [172].

Слід зазначити, що на теперішній час вважають - одним з найбільших успіхів у вивченні хвороби Паркінсона за останні два десятиліття стало краще розуміння генетики ХП. З багатьох досліджених генів-кандидатів найкраще вивчені LRRK2, SNCA, VPS35, Parkin, PINK1 та DJ1. Автори розглядають ключові клінічні особливості цих моногенних форм, а також загальний ген фактора ризику GBA, включаючи фенотип, клінічний перебіг та відповідь на лікування, а також окреслюють напрямки для подальшого вивчення: лонгітюдні дослідження клінічного перебігу ХП, виявлення його пре-моторних проявів та специфічних механізмів патогенності.

Клінічний перебіг та відповідь на лікування хвороби Паркінсона надзвичайно неоднорідні, що створює труднощі як при її лікуванні, так і при розробці нових ефективних лікувальних підходів. Подібним чином етіологія є неоднорідною, багатофакторною та часто складною. Розуміння генетичних причин захворювання та факторів ризику зазнало значного розвитку та уточнення за останні 20 років. Генетичні ризики для ХП можна розділити на такі, що пов'язані з високим ризиком для ХП, та такі, що підвищують ризик ХП на помірний рівень. Мутації, пов'язані з високим ризиком розвитку ХП, часто називають моногенними, менделівськими або причинними і лежать в основі від 5 до 10% випадків ХП [166]. Причинні мутації виникають рідше факторів ризику. У деяких випадках різні зміни в одному і тому ж гені є причинними, тоді як інші вважаються факторами ризику. Класичним прикладом є ген SNCA, який кодує  $\alpha$ -синуклеїн. Рідкісна мутація A53T в гені спричиняє ХП у більшості носіїв, але єдиний нуклеотидний поліморфізм поблизу гена є відомим фактором ризику, що повторюється в багатьох дослідженнях асоціацій, що стосуються всього геному.

До генів, які найчастіше залучені до формування хвороби Паркінсона, і котрі часто називають генами-кандидатами, належать, перш за все такі як PARKIN, PINK1, DJ1. Приділимо їм увагу. Хоча в наших дослідженнях будуть вивчатися гени PINK1 та DJ1, не приділитим увагу гену PARKIN не правильно, оскільки він не тільки був досліджений першим, але й вважається залученим найчастіше у формування ХП, тому й більш вивченим.

#### **1.4.1. Роль генів PARKIN в розвитку хвороби Паркінсона**

Мутації паркінів є найпоширенішою причиною аутосомно-рецесивної ХП і особливо поширені у ХП з початком до 30 років. Ісікава та співавт. характеризували когорту пацієнтів із сімейним ювенільним паркінсонізмом у 1996 р., відзначаючи переважання жінок з молодим початком (середній вік

настання 27,8 років) і повільне прогресування. Фенотип відзначався відносно легким тремором, ригідністю та брадикінезією, з деякими нетиповими особливостями, включаючи помітне замерзання ходи, ретропульсію та дистонію стопи, а також гіперрефлексію, з помітною користю для сну для більшості симптомів; не було відзначено деменції або вегетативних особливостей. Була відзначена відмінна реакція на леводопу [150]. Хатторі та ін. виявили чотири гомозиготних делеційні мутації, і зараз вони підтверджені у багатьох етнічних групах, включаючи європейців, іспаномовних, афроамериканських та північноафриканських [175].

Механізм патогенності залишається незрозумілим. PARKIN - це білок лігази убиквітину E3, який каталізує перенесення убиквітину до його конкретного цільового білка. Кілька цільових білків із широко варіабельними функціями були запропоновані як можливі субстрати PARKIN. В одній якості PARKIN, здається, працює з PINK1 (як буде описано нижче) в органеллярному контролі якості шляхом активації мітофагії в умовах пошкодження мітохондрій [219]. Виявлення механізму специфічних патологічних змін при ХП вимагає подальших досліджень, але враховуючи, що більшість досліджень PARKIN після смерті не демонструють патології  $\alpha$ -синуклеїну, механізм може бути іншим. Для більш точного з'ясування зазначеного механізму у пригоді стають (і можуть стати в подальшому) експериментальні дослідження з моделюванням паркінсонізму.

Мутації PARKIN є найпоширенішою причиною раннього розвитку ХП, визначеного в різних дослідженнях як початок у віці від 40 до 51 року. У мета-аналізі досліджень серед суб'єктів раннього розвитку ХП Кіларський та співавт. виявили частоту мутації 15,5% серед сімейних (хоча значно вища у відомих випадках споріднених клітин у 31,4%) та 4,3% серед спорадичних випадків [158]. Однак було виявлено щонайменше 60 мутацій та варіантів за умов наявності ХП тп паркінсонізму, що створює значні проблеми при визначенні патогенності, яка може змінюватися залежно від конкретної мутації

[142]. Частота алелів може бути етнічно залежною [160], наприклад, Marder та співавт. виявили підвищений ризик мутації PARKIN (співвідношення шансів - 2,8) серед іспаномовних та неіспаномовних білих пацієнтів із ранньою появою ХП [175].

Клінічний фенотип вперше був описаний Ishikawa та співавторами, як зазначено вище, хоча фенотипічна мінливість була зафіксована [117] і частково пов'язана зі специфічними мутаціями. ХП, асоційована з паркіном, має переважно ранній початок; випадки пізнього початку виявляються, але рідше.

У ряді досліджень було виявлено корелятивну залежність когнітивної функції між групами ХП та іХП, визначеної шляхом нейропсихологічного тестування [95]. Однак у носіїв PARKIN можуть бути серйозніші порушення контролю та передачі нервових імпульсів, ніж у носіїв, що може бути важливим при виборі лікування.

Залишається невизначеним, чи гетерозиготні мутації PARKIN несуть ризик для розвитку та тяжкості перебігу ХП [157]. Кілька досліджень свідчать про те, що лише специфічні генетичні мутації (наприклад, дублювання, делеції або точкові мутації у функціонально важливих доменах) збільшують ризик розвитку ХП [157, 200].

#### **1.4.2. Залучення гена PINK1 до формування хвороби Паркінсона**

Мутації PINK1 є другою за частотою причиною ХП після PARKIN, причому деякі з них перекриваються фенотипом PARKIN. Локус вперше був ідентифікований у сицилійській родині (у спорідненості з Марсалою) з чотирма ураженими членами із ранньою появою ХП, з перебігом, що відрізнявся повільним прогресуванням і стійкою реакцією на леводопу. Завдяки аналізу зв'язків було виявлено новий локус у 1p35-p36 [253]. У 2004 р. Валенте та співавт. виявили асоційований білок, мітохондріальну кіназу 1,

PTEN-індуковану кіназу (PINK1) у трьох уражених сім'ях, виявивши дві гомозиготні мутації домену кінази [252]. Згодом Валенте та співавтори відзначили мутацію PINK1 у італійських хворих на ХП із ранньою появою, у північноамериканських, інших європейських та азіатських популяціях. Частота мутацій визначалася від 4 до 7% при спорадичному ранньому розвитку ХП [89, 251].

Валенте та ін., під час досліджень культури клітин, PINK1 з'ясували, що він локалізується в мітохондріях [252], і імпортується туди шляхом таргетингу. PINK1 - це серин / треонінкіназа, яка містить критичні регуляторні ділянки. Мутації, що призводять до повної втрати активності кінази, пов'язані з ранньою появою ХП [248]. PINK1 здатний функціонувати найбільш помітно разом з Паркіном в активації мітофагії, накопичуючись на зовнішній мітохондріальній мембрані в умовах пошкодження мітохондрій [248]. Конкретний механізм патогенетичної ролі при ХП на сьогодні незрозумілий і вимагає подальшого дослідження.

Однак, попри це, вивчення ролі PINK1, як одного з генів-кандидатів, котрий відіграє помітну роль у формуванні ХП, проводяться досить активно. Перші дослідження відзначали типовий паркінсонізм повільної прогресії, з хорошою та стійкою реакцією леводопу та мінімальною когнітивністю [251]. Пізніші дослідження відзначали деякі нетипові особливості, включаючи дистонію та користь сну, як це спостерігається у Паркін, а також гіперрефлексію [148].

Гіпосмія є загальним симптомом в PINK1 ХП [125]. Наслідки для гетерозигот залишаються суперечливими, але гетерозиготність може бути фактором ризику для пізньо проявленої ХП [60]. Серед уражених носіїв кардинальні риси та вік початку захворювання залишались однаковими між гомозиготною та гетерозиготною групами, з тенденцією до більшої кількості порушень ходи в гомозиготній групі, але в умовах більшої середньої тривалості

захворювання. У доклінічному стані гетерозиготи можуть виявляти гіпосмію [155].

Кількість посмертних обстежень PINK1 є дотепер дуже обмеженою. Повідомляється про посмертне обстеження у двох пацієнтів із ХП PINK1 з атиповою патологією тілець Леві. У гетерозиготного пацієнта з ранньою появою ХП Саммаранч та співавт. відзначали втрату нейронів у SNpc, патологія ТЛ в атиповому розподілі за участю ретикулярних ядер, SNpc та ядра Мейнерта [227]. Нещодавно у гомозиготного пацієнта з ранньою появою симптомів ХП, Таканасі та співавт. Не виявили патології тілець Леві, крім кількох невритів нюхового нерва, але відзначали помітну депігментацію сінуклеїну та тілець Леві [241]. Отже вивчення ролі PINK1 у формуванні ХП є безперечно на часі.

#### **1.4.3. Участь гена DJ1 у розвитку хвороби Паркінсона**

Ван Дуйн та співавтори на початку 2000-их вперше виявили локус у 1p36, окремо від PARK6, у спорідненій голландській родині з ранньою появою ХП [255]. Потім Боніфаті та ін. ідентифікували ген DJ1 у голландській та італійській сім'ї відповідно. Фенотипом серед чотирьох суб'єктів була ХП із ранньою появою (всім <41 рік), у одного - блефароспазм, у двох - лікування леводопою з хорошою реакцією, а у одного - коливання рухів [88]. Частота мутацій, очевидно, від 0 до 1% у пацієнтів з ХП із ранньою появою [66, 235].

DJ-1 є надзвичайно цікавим об'єктом для дослідження, оскільки має значну кількість сигнальних шляхів в клітині та принаймні 7 основних найважливіших ефектів. При цьому він був, як вказувалося, відкритий досить недавно, проте встановлено, що його рецесивні мутації пов'язані з формуванням ювенільного паркінсонізму, котрий хоча піддається деякій корекції, однак не виліковується і на довгі роки погіршує якість життя молодих людей.



3. В ядрі DJ-1 діє як транскрипційний коактиватор NF- $\kappa$ B і подальша транскрипція гена, що кодує UCP4. Індуковане UCP м'яке роз'єднання може зменшити виробництво АФК.
4. DJ-1 запобігає потенційно токсичній агрегації  $\alpha$ -syn шляхом активації деградації  $\alpha$ -syn за допомогою опосередкованої шапероном аутофагії (CMA).
5. DJ-1 стимулює ендогенну антиоксидантну систему шляхом активації Nrf2.
6. DJ-1 підвищує і стабілізує Bcl-xL в мітохондріях, запобігаючи апоптозу.
7. DJ-1 позитивно регулює p53 за допомогою супоміляції, опосередкованої топорами. Надмірна експресія DJ-1 зменшує експресію Bax та інгібує апоптоз. DJ-1 також забороняє PTEN активувати шлях PI3K / PKB (Akt).

Нокаут гена DJ-1 зменшує експресію двох роз'єднуючих білків мітохондрій (UCP4 та UCP5 - див. рис. 1.1), погіршує функцію індукованого кальцієм роз'єднання та збільшив окислення матричних білків у substantia nigra pars compacta (SNc) дофамінергічних нейронів. Недавні дослідження показали, що DJ-1 захищає дофамінергічні нейрони від окисних ушкоджень не тільки *in vitro*, але і *in vivo* [243]. Окислений DJ-1 суттєво знижується в ідіопатичному мозку ХП, що дає змогу припустити складну функцію, контрольовану DJ-1, котра може відігравати роль у більшій поширеності спорадичної форми захворювання, ніж вважалося дотепер [206].

Білок DJ-1 має значну кількість специфічних механізмів захисту дофамінергічних нейронів від нейродегенерації при хворобі Паркінсона. DJ-1 дикого типу може діяти як датчик окисного стресу та як антиоксидант; проявляє властивості молекулярного шаперону, протеази, гліоксалази, регулятора транскрипції, який захищає мітохондрії від окисного стресу; збільшує експресію двох роз'єднуючих білків мітохондрій (UCP 4 і UCP5), які зменшують

потенціал мітохондріальних мембран і призводять до пригнічення продукції активних форм кисню, оптимізують ряд функцій мітохондрій і розглядаються як захист виживання нейрональних клітин. Стабілізація взаємодії DJ-1 з мітохондріальним білком Bcl-xL, який регулює активність IP3R (рецептора трифосфату інозиту), запобігає вивільненню цитохрому c з мітохондрій та інгібує активацію апоптозу. Під час окисного стресу DJ-1 здатний регулювати різні фактори транскрипції, включаючи ядерний фактор Nrf2, PI3K / PKB та p53 сигнальних шляхів. В свою чергу, активований стресом фактор транскрипції Nrf2 регулює шляхи захисту клітин від окисного стресу та метаболічні шляхи, що ініціюють продукцію NADPH та АТФ. Показано, що DJ-1 здатний індукувати дисоціацію Nrf2 від його інгібітора Keap1 (Kelch-подібний білок 1, пов'язаний з ECH), сприяючи транслокації ядер Nrf2, що є зв'язаним з елементами антиоксидантної відповіді. До того ж DJ-1 має комплексний модулюючий ефект на шляху p53: одна сторона DJ-1 безпосередньо зв'язується з p53, щоб відновити свою транскрипційну активність, а з іншого боку DJ-1 може стимулювати деацiliaцію і пригнічувати транскрипційну активність p53. Здатність DJ-1 індукувати активацію різних факторів транскрипції та змінювати окислювально-відновну рівновагу захищає нейрони від агрегації  $\alpha$ -синуклеїну та індукованої олігомером нейродегенерації.

Якщо підбити загальний підсумок щодо ролі описаних та досліджуваних нами генів у формуванні та розвитку ХП можна навести наступні відомості (табл. 1.1).

Отже, в якості висновку слід зазначити, що одним з найбільших успіхів у дослідженнях ХП за останні два десятиліття є краще розуміння генетики ХП. Багатство генетичних досліджень допомагає підтвердити клінічне спостереження, що ХП - це не одне захворювання з єдиним патогенезом та природним перебігом. Однак велика частина генетичних факторів у розвитку ХП ще не розкрита. Мутації в генах, викладених вище, є лише у невеликої меншості людей із ХП; причини недуги у більшості випадків залишаються нез'я-

сованими. Крім того, незважаючи на велику роботу, механізми, за допомогою яких мутації цих генів викликають паркінсонізм, залишаються в основному невідомими.

*Таблиця 1.1*

Основні генетичні причини та фактори ризику хвороби Паркінсона: етнічний розподіл, фенотипові характеристики, невропатологічні дані та наслідки гетерозиготності та / або дозування генів

<b>Гени</b>	<b>Населення</b>	<b>Фенотип</b>	<b>Патологія</b>	<b>Вплив гетерозиготності</b>
Parkin	Світовий	Ранній початок захворювання з повільним темпом прогресування. Помірні кардинальні риси з деякими нетиповими рисами (дистонія, помітне завмирання ходи), з перевагою сну при більшості симптомів. Менше когнітивних порушень, ніж при іХП, але більш серйозні порушення контролю імпульсів	Втрата нейронів чорної субстанції без вираженої патології ТЛ	Можливий фактор ризику з видаленнями, дублюваннями або точковими мутаціями у функціонально критичних доменах

Гени	Населення	Фенотип	Патологія	Вплив гетерозиготності
PINK 1	Світовий	Рано розпочате захворювання із повільним темпом прогресування; хороша відповідь леводопи Деякі нетипові ознаки: дистонія та користь для сну	Обмежені повідомлення (n = 2) Втрата нейронів Substantia nigra з розрідженою патологією або відсутністю патології ТЛ	Можливий фактор ризику розвитку пізньою ХП
DJ1	Голландці, італійці	Ранній початок розвитку ХП із зареєстрованим блефароспазмом; хороша реакція леводопи, але з руховими коливаннями	Немає наявності	Невідомо

На сьогоднішній день більшість генетичних досліджень у ХП є більшою мірою на рівні спостережень. Дослідження описують поширеність, фенотип та клінічний перебіг носіїв мутацій. Серед відомих в даний час генетичних причин та факторів ризику клінічний фенотип, включаючи прояв рухових та немоторних симптомів, і швидкість прогресування сильно варіюють; ці характеристики повинні ретельно досліджуватися та враховуватися при індивідуальному клінічному лікуванні. Дослідники висловлюють сподівання, що генетична інформація може зрештою призвести до нових терапевтичних підходів, що будуть спрямовані на метаболічні шляхи задіяних генів.

## 1.5. Хвороба Паркінсона і порушення активності мітохондріальних ферментів

Мітохондріальна ДНК (мтДНК) людини дуже компактна і не містить інтронів. Незважаючи на те, що у власному геномі мітохондрій закодований основний апарат синтезу білків, сам процес синтезу у великій мірі залежить від ядра, яке "поставляє" ферменти для реплікації, репарації, транскрипції і трансляції. Ця залежність лежить в основі причин ряду недавно відкритих захворювань, що характеризуються вторинними аномаліями мтДНК [23, 72].

Найбільш поширена причина мутацій мтДНК — вільні радикали активних форм кисню, що генеруються самим же дихальним ланцюгом. Вони викликають пошкодження клітинних мембран і тим самим сприяють збільшенню швидкості мутацій мтДНК в різних тканинах і органах. Тканини мозку особливо вразливі до окислювального пошкодження через високий вміст легкоокислюваних ненасичених жирних кислот, високої швидкості споживання кисню і відносно низькій концентрації антиоксидантних ферментів в порівнянні з іншими органами [71, 261]. Мітохондріальна ДНК ще більш чутлива до цих пошкоджень, ніж ядерна, через сусідство джерела активних форм кисню — дихального ланцюга, - відсутність захисту гістонів і недостатньо ефективної системи репарації, ось чому мтДНК мутує з великою швидкістю. В останні роки переважає точка зору, що саме мутації мтДНК вносять вирішальний внесок у патофізіологічні зміни і, в першу чергу, нейродегенерацію, пов'язану як з формуванням патологічних станів, так і зі старінням [54, 81]. Крім високої частоти соматичних мутацій, характерною рисою мтДНК також є генетичний поліморфізм. Існують припущення, що поліморфізм мтДНК може створити найтонші відмінності в кодованих нею білках і, таким чином, викликати мінімальні зміни в активності ферментів окисного фосфорилування і в більшій продукції вільних радикалів. Це могло б зумовлювати у індивідів або у популяції з відповідним генотипом мтДНК ранній

початок апоптичних процесів: накопичення мутацій мтДНК і пошкодження системи окисного фосфорилування. Навпаки, у популяції з іншим генотипом мтДНК може спостерігатися "корисна" підвищена швидкість окисного фосфорилування і зменшення утворення активних форм кисню. Поліморфізм мтДНК дозволяє виділити безліч специфічних для кожної популяції генотипів мітохондрій, названих гаплотипами. У Європі розрізняють дев'ять мітохондріальних гаплотипів (H, I, J, K, T, U, V, W, X) [7, 169]. Ряд експериментальних робіт свідчить про зв'язок деяких мітохондріальних гаплотипів зі збільшенням тривалості життя, однак, достовірні механізми цьому зв'язку ще не встановлені [147, 178]. Спроби прояснити зв'язок специфічного генетичного поліморфізму з клінічними проявами деяких нейродегенеративних захворювань привели до суперечливих результатів. Відзначається зв'язок поліморфізму мтДНК з ризиком розвитку ХП [17, 107, 179]. Таким чином, незважаючи на очевидну ключову роль мітохондрій у розвитку нейродегенеративних захворювань, пов'язаних або й не пов'язаних зі старінням, все ще не ясно до кінця, чи є окислювальний стрес і мітохондріальні дисфункції причиною виникнення та прогресування цих захворювань, або ж всі ці порушення — лише наслідки нейродегенерації.

Зв'язок між хворобою Паркінсона і мітохондріальними порушеннями вперше був встановлений в 1989 році. У чорній субстанції, а потім і в периферичних тканинах хворих ХП було виявлено 25-35% інгібування активності компонента дихального ланцюга комплексу I (мітохондріальної протон-транслокуючої NADH: убіхінон-оксидоредуктази). Разом з цим, з'ясувалося, що дія токсину 1-метил-4-феніл-1,2,3,4-тетрагідропіридин (MPTP), що викликає хронічний паркінсонізм у людей і в модельних дослідах на тваринах, призводить до дефіциту активності комплексу I [10, 15, 230]. У клітинах глії MPTP перетворюється моноаміноксидазою B (MAO B) в активний нейротоксин MPP<sup>+</sup> (іон N-метил-4-фенілпіридин), який за допомогою дофамінового транспортера надходить в дофамінергічні нейрони, де накопичується

в мітохондріях, пригнічуючи комплекс I. Останнє призводить до гальмування синтезу АТР, акумуляції вільних радикалів і загибелі клітин [120, 266]. У модельних дослідах на тваринах було показано, що хронічний системний вплив іншого інгібітора комплексу I, пестициду ротенон, викликає загибель дофамінергічних нейронів в чорній субстанції, пошкодження протеасомної системи, білка DJ-1, включення  $\alpha$ -синуклеїну та поведінкові симптоми (брадикінезію, м'язову ригідність, порушення постави, скутість рухів), характерні для ХП [67, 171]. Інгібіторами комплексу I є й інші нейротоксини: паракват, МАНЕБ, 6-гідроксидофамін (інгібує також мітохондріальний комплекс IV і моноаміноксидазу), що викликають ознаки ХП у людей і експериментальних тварин [205].

Виявлення взаємозв'язку між зниженням активності комплексу I і симптомами ХП залишало відкритим питання про роль функціональної недостатності комплексу I в патогенезі паркінсонізму. Досліджені аутопсійні препарати мозку були взяті від пацієнтів, які довгий час страждали ХП і отримували цілий ряд ліків, наприклад, леводопа. Однак, в смугастому тілі у них не спостерігалось недостатності активності комплексу I, яку можна було б очікувати на підставі модельних дослідів на щурах за токсичністю леводопа. Більш того, у пацієнтів з множинною системною атрофією, які отримували леводопа протягом того ж часу і в тих же кількостях, що й пацієнти з ХП, була виявлена недостатність функцій мітохондрій в чорній субстанції [56]. Немає даних про те, що інші лікарські препарати, включаючи агоністи дофаміну та інгібітори MAO B (моноаміноксидаза), гальмують активність комплексу I [53].

Услід за повідомленням про недостатність комплексу I в чорній субстанції пацієнтів з ХП, аномалії дихального ланцюга були виявлені в мітохондріях скелетних м'язів хворих паркінсонізмом, правда, результати, отримані різними дослідниками, не узгоджувалися між собою. Потім зниження активності комплексу I було знайдено і в мітохондріях тромбоцитів хворих ХП. В

цьому випадку результати різних лабораторій збігаються і свідчать про зниження активності комплексу I на 20-25% [7]. На жаль, такий рівень падіння активності комплексу I не дозволяє використовувати його в якості біомаркера ХП [42]. Крім того, порушення енергетичного обміну при ХП може бути пов'язано зі зниженням активності мітохондріального поліферментного комплексу — (КГД), що каталізує одну з ключових реакцій меланок метаболізму — окислювальне декарбоксілювання кетоглутарату, єдину реакцію циклу Кребса, що приводить до утворення макроергічного зв'язку на субстратному рівні. Інактивація КГД при ХП може викликатися дією вільних радикалів, а може бути обумовлена генетичними порушеннями. Той факт, що МРТР і МРР<sup>+</sup> інгібують КГД *in vitro*, стимулював дослідження активності цього поліферментного комплексу в мозку хворих ХП. Було показано зниження активності КГД в чорній субстанції пацієнтів з ХП і зменшення імуного забарвлення на вміст КГД пропорційно ступеню тяжкості захворювання. Генетичні дослідження також підтверджують роль КГД в етіології ХП. Біалельний поліморфізм гену компонента E2  $\alpha$ -кетоглутаратдегідрогеназного комплексу виражається в одонуклеотидній заміні аденіна (алель 2) на гуанін (алель 1), що не відображається на амінокислотній послідовності ферменту. Тим не менш, в хворих ХП частота генотипу людей, що несуть алель 2, істотно вища ніж в контрольній групі, що свідчить про приналежність даної мутації до факторів ризику, якщо мова йде про ХП [55, 92, 232].

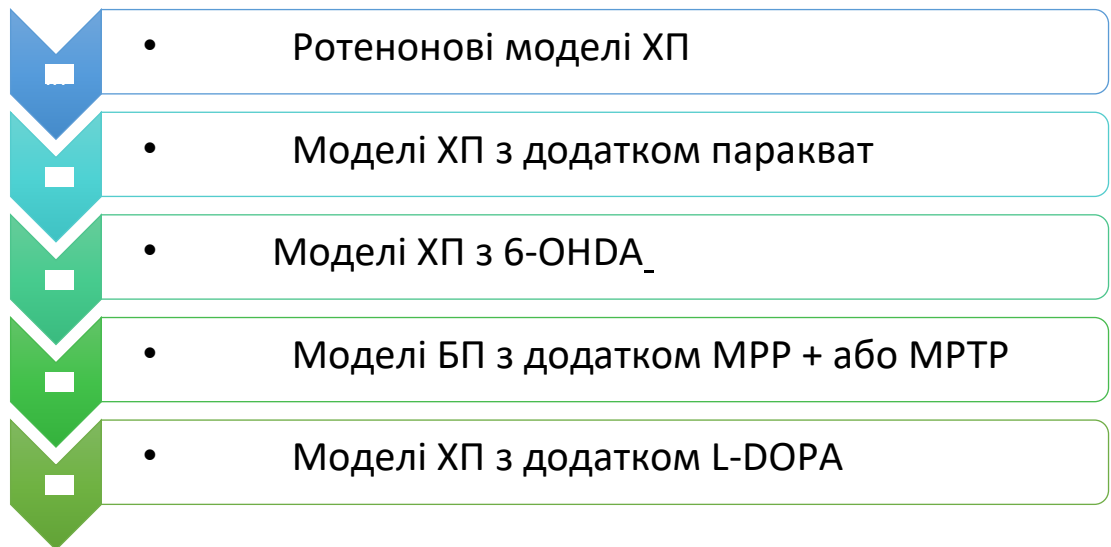
В експериментах *in vitro* була показана чутливість ліпоаміддегідрогенази, компонента E3 піруватдегідрогеназного,  $\alpha$ -кетоглутаратдегідрогеназного комплексів і комплексу дигідрогенази  $\alpha$ -кетокислот з розгалуженим ланцюгом, до МРТР і МРР<sup>+</sup> в складі мультиферментних комплексів E3 бере участь в окисненні пірувату,  $\alpha$ -кетоглутарату і  $\alpha$ -кетокислот з розгалуженим ланцюгом. Ліпоаміддегідрогеназа, що знаходиться на внутрішній поверхні внутрішньої мембрани мітохондрій, в присутності іонів цинку і NADH здатна перетворювати компонент дихального ланцюга мітохондрій коензим Q

(убіхінон) в убіхінол. Ця відновлена форма убіхінона (QH<sub>2</sub>), вміст якої в тканині невеликий в порівнянні з окисненою формою, вона володіє ще більшими антиоксидантними властивостями і таким чином виконує нейропротекторну функцію. Як наслідок, інгібування ліпоаміддегідрогенази приведе до зменшення концентрації убіхінона, який перешкоджає утворенню токсичних радикалів, що може викликати окислюючий стрес, індукуючий ХП [8, 123, 233].

### **1.6. Загальноприйняті експериментальні моделі хвороби Паркінсона**

Проблемою для досліджень патогенезу хвороби Паркінсона є неможливість забору матеріалу від пацієнтів з даною патологією, тому практично повністю відсутня можливість спостереження за процесами, що протікають в живих клітинах людини при ХП. Відомі моделі хвороби Паркінсона *in vivo* (на живих організмах) і *in vitro* («в пробірці»). Найбільш наближеними до процесів людських клітин є моделі патології *in vivo* на тваринах, проте при їх використанні виникають складнощі з відтворюваністю результатів, труднощі утримання чистих ліній тварин і обґрунтування використання моделей *in vivo* перед етичним комітетом [105].

Останнім часом все більше застосування знаходять моделі *in vitro*. Вважають, що клітинні культури можуть бути універсальним методом для дослідження «фізіологічних» і патологічних явищ, з'ясування механізмів передачі сигналу, регуляції експресії генів, клітинної проліферації, а також механізмів їх загибелі. Дані моделі повністю не виключають моделі *in vivo*, а є хорошим до них доповненням, дозволяючи досліджувати фізіологічні явища і механізми патогенезу захворювань, з'ясувати механізми передачі сигналу, регуляції експресії генів, клітинної проліферації і загибелі [138, 259].



**Рис. 1.2.** Приклади моделей хвороби Паркінсона

З моделей *in vitro* головним чином використовуються моделі з додатком екзогенних (ротенон, паракват і МРТР) і ендогенних (6-гідроксидофамін, MPP<sup>+</sup>, L-DOPA) нейротоксинів [214, 225]. Для моделювання використовуються культури нейронів, астроцитів і клітин мікроглії, що становлять функціональну мережу в цитоархітектоніці головного мозку, що контактують один з одним за допомогою нейрон-гліальних взаємодій і підтримують гомеостаз головного мозку.

Серед моделей хвороб Паркінсона *in vivo* розрізняють моделі генетичні (нокаутні і трансгенні моделі), нейротоксичні (системне введення нейротоксинів) і стереотаксичні (стереотаксичне введення ротенон, паракват, 6-ОНДА, MPP<sup>+</sup>, МРТР, метамфетаміну, дегуеліна та інших нейротоксинів) (рис. 2.1) [82, 106, 177].

З екологічної точки зору особливий інтерес представляє широке використання органічних пестицидів, зокрема, пестициду ротенон. Було показано, що ротенон є причиною селективної дегенерації дофамінергічних нейронів при системному застосуванні у щурів, пригнічуючи мітохондріальний комплекс I і викликаючи дестабілізацію мікротрубочок [24, 153].

Розрізняють моделі «гострого» (короткочасного) і «хронічного» (тривалого) введення ротенона. Цікаво, що при хронічному введенні ротенона запускається комплекс плейотропних реакцій, як патологічних, пов'язаних із загибеллю клітин (пошкодження ДНК, старіння і загибель клітин), так і фізіологічних (транскрипційні шляхи, епігенетичні регуляторні шляхи та ін.), спрямованих на виживання клітин [211]. Так звані нейротоксичні моделі хвороби Паркінсона *in vitro* є корисними моделями для вивчення окремих аспектів нейротоксичності, дослідження «фізіологічних» і патологічних явищ, розробки персоніфікованих моделей хвороби Паркінсона у людини. Цікава роль моделей ХП *in vitro* і як альтернативних моделей для первинного скринінгу лікарських речовин, та пошуку нових ефективних шляхів корекції патології, що значно зменшить використання тварин в експериментах *in vivo*. Створення цих моделей стає особливо актуальним в світлі застосування на практиці концепції "three R" ("The three Rs"), якої пропонують дотримуватися при проведенні експериментів на тваринах: replacement - заміни (такою заміною на етапах первинного скринінгу лікарських речовин можуть бути моделі *in vitro*), reduction - зменшення кількості тварин, refinement - підвищення якості досліджень (принцип реалізується при виборі адекватних моделей створення патологій, в тому числі і моделей *in vitro*) [1, 57].

Незважаючи на всі перелічені можливості дослідження моделей хвороби Паркінсона на культурі клітин, результати можуть бути спірними по відношенню до паркінсонічних моделей на живих організмах. Попри розповсюдження моделювання *in vitro* такі результати не можна прямо переносити на ті механізми, що відбуваються в організмі, оскільки в культурі відсутня нейрогуморальна регуляція.

### 1.6.1 Експериментальні ротенонові моделі хвороби Паркінсона на щурах

Як вже вказувалося вище, з екологічної точки зору особливий інтерес представляє застосування для моделювання паркінсонізму ротенона, через його широке використання в якості органічного пестицида. Ротенон — рослинна речовина, є специфічним інгібітором мітохондріального комплексу I з високою спорідненістю до нього. Ротенон є гідрофобною речовиною, легко перетинає біологічні мембрани. Було показано, що ротенон є причиною селективної дегенерації дофамінергічних нейронів при системному застосуванні у щурів [263]. Серед безлічі інших варіантів експериментальних моделей хвороби Паркінсона на тваринах, ротенонові моделі звернули на себе увагу з двох причин: 1) на відміну від інших моделей, ротенон відтворює більшість симптомів розладу рухів і гістопатологічні особливості хвороби Паркінсона (зокрема, утворення тілець Леві); 2) ротенон є потужним інгібітором мітохондріального дихання і останні епідеміологічні дослідження показали важливу роль ротенону та інших пестицидів у розвитку спорадичного паркінсонізму у населення сільської місцевості [31, 94].

Одним із зручних об'єктів для створення моделі хвороби Паркінсона *in vivo* є щури. Важливою перевагою лабораторних щурів як модельних об'єктів є легкість і зручність в їх утриманні і розведенні, наявність стійкості до інфекційних захворювань, порівняно невелика тривалість життя і хороша здатність до відтворення. Цікавим фактом є спостереження, що щури реагують на плацебо, як і людина, і, відповідно, є адекватною моделлю для вивчення плацебо [163]. Моделі з системним введенням ротенона класифікують як моделі з підшкірним і внутрішньошкірним, інтраназальним, оральним/інтрагастральним, внутрішньоочеревинним і підшкірним введенням [24]. У ротенонових моделях *in vivo* також розрізняють моделі «гострого» (короткочасного) і «хронічного» (тривалого) системного введення

ротенон, а також моделі зі стереотаксичним введенням ротенон в структури мозку з відстроченим розвитком ушкоджень. Найчастіше моделювання хвороби Паркінсона *in vivo* проводиться на самцях щурів Sprague-Dawley вагою 480-520 г, 300-325 г, 220-240 г, лінії Lewis масою 300-350 г і Wistar, 220-250 г. Відомо, що напівлетальна доза (LD50) ротенону для щурів коливається від 25 до 132 мг / кг ваги. Моделі «гострого» системного введення ротенону включають його введення в міні-помпах в концентрації 10-18 мг / кг ваги в протягом 7-9 днів, при цьому лише у деяких тварин розвинулася акинезія і ригідність м'язів. Однак було виявлено, що високі дози ротенону, як правило, викликають смерть тварин від системних ускладнень і не встигають викликати специфічні пошкодження середнього мозку [24, 201]. Серед моделей «хронічного» системного введення ротенону розрізняють модель підшкірного введення в масляній емульсії / в соєвому маслі в дозуванні 2 мг / кг ваги протягом 3-5 тижнів, модель дворазового (вранці о 8.00 і ввечері о 20.00) підшкірного введення ротенону в більш низьких дозуваннях (по 1 мг / кг ваги) протягом 30 днів або 40 днів, модель внутрішньочеревного введення ротенону в масляній емульсії в дозуванні 1,5 і 2,5 мг / кг ваги протягом 60 днів, модель внутрішньочеревного введення ротенону в розчиннику (98% мігліол 812 N і 2% ДМСО) в дозуванні 2,75-3,0 мг / мл / кг ваги тварини) протягом 20 днів з початку ін'єкцій, модель з підшкірними ін'єкціями емульсії ротенонних мікросфер протягом декількох тижнів з поступовим зниженням концентрації ротенону і моделі з низькими концентраціями ротенону: модель з градієнтним зниженням дози (перші два дні підшкірно вводився ротенон в концентрації 2 мг / кг ваги, потім ще 4 дні - з концентрацією 1 мг / кг ваги і решту 22 дня ротенон вводився в дозуванні 0,5 мг / кг ваги) і модель з постійною низькою концентрацією ротенону - 0,5 мг / кг ваги протягом 28 днів [24, 58, 85, 260].

Іншим варіантом моделей хронічного підшкірного введення ротенону є моделі з підшкірним вшиванням осмотичних міні-помп фірми Millipore, де

ротенон вводився протягом 30 днів-5 тижнів з моменту імплантації міні-помпи в концентрації 2-3 мг / кг ваги в день в розчиннику - диметилсульфоксиді (ДМСО) і поліетиленгліколь 300 (ПЕГ-300), 1: 1 або протягом 6 днів в концентрації 3 мг / кг ваги. Існують також варіанти, коли ротенон вводився в яремну вену через канюлю, з'єднану з міні-помпою. Таким способом ротенон вводили внутрішньовенно в різних дозуваннях (від 1 до 12 мг / кг ваги щурів), зупинившись на концентрації ротенону 2-3 мг / кг ваги в день. Тривалість введення ротенону також коливалася від 7 днів до 5 тижнів. На моделях з системним введенням ротенону щурам виявлені такі ефекти: дисфункція мітохондрій, порушення кальцієвої проникності в мітохондріях і генерація активних форм кисню та азоту, призводять до окислювального стресу [82, 259].

Однак, незважаючи на широке використання моделей з системним введенням ротенону, в літературі описано, що моделі з гострим введенням ротенону викликають дегенерацію не substantia nigra середнього мозку, а інших структур - striatum і globus pallidus, у щурів також відзначалася загибель від кардіоваскулярних ускладнень. Згідно з іншими даними, при системному введенні лише близько 20% введеного ротенону потрапляє в головний мозок, а 80% обумовлює периферичну токсичність внутрішніх органів щурів [25, 234].

Але токсичність на внутрішні органи зникає при стереотаксичному введенні ротенону. Показано, що на стереотаксичних моделях з введенням ротенону в SN можна проводити патофізіологічні і патогенетичні дослідження, як і у випадку моделей з тривалим системним введенням ротенону [24].

Отже, у якості висновку слід підкреслити. Усі структурно-функціональні перебудови в мітохондріях супроводжуються генетично обумовленими процесами [204]. Описані вище уявлення висвітлюють переважно дослідження, котрі стосуються нервової тканини, хоча доведено, що причинами летальності при ХП є переважно бронхопневмонії або серцево-

судинна патологія [167]. Таких досліджень є значно менше, що не дає сформувати завершену картину механізмів виникнення патологічних змін, що є необхідним для пошуку ефективних шляхів терапії ХП з метою поліпшення якості життя пацієнтів. У зв'язку із зазначеним, метою даної роботи було дослідження змін структурно-функціонального стану мітохондрій та експресії генів PINK1 та DJ1 в тканинах мозку – довгастому мозку і стріатумі та тканині легень та серця при експериментальному паркінсонізмі та його патогенетичному лікуванні.

### **1.7. Деякі підходи до лікування хвороби Паркінсона та супутньої вісцеральної патології**

Ще кілька десятиліть тому паркінсонізм вважався і реально був практично невиліковним захворюванням. Натепер є певний ряд досягнень в цій області. Однак мова йде лише про симптоматичну і патогенетичну терапію, оскільки етіологічного лікування цього захворювання не розроблено, на жаль, і до теперішнього часу [112, 152]. Інакше кажучи, це питання залишається відкритим і досить актуальним для всіх дослідників ХП.

До групи протипаркінсонічних препаратів, що застосовуються в лікуванні переважно рухових проявів ХП належать препарати леводопи, агоністи дофамінових рецепторів (АДР), препарати амантадин, інгібітори моноамінооксидази типу В (МАО-В) і антихолінергічні засоби [52, 114]. Препарати леводопи є "золотим стандартом" в терапії ХП, хоча і мають цілком певні обмеження у вигляді побічних проявів та ускладнень при тривалій терапії. Основна дія леводопи полягає в заповненні дефіциту дофаміну, що спостерігається при загибелі нігростріарних нейронів. Сам дофамін не здатний проникати через гематоенцефалічний бар'єр (ГЕБ), тому для лікування ХП використовується його безпосередній попередник, здатний проникати через

гематоенцефалічний бар'єр, - леводопа, яка перетворюється в дофамін шляхом декарбоксілювання.

Протягом 2009-2012 рр. серед хворих на ХП загальна смертність складала 9,9%. Причому смертність від хвороби системи кровообігу становила 27,6%, від безпосередніх наслідків основного захворювання – 36,2%, від хвороб органів дихання – 12,1% [190]. Тобто кількісно патологія серцево-судинної системи та системи дихання є величинами одного порядку з причинами, пов'язаними з нейродегенерацією [222]. Отже, своєчасна корекція супутніх захворювань повинна бути віднесеної до основної стратегії задля збільшення тривалості життя (та його якості) таких хворих.

Таким чином, проведений аналіз наявної наукової літератури свідчить, що попри більш, ніж 200-річні дослідження, присвячені вивченню патогенетичних механізмів виникнення та розвитку хвороби Паркінсона, до теперішнього часу не сформовано єдиної сталої картини, яка б дозволила об'єднати усі наявні дані щодо фізіологічних, генетичних, біохімічних механізмів формування захворювання. Ще менше даних існує відносно супутньої вісцеральної патології, зокрема тієї, що стосується серцево-судинної та дихальної патології, що робить ХП коморбідною патологією, яка при наявності порушень транспорту та утилізації кисню повинна супроводжуватися гіпоксичним станом і порушенням енергетичного метаболізму. Дані відносно означених процесів є необхідними для пошуку нових ефективних шляхів корекції порушень, що виникають як в тканинах мозку, так і в інших органах і системах. Дослідники вважають, що для отримання таких даних адекватними є, поряд проведенням обстежень пацієнтів з ХП, дослідження при моделюванні експериментального паркінсонізму.

## РОЗДІЛ 2.

### МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

#### 2.1. Об'єкти дослідження

##### 2.1.1. Експериментальні дослідження

Дослідження проведені на 57 статевозрілих щурах-самцях лінії Вістар масою 250-300 г. Всі тварини утримувалися в віварії Інституту Фізіології ім. О. О. Богомольця та мали вільний доступ до їжі та води. Щури були розподілені на 6 груп: 1) контроль (n=8), 2) тварини, котрим ротенон вводили однократно п/ш в дозі 0,3 мг/100 г маси тіла (n=10), 3) тварини, котрим ротенон вводили п/ш, щоденно протягом 2-х тижнів в дозі 0,3 мг/100 г маси тіла (n=10), 4) тварини, котрим ротенон вводили п/ш, щоденно протягом 2-х тижнів в дозі 0,3 мг/100 г маси тіла з паралельним застосуванням урідину – активатора АТФ-залежного  $K^+$  каналу, в/о в дозі 0,3 мг/100 г маси тіла (n=10), 5) тварини, котрим ротенон вводили п/ш, щоденно протягом 2-х тижнів в дозі 0,3 мг/100 г маси тіла з паралельним застосуванням урідину – в/о в дозі 0,3 мг/100 г маси тіла та 5-гидроксидеканоат (5НД) – інгібітора АТФ-залежного  $K^+$  каналу, в дозі 0,5 мг/100 г маси тіла (n=7), 6) тварини котрим ротенон вводили п/ш, щоденно протягом 2-х тижнів в дозі 0,3 мг/100 г маси тіла з паралельним застосуванням препарату капікор - в/о, щоденно протяглім 2-х тижнів в дозі 0,5 мг/100 г маси тіла (n=12). Слід зазначити, що введення контрольним тваринам урідину та 5НД не супроводжувалося достовірними змінами досліджуваних параметрів, тому аналіз таких даних нами не проводився.

### 2.1.2. Обстеження пацієнтів з хворобою Паркінсона

Проведено обстеження пацієнтів ( $n = 22$ ), що мали встановлений діагноз хвороби Паркінсона зі стадією хвороби 3,0 за Хен-Яром, котрі перебували на базисній терапії леводопамісними препаратами в комбінації з іншими протипаркінсонічними засобами (агоністи дофамінових рецепторів, амантадин, холінолітики тощо). Після обстеження пацієнтам застосовували препарат капікор за схемою: 2 капсули на добу протягом 2 міс. (АТ «Олайн-фарм», Латвія); 1 капсула містить - 180 мг мельдоній дигидрата і 60 мг гамма-бутиробетаїн дигидрата.

Капікор® позиціонується виробниками як комбінований антишемічний цереброкардіоваскулярний препарат, відновлюючий функцію ендотелію. Проте він має ширші можливості, оскільки мельдонію дигідрат впливає на індукцію біосинтезу NO, захищає клітини від токсичного впливу вільних радикалів, нормалізує оксидантний гомеостаз на клітинному рівні, позитивно впливає на функцію ендотелію; гамма-бутиробетаїну дигідрат гальмує транспорт довголанцюгових жирних кислот і їх метаболітів в мітохондріях, завдяки зниженню біосинтезу карнітину, що сприяє збереженню аеробного шляху метаболізму в умовах тканинної гіпоксії, запобігає виснаженню запасів АТФ і креатинфосфату в клітинах [13]. Отже цей препарат може одночасно позитивно впливати на зменшення вмраженності як ендотеліальної, так і мітохондріальної дисфункції.

Усі обстеження та експериментальні дослідження проводилися з дотриманням положень Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей (Страсбург, 1986), загальних етичних принципів наукових досліджень, ухвалених Першим національним конгресом України з біоетики (вересень 2001 року), Закону України № 3447-IV «Про захист тварин від жорстокого повод-

ження» (2006 р), положень Конвенції з біоетики Ради Європи (1997 року), Гельсінської декларації Всесвітньої Медичної Асоціації (1996 року) та інших міжнародних угод та національного законодавства у цій галузі, що було підтверджено комітетом біомедичної етики Інституту фізіології ім. О. О. Богомольця.

## **2.2. Підготовка препаратів для електронномікроскопічних та морфометричних досліджень**

Щурів декапітували під слабким ефірним наркозом. У тварин відбирали шматочки тканини з ідентичних ділянок нижніх часток обох легень, з верхівки серця, довгастого мозку на 8-12 мм від Брегми та стріатуму. Фіксацію матеріалу проводили згідно із загальноприйнятою методикою негайно, вносячи зразки тканин в забуферений 2,5% розчин глютарового альдегіду (0,1 М фосфатний буфер, рН – 7,4). Дофіксація матеріалу здійснювалася за допомогою реактиву Колфілда (на основі 2% розчину чотириокису осмію, рН-7,4) (реактиви фірми Sigma, США). В подальшому проводили зневоднення матеріалу в спиртах зростаючої концентрації, абсолютних спирті і ацетоні з наступною заливкою в епон-аралдіт (реактиви фірми Fluka, Швейцарія) [14].

Ультратонкі зрізи товщиною 40-60 нм для перегляда в електронному мікроскопі контрастували 1% розчином уранілацетату і 0,4% розчином цитрату свинцю (реактиви фірми Sigma, США) за методикою Рейнольдса [262]. Перегляд препаратів здійснювали за допомогою електронного мікроскопа ПЕМ - 125К (Україна).

Морфометричні дослідження проводили, базуючись на підходах Вейбеля [51, 258] з використанням комп'ютерної програми для морфометричних підрахунків Image Tool (США) на 130-150 полях для кожного досліджуваного впливу.

В експериментальних дослідженнях визначали: загальну кількість мітохондрій (nMX), кількість структурно пошкоджених мітохондрій (dMX), діаметр мітохондрій (D), суму поверхонь мітохондрій в одиниці об'єму тканини ( $Si_{tot}$ ) [51], а також проводили оцінку структурно пошкодженого мієліну (M) - площу його пошкодження (в % до загальної площі мієлінових волокон на одиниці поверхні тканини).

### **2.3. Полярографічний метод дослідження функціонального стану мітохондрій**

Для вивчення окисного фосфорилування у мітохондріях головного мозку, серця та легень застосовували таку схему (всі маніпуляції виконувалися при 40° С). Після декапітації щурів тканини швидко виділяли та промивали охолодженим розчином 0,9%-й KCl, подрібнювали та гомогенізували у 5-кратному об'ємі середовища (250 ммоль/л сахарози, 20 ммоль/л тріс-НСІ буфера, 1 ммоль/л ЕДТА, 1мг/мл БСА; рН 7,4). Для виділення мітохондрій гомогенат центрифугували 7 хв при 1000 g. Потім супернатант центрифугували 15 хв при 12 000 g. Осад суспендували в невеликому об'ємі середовища без додавання ЕДТА і БСА та зберігали на льоду. Процеси дихання та окисного фосфорилування в мітохондріях вивчали за стандартних умов за допомогою полярографічного методу з використанням закритого електрода Кларка та оксиграфа (Standart Охуgraph System, «Hansatech», Велика Британія). Функціональний стан мітохондрій вивчали за методом Chance, Williams [101], використовуючи середовище інкубації (300 ммоль/л сахарози, 2 ммоль/л НСІ-буфера, 1 ммоль/л  $NaH_2PO_4$ ; рН 7,4). Реєстрували стаціонарну швидкість дихання у стані 4 ( $V_4 s$ ) за умов окиснення субстрату (5 ммоль/л сукцинату чи 10 ммоль/л глутамату +2,5 ммоль/л малату) за відсутністю АДФ; швидкість активного дихання при додаванні 300 мкмоль/л АДФ ( $V_3$ ); швидкість контрольованого дихання ( $V_4$  АТФ), коли в системі відбувається

вичерпання доданого акцептора фосфора - АДФ; дихальний контроль (V3 /V4 АТФ), що є показником ефективності регуляції дихання мітохондрій та коефіцієнт ефективності фосфорилування (АДФ/О), який відображає кількісний зв'язок між споживанням O<sub>2</sub> і синтезом АТФ [124].

#### 2.4. Генетичні методи дослідження

Виділення РНК із зразків (зондів) (P0, n = 8,6–30 м, n = 4 на кожную групу) було досягнуто за допомогою RNeasykit (Sigma-Aldrich) відповідно до протоколів, наданих виробником, результати були кількісно оцінені з використанням UV / візуального спектрального фотометра (NanoDropND-1000, Reqlab, Ерланген, Німеччина). cDNA була синтезована з 1 мг загальної РНК з використанням високої ємності cDNAR everse Transcription Kit from Applied Biosystems (Дармштадт, Німеччина). Кількісний ланцюг полімерази реакційних (PCR) пар праймерів були розроблені для SYBR-Green на основі кількісної полімерази зворотної транскрипції в режимі реального часу ланцюгової реакції (qRT-PCR). Наступні цільові праймери для генотипування були використані в PCR-аналізі [118, 181]:

**PARK 7 / DJ-1:** 5'-TATTGGGCCTTTCTCTTGGA; 5'-TGGGAGTGACAGTCTCAGTGG, 5'-AGCTATGA GGCCCTTCCTGT  
**PINK 1:** 5'-CCTACACACAGCCCTCACCT, 5'-CCCTGGCTGACSTATCC, 5'-CCACCACCCACTACCCTACT

qRT-PCR проводили з використанням PCR kit SEN YBRG reen (AppliedBiosystems) згідно з протоколами, наданими виробником. Розраховували відносну експресію білка як  $2^{-\Delta C_t \text{ specific gene}} / 2^{-\Delta C_t \text{ mean (housekeeping genes)}}$ , використовуючи гліцеральдегідфосфатдегідрогеназа як ендogenous контрольний ген housekeeping genes. Для відносної кількісної оцінки (RQ), застосовували порівняльний метод C<sub>t</sub> ( $\Delta - \Delta C_t$ ); результати представлені щодо виразу lev-elat P0. Всі кодуєчі області та межі екзон-інтронів генів PINK1 та DJ-1 були

проаналізовані за допомогою гетеродуплексного аналізу з подальшим прямим секвенуванням виявлених варіантів. Ці варіанти були оцінені за допомогою веб-програм SIFT, PolyPhen, HSF та LOVD [212].

## **2.5. Дослідження клітин крові у пацієнтів з хворобою Паркінсона**

Збагачену тромбоцитами (з вмістом лейкоцитів) плазму отримували центрифугуванням цільної крові, отриманій з ліктьової вени пацієнтів, при кімнатній температурі протягом 15 хв при 120g на центрифугі лабораторної Т-30 (Україна). Плазму акуратно відокремлювали від осілих клітин і центрифугували при 2000g протягом 20 хв за допомогою міні-центрифуги Vortecs Combispin FVL-2400N (Латвія) [139]. В тромбоцитах визначали: кількість  $\delta$ - та  $\alpha$ -гранул, а також кількість та діаметр мітохондрій в досліджуваних клітинах крові.

## **2.6 Методи статистичного аналізу**

Отримані експериментальні дані обробляли методами варіаційної статистики. Статистичну обробку результатів здійснювали з використанням комп'ютерної програми STATISICA 6. Числові дані були представлені як Результати у роботі представлені у вигляді «середнє значення  $\pm$  стандартна похибка середнього». Таке представлення є коректним, оскільки відповідно до критерію Шапіро-Уїлкі (W) отримані результати вкладалися в нормальний закон розподілу [32].

Для оцінки достовірності отриманих результатів використовували однофакторний дисперсійний аналіз One-Way ANOVA з застосуванням порівняльного Post Hoc тесту Ст'юдента-Ньюмена-Кеулса. Результати вважалися статистично значущими при  $p < 0,05$ .

## РОЗДІЛ 3.

### РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ

#### **3.1. Вивчення впливу ротенону на ультраструктуру тканин мозку, серця та легень**

##### **3.1.1. Дослідження впливу однократного введення ротенону на ультраструктуру тканин довгастого мозку, серця та легень**

На теперішній час серед моделей так званого токсичного паркінсонізму *in vivo* у щурів найбільш поширеними є моделі одностороннього ушкодження середнього мозку ін'єкціями 6-гідроксидофаміна (6-OHDA) і двостороннього ураження *substantia nigra* середнього мозку системним введенням ротенону.

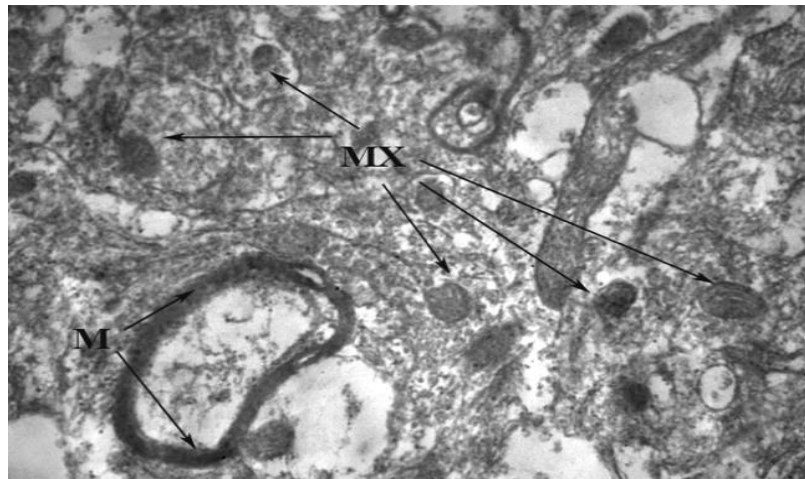
Ротенонова модель - одна з моделей токсичного паркінсонізму, що викликає нігростріальну дегенерацію у гризунів, схожу за патогенетичними механізмами і симптомами на хворобу Паркінсона [24, 94]. Серед інших варіантів експериментальних моделей хвороби Паркінсона, ротенонові моделі звертають на себе увагу, тому що вони відтворюють як більшість симптомів розладу рухів, так і гістопатологічні особливості хвороби Паркінсона (наприклад, утворення тілець Леві) [201]. Так відомо, що в патогенезі ХП у людей виявляється мітохондріальна дисфункція, окислювальний стрес, ексайтотоксичність, дисфункція убіквітин-протеасомного шляху і апоптоз [20]. На моделях з системним введенням ротенону у щурів також виявлена дисфункція мітохондрій і генерація активних форм кисню та азоту, що призводять до окислювального стресу [201].

Однак, при системному введенні ротенону, особливо при високих дозуваннях (10-18 мг / кг ваги), спостерігається токсичне ураження органів і загибель частини тварин [264]. Можливими варіантами для зниження токсичності є введення ротенону у значно меншому дозуванні, наприклад, як було застосовано нами – усього 0,3 мг/100 г маси тіла. Однак при такій концентрації ротенону слід показати, чи відбуваються зміни, принаймні на тканинному рівні, та з'ясувати їх вираженість.

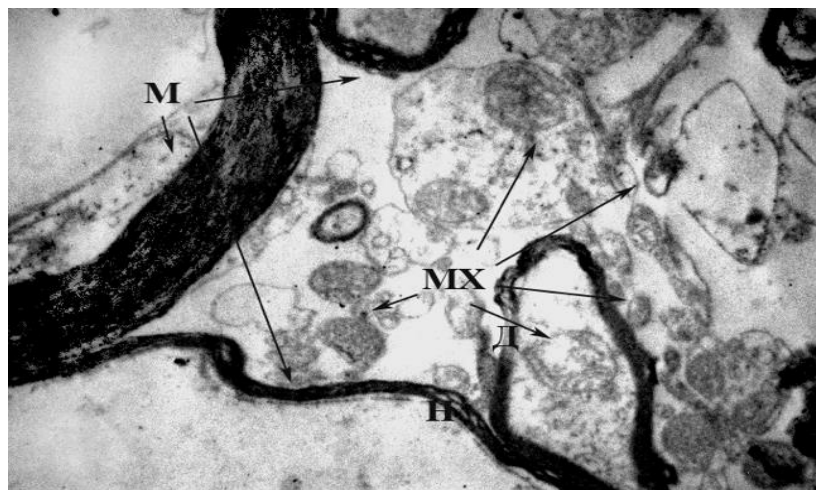
Як показали наші дослідження, по-перше, при однократному введенні за час експерименту не було виявлено загибелі тварин, проте зміни, що відбувалися в морфофункціональному стані тканин довгастого мозку щурів при моделюванні паркінсоноподібного стану, в порівнянні з контрольною групою (рис. 3.1) були істотними.

Найбільше пошкоджувалася під дією ротенону серед досліджуваних тканин ультраструктура довгастого мозку (рис. 3.2). Причому виявлено порушення структури мієліну з набряком та деструкцією мієлінових волокон; клінічним проявом останнього вважають формуванням судорожних станів. На цей факт слід звернути певну увагу (ретельно про пошкодженні мієліну при ХП та паркінсонізмі буде зазначено далі) оскільки на теперішній час, навіть в далеко неповному, хоча і великому сучасному переліку демієлінізуючих захворювань хвороба Паркінсона і паркінсоноподібні стани відсутні [22].

Щодо МХ, то більшість органел мали змінену структуру: мала місце часткова або повна вакуолізація, руйнування МХ; утворення септованих МХ, у яких збільшена загальна кількість компартментів, різке обводнення матриксу, подекуди спостерігалася деструкція крист. Утворення септованих МХ визначають як «вогнищеву дегенерацію» або як «парціальний некроз» клітин [65]. Цей ефект найчастіше спостерігають у кардіоміоцитах (див. нижче), однак, під впливом ротенону такі зміни не були притаманні тканині серця, а виявлялися в нейронах довгастого мозку [269].



**Рис. 3.1.** Ультраструктура тканини довгастого мозку контрольного щура. MX – мітохондрії, М – мієлінова оболонка. Зб. 9600



**Рис. 3.2** Ультраструктура тканини довгастого мозку щура після введення ротенону. MX – мітохондрії, М – мієлінова оболонка, Д – деструкція, Н - набряк. Зб. 9600

Щодо MX, то більшість органел мали змінену структуру: мала місце часткова або повна вакуолізація, руйнування MX; утворення септованих MX, у яких збільшена загальна кількість компартментів, різке обводнення матриксу, подекуди спостерігалася деструкція крист. Утворення септованих MX визначають як «вогнищеву дегенерацію» або як «парціальний некроз» клітин

[65]. Цей ефект найчастіше спостерігають у кардіоміоцитах (див. нижче), однак, під впливом ротенону такі зміни не були притаманні тканині серця, а виявлялися в нейронах довгастого мозку [269].

Результати морфометричної і стереометричної оцінки МХ в тканині довгастого мозку щурів при моделюванні паркинсоноподібного стану наведені в таблиці 3.1.

Таблиця 3.1

Морфометричні та стереометричні характеристики мітохондрій після одnorазового введення ротенону у тканині довгастого мозку щурів ( $M \pm m$ )

Групи щурів	Загальна кількість мітохондрій, од/10 мкм <sup>2</sup>	Кількість структурно змінених мітохондрій, %	Діаметр мітохондрій, мкм	Сума поверхонь мітохондрій в одиниці об'єму тканини, мкм <sup>2</sup>
Контрольна	14, 5±0,5	2,1±0,3	0,20±0,02	3,9±0,3
Дослідна	9,6±1,2*	43,2±6,3**	0,73±0,06*	2,7±0,4*

Примітки:

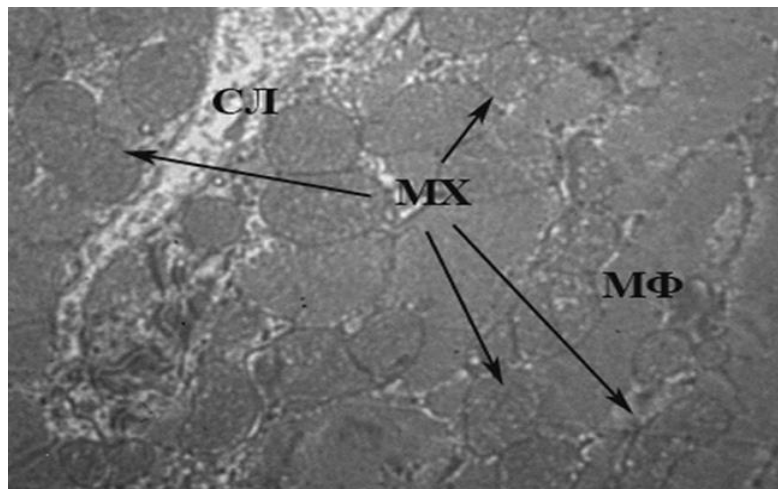
\* — відмінності достовірні відносно контрольних величин ( $p < 0,05$ );

\*\* — відмінності достовірні відносно контрольних величин ( $p < 0,01$ );

Характер порушень ультраструктури довгастого мозку дає підстави стверджувати, що це єдина з досліджених нами тканин, де знизилася загальна кількість мітохондрій. Результати з таблиці 3.1 виявилися достовірними і вказували на гальмування морфогенезу мітохондрій в тканині. Кількість структурно змінених мітохондрій досягала майже половини всіх органел. Різко зростав середній діаметр мітохондрій, що може вказувати на переважання органел з вираженим ступенем набухання, котрий прийнято розглядати як одну зі стадій загибелі органел за некротичним типом з утворенням

гігантських МХ [195]. Сума поверхонь мітохондрій в одиниці об'єму тканини зменщувалася в 1,5 рази. Ці зміни пов'язані як з руйнування МХ, так і з гальмуванням утворення нових МХ. Отже, можна констатувати наявність мітохондріальної дисфункції, а отже і порушення енергетичного метаболізму мозкової тканини.

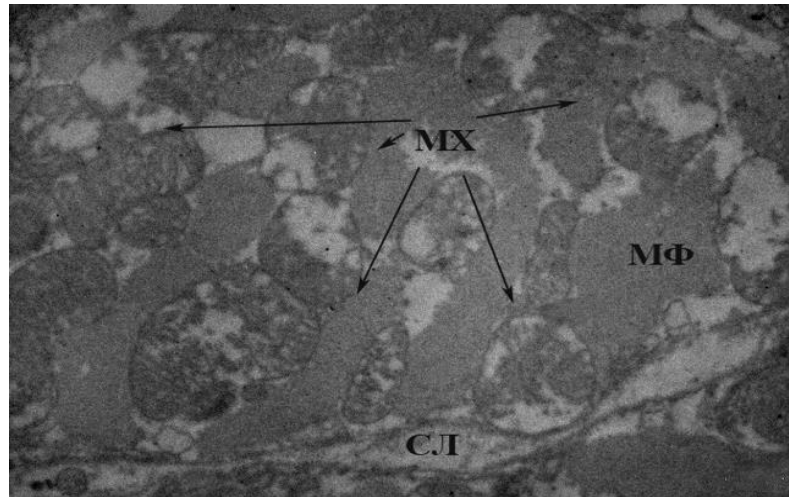
Електронномікроскопічні дослідження тканини міокарду контрольної групи показують нормальну структуру сарколеми, чіткий контур мітохондрій, відсутність будь-яких проявів набряку або деструкції (рис. 3.3).



**Рис. 3.3.** Ультраструктура міокарду щура контрольної групи. МХ – мітохондрії, СЛ – сарколема, МФ - міофібрили. Зб. 12000

У групи тварин з однократним введенням ротенону були виявлені суттєві порушення ультраструктури міокарда у вигляді набряку та часткового порушення структури міофібрил; набряку та деструкції ендотелію капілярів, що є свідченням наявності ендотеліальної дисфункції, завдяки чому еритроцити мали змогу виходити у перикапілярний та навколклітинний простір; набряку та розривів сарколеми (рис. 3.4); різкого розширення цистерн саркоплазматичного ретикулуму, отже, ймовірно, відбулися зміни обміну кальцію, що може розглядатися як передумови для розвитку кардіоміопатії при формуванні паркінсоноподібного стану. Порушення ультраструктури МХ носили

мозаїчний характер: часткова та повна вакуолізація; руйнування МХ мембран (рис. 3.4) [176]. Порушення ультраструктури МХ носили мозаїчний характер: часткова та повна вакуолізація; руйнування МХ мембран.



**Рис. 3.4.** Ультраструктура міокарду щура після введення ротенону. МХ – мітохондрії, СЛ – сарколема, МФ - міофібрили. Зб. 12000

Оцінка морфо- і стереометричних характеристик мітохондрій тканини міокарду показала наступне (табл. 3.2). Зростала загальна кількість МХ на одиницю площі міокарда. При цьому відбувалося збільшення як субсарколемальної (СС), так і інтраміофібрилярної (ІМФ) популяцій МХ. Найбільш істотними з досліджуваних показників, були зміни кількості структурно пошкоджених мітохондрій. Показано, що при розвитку в організмі паркинсоноподібного стану більше 1/6 органел СС субпопуляції і більше як 1/5 МХ з ІМФ субпопуляції були структурно зміненими. Достовірно зростала сума поверхонь мітохондрій на одиницю об'єму тканини серця в обох субпопуляціях (табл. 3.2), що є підтвердженням компенсаторної активації морфогенезу МХ в міокарді, спрямованої на підтримання адекватного енергетичного метаболізму [245].

Таблиця 3.2

Морфометричні та стереометричні характеристики мітохондрій після одnorазового введення ротенону у міокарді (M±m)

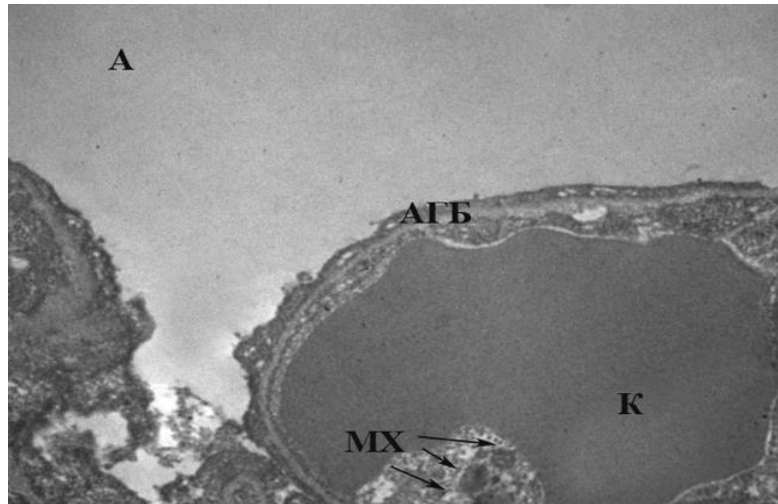
Групи щурів	Загальна кількість мітохондрій, од/10 мкм <sup>2</sup>		Кількість структурно змінених мітохондрій, %		Діаметр мітохондрій, мкм		Сума поверхонь мітохондрій в одиниці об'єму тканини, мкм <sup>2</sup>	
	СС	ІМФ	СС	ІМФ	СС	ІМФ	СС	ІМФ
Контрольна	12,8 ±0,8	9,7 ±1,0	4,0 ±0,6	3,3 ±0,5	0,52 ±0,03	0,66 ±0,07	7,8 ±0,9	6,9 ±1,0
Дослідна	15,7 ±1,0*	11,1 ±0,8*	15,6 ±1,3*	18,0 ±2,0	0,81 ±0,04 *	0,96 ±0,06 *	9,3 ±0,6*	8,7 ±0,7*

Примітка:

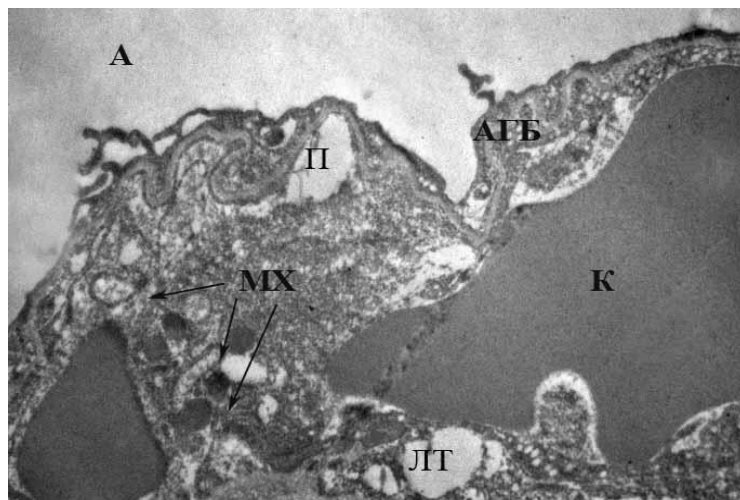
\* — різниця достовірна відносно контролю (p<0,05)

З 3-х досліджуваних тканин найменші зміни в МХ спостерігалися під впливом ротенону у тканині легень в порівнянні з контролем (рис. 3.5).

Переважаюча різниця виражалася у помітному набряку, а також у помітних проявах аутофігії. Загальний стан тканини легень був також зміненим, але не критично: відмічався набряк та подекуди деструкція АГБ та його шарів; локальний підендотеліальний набряк з утворенням оводнених пухирів; пригнічення сурфактантної системи із запусіванням ламеллярних тілець (рис. 3.6).



**Рис. 3.5.** Ультраструктура тканини легень щура контрольної групи. МХ – мітохондрії, А – альвеола, К – капіляр, АГБ – аерогематичний бар'єр. Зб. 6200



**Рис. 3.6.** Ультраструктура тканини легень щура після введення ротенону. МХ – мітохондрії, А – альвеола, К – капіляр, АГБ – аерогематичний бар'єр, П – пухир локального набряку, ЛТ – ламелярні тільця. Зб. 6200

У ході дослідження не були відзначені різко виражені порушення ультраструктури МХ. Результати морфометричної і стереометричної оцінки МХ в тканині легенів наведені в таблиці 3.3.

Таблиця 3.3

Морфометричні та стереометричні характеристики мітохондрій після одноразового введення ротенону у тканині легень ( $M \pm m$ )

Групи щурів	Загальна кількість мітохондрій, од/10 мкм <sup>2</sup>	Кількість структурно змінених мітохондрій, %	Діаметр мітохондрій, мкм	Сума поверхонь мітохондрій в одиниці об'єму тканини, мкм <sup>2</sup>
Контрольна	10,3±0,5	3,8±0,8	0,42±0,03	6,6±0,4
Дослідна	9,6±0,6	5,1±0,4*	0,51±0,04*	6,2±0,5

Примітка:

\* — різниця достовірна відносно контролю ( $p < 0,05$ )

Загальна кількість мітохондрій в порівнянні з контролем майже не змінилася, кількість структурно змінених мітохондрій сягала лише 5,1% (тенденція до зміни  $0,1 < p < 0,2$ ). Сума поверхонь мітохондрій в одиниці об'єму тканини залишалась рівною контрольній групі.

Отже, при одноразовому введенні ротенону про наявність МХ та ендотеліальної дисфункції та оксидативного стресу повною мірою можна говорити щодо мозкової тканини, частково — про тканину серця; у тканині легень такий вплив виражених змін не викликає.

### 3.1.2. Дослідження впливу тривалого введення ротенону на ультраструктуру тканин довгастого мозку, стріатуму, серця та легень

Перш, ніж надати результати змін ультраструктури досліджуваних тканин після тривалого введення ротенону, слід зазначити, що нами було відмічено загибель тварин, котра становила 25-40% у групах щурів, котра не залежала від сезону дослідження, середньої маси тварин. На початку та напри-

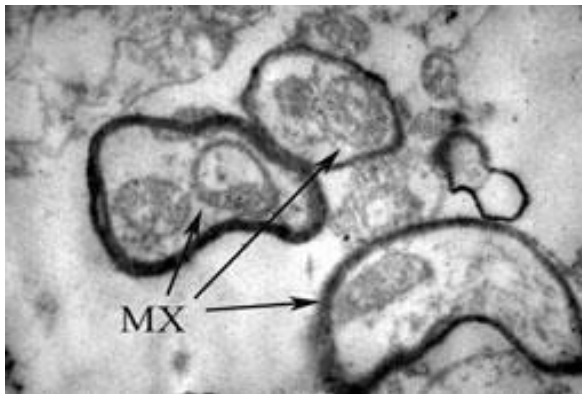
кінці періоду моделювання експериментального паркінсонізму спостерігалися клінічні прояви, такі як гіпокінезія, слинотеча, ригідність м'язів, втрата маси тіла (на 10-15%), до чого з часом додавалися напади каталепсії, птоз, наростаючу ригідність м'язів тулуба та кінцівок, характерний „горбатий силует”, явища постуральної нестабільності, трофічні виразки шкіри (рис. 3.7).



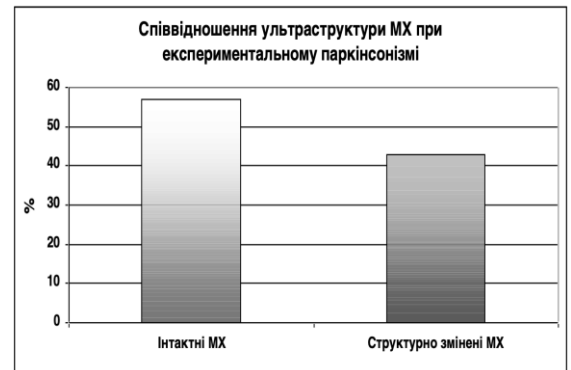
**Рис.3.7.** Зовнішній вигляд тварини після тривалого введення ротенону.

Тривале введення ротенону (Р) найбільш виражено поглиблює прояви мітохондріальної та ендотеліальної дисфункції, а відтак й оксидативного стресу саме у **довгастому мозку**, оскільки ротенон здатний акумулюватися в МХ мозку, де порушуючи перенос електронів у МХ дихальному ланцюгу та інгібуючи активність комплексу I, викликає накопичення вільних радикалів, що поряд з окисним стресом, призводить до змін внутрішньоклітинного балансу іонів кальцію, зменшенню утворення АТФ, порушенню процесів синтезу білків, деполімеризацію мікротрубочок [55, 79]. Все це в подальшому може стати безпосередньою причиною пошкодження нервової тканини із загибеллю клітин за апоптотичним та/або некротичним типом. Тривале вве-

дення Р посилювало компартментизацію МХ, що вказувало на активну «вогнищеву дегенерацію» клітин, більше 40% органел виявлялися структурно зміненими (Рис. 3.8 а,б). До того ж загальна кількість мітохондрій достовірно знижувалася з  $14,3 \pm 2,1$  до  $9,2 \pm 1,4$  од./10  $\mu\text{m}^2$ ,  $p < 0,05$ .



а



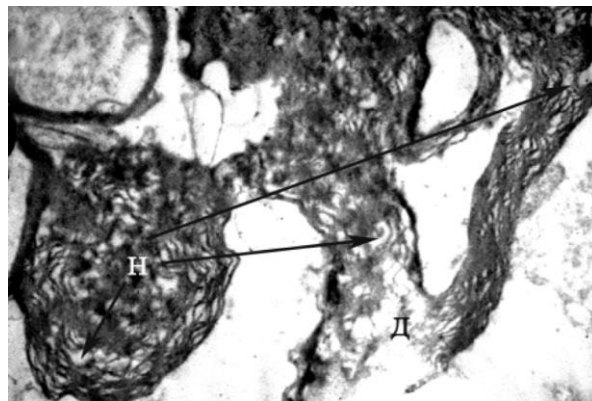
б

**Рис. 3.8.** Ультраструктура мітохондріального апарату довгастого мозку при тривалому введенні ротнону. МХ – мітохондрії. Зб. 16000

Механізми і причини утворення септованих мітохондрій досліджені недостатньо, а концепція їх утворення і ролі ще не сформована. Припускають, що цей процес подібний до осмотичного набухання і викликається порушенням транспорту метаболітів між внутрішньою мембраною мітохондрій і цитоплазмою. Крім того, є роботи, в яких показано, що мітохондрії при фрагментації акумулюють  $\text{Ca}^{2+}$  [97]. Оскільки відомо, що акумуляція  $\text{Ca}^{2+}$  і синтез АТФ - альтернативні процеси, посилення кальцій-акумулюючої здатності мітохондрій може вказувати на зменшення інтенсивності синтезу АТФ в них. Також є роботи, які пов'язують появу септованих мітохондрій з модуляцією експресії гена OPA1, що також впливає на величину дихального контролю мітохондрій [111].

Паралельно істотно збільшується діаметр мітохондрій (з  $0.58 \pm 0.07$  до  $0.96 \pm 0.08$  мкм), що вказує на можливість загибелі мітохондрій за некротичним типом і часто є незворотнім.

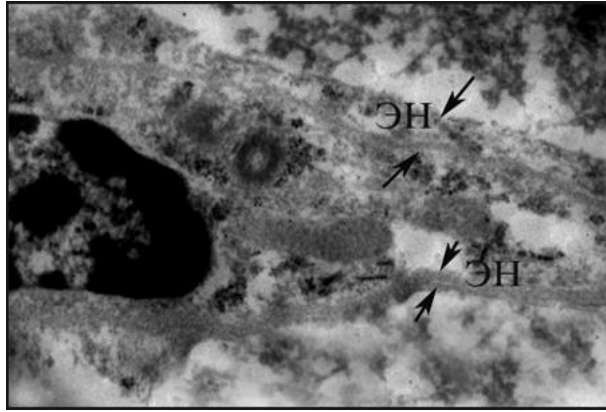
Окрім цього було виявлено значні ділянки порушення структури мієліну - набряком та деструкцією мієлінових волокон, що стало ознакою розвитку паркінсоноподібного стану (Рис. 3.9).



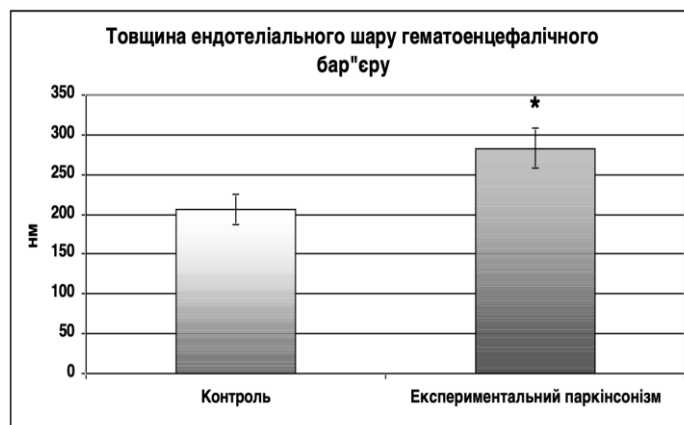
**Рис. 3.9.** Ультраструктура мієліну в довгастому мозку при тривалому введенні ротенону. Н – набряк, Д – деструкція. Зб. 12000

До інших ультраструктурних змін, котрі можуть мати безпосереднє відношення до формування оксидативного стресу, є ендотеліальна дисфункція, зокрема її структурна складова. Спостерігалася гіпергідратація гематоенцефалічного бар'єру і, що є важливим з вказаної точки зору, його ендотеліального шару (Рис.3.10).

Середня арифметична товщина ендотеліального шару зростала при експериментальному паркінсонізмі більш, ніж на 35,5%, що є свідченням погіршення дифузійної здатності легень за рахунок зростання шляху дифузії для  $O_2$  (Рис. 3.11).



**Рис. 3.10.** Ультраструктура тканини довгастого мозку при тривалому застосуванні ротенону. ЕН – ендотелій. Зб. 12000.



**Рис. 3.11.** Гіпергідратація ендотеліального шару гематоенцефалічного бар'єру при експериментальному паркінсонізмі

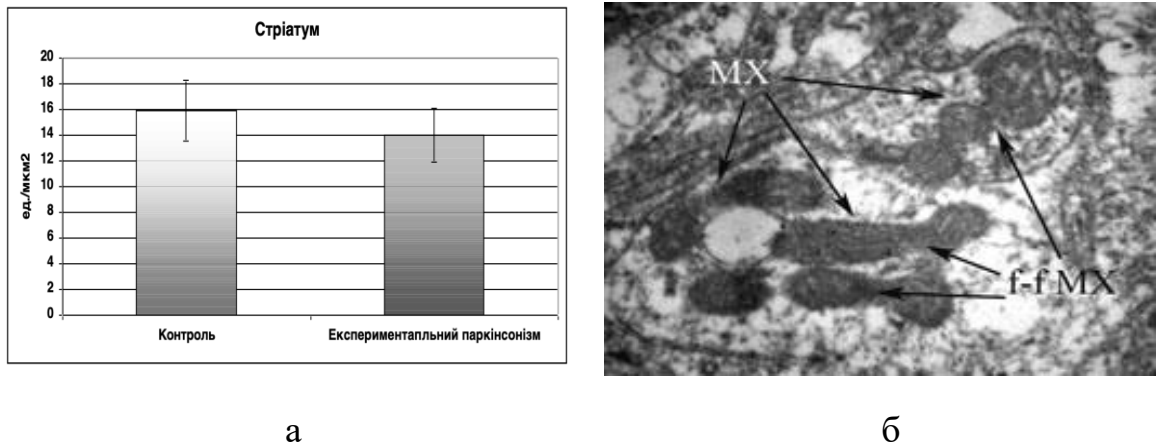
Незважаючи на те, що до останнього часу головну роль у формуванні ХП відводили чорній субстанції, а саме до того, що пов'язано з синтезом дофаміну, натепер встановлено, що значну роль відіграє екстрапірамідна система, наприклад стріатум. Функція стріатуму багато в чому визначає його клітинний склад. Розвиток паркінсонізму супроводжують нейрохімічні зміни в стріатумі - зниження вмісту дофаміну і ферменту тирозингідроксилази, а також зменшення числа  $D_2$  дофамінових рецепторів [3]. Експериментально також була виявлена загибель нейронів не тільки в компактній частині чорної субстанції. Детальний аналіз рівня дофаміну показав зниження на 90% в дор-

сальному і на 73% в вентральному стріатумі, але тільки при стереотаксичному введенні пошкоджуючого агента [260]. Включення стріатуму у формування ХП відбувається на тому ж етапі, коли й чорної субстанції. Показано, що якщо присутній надмірно гальмівний вплив стріатуму, виникає гіпокінезія - бідність рухів, амімія. Гіпофункція стріатуму призводить до виникнення надлишкових мимовільних рухів - гіперкінезів. З'ясування ролі нейромедіаторів у патогенезі ХП дозволило пояснити функції екстрапірамідної системи, а також причини виникнення клінічних проявів хвороби Паркінсона і паркінсонізму: холінергічний компонент відповідає за так зване «заморожування» пацієнта, серотонінергічний компонент - відповідає за відчуття постійної втоми, норадренергічний компонент - відповідальний за розвиток судома у сні, дофамінергічний компонент - відповідальний за розвиток тремтіння кінцівок [229]. За даними цих дослідників стратум включається у формування паркінсонічних змін пізніше ніж довгастий мозок.

При створенні експериментального паркінсонізму ультраструктура **стріатуму** також зазнавала негативних змін під впливом ротенону, проте ці зміни були менш вираженими, ніж у довгастому мозку, можливо саме завдяки фактору часу – початку формування компенсаторних механізмів. Ми знайшли підтвердження даному передбаченню.

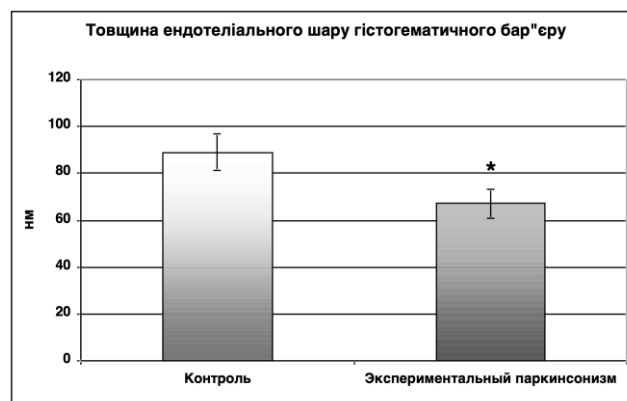
Зокрема не спостерігалось достовірного зменшення кількості МХ (рис. 3.11 а), натомість суттєво активувалися динамічні fission-fusion процеси в мітохондріальному апараті, котрі, як вказувалося, пошкоджуються при нейродегенерації (рис. 3.11 б).

При цьому гіпергідратація гематоенцифалічного бар'єру (ГГБ) також мала місце: товщина ендотеліального шару ГГБ зростала, проте дещо менше, ніж в довгастому мозку – на 21,3%.

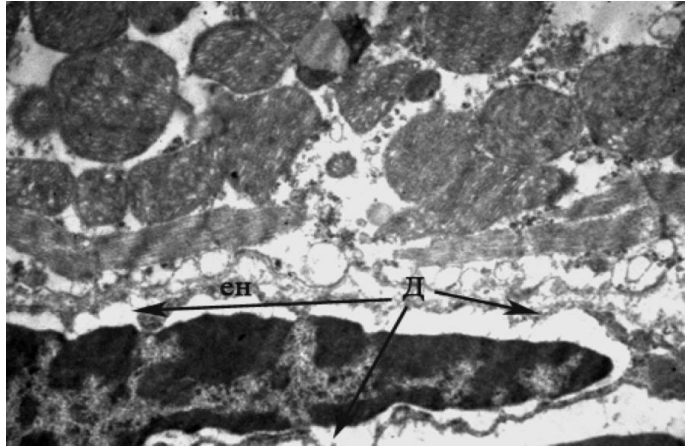


**Рис. 3.11.** Ультраструктура мітохондріального апарату стріатуму при тривалому введенні Ротнону. MX – мітохондрії, f-fMX – процес fission-fusion мітохондрій. Зб. 9600

Тривале введення Р супроводжувалося у **міокарді** розвитком вираженої мітохондріальної та ендотеліальної дисфункції (Рис. 3.12). Слід звернути увагу на той факт, що із досліджуваних тканин лише в міокарді спостерігалося потоншення ендотеліального шару гістогематичного бар'єру, обумовлене вираженими деструктивними процесами в ендотелії (Рис. 3.13).

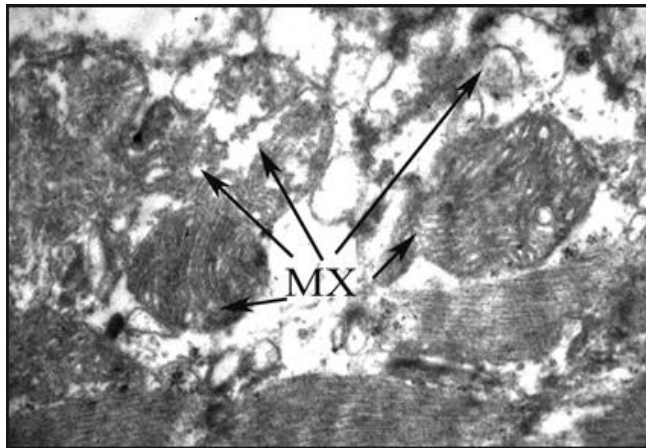


**Рис. 3.12.** Показники мітохондріальної та ендотеліальної дисфункції в міокарді при тривалому введенні ротенону. \* -  $p < 0,05$ .



**Рис. 3.13.** Ультраструктура міокарду при введенні ротенону. ен – ендотелій, Д – деструкція. Зб. 9600

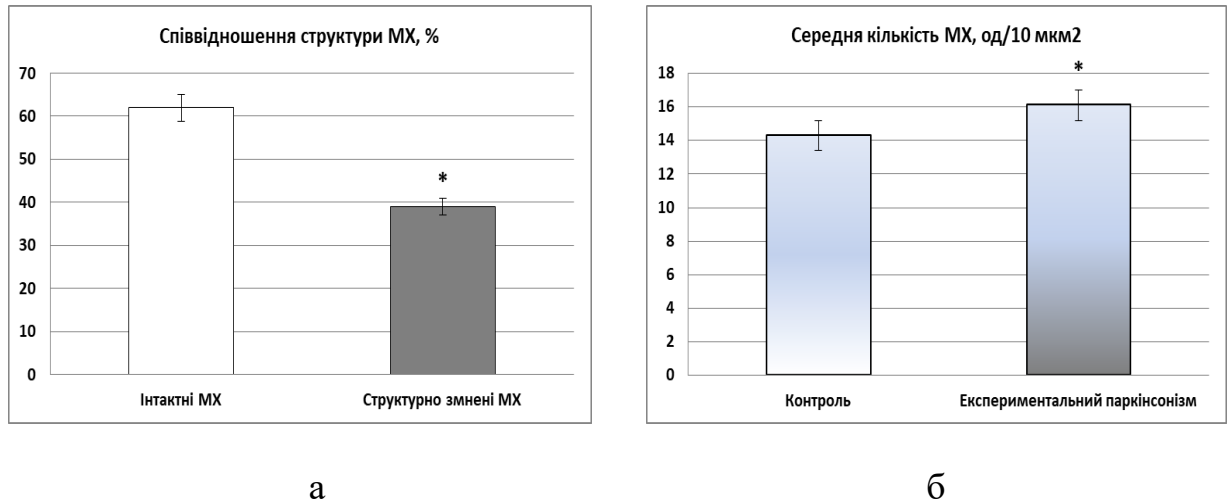
Остання була значно вираженішою, ніж при однократному введенні препарату. Якщо оцінити стан мітохондріального апарату міокарду, то слід зазначити, що значна кількість органел була суттєво пошкодженою: часткова чи повна вакуолізація, деструкція крист та порушення мітохондріальних мембран (рис. 3.14).



**Рис. 3.14.** Ультраструктура мітохондрій в міокарді при тривалому введенні ротенону. MX – мітохондрії. Зб. 16000.

Близько 40% органел виявлялися пошкодженими, хоча слід зазначити, що спостерігалася хоча не виражена, проте все ж достовірна ( $p < 0,05$ ) актива-

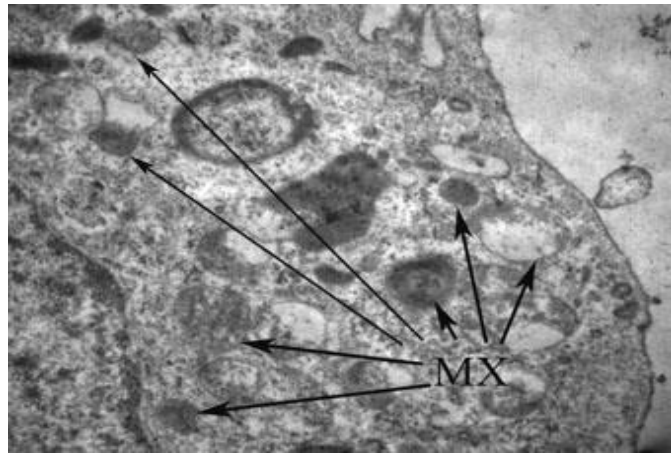
ція морфогенезу МХ (наводяться середні дані щодо субсарколемальної та інтраміофібрилярної субпопуляцій МХ) (рис. 3.15 а,б).



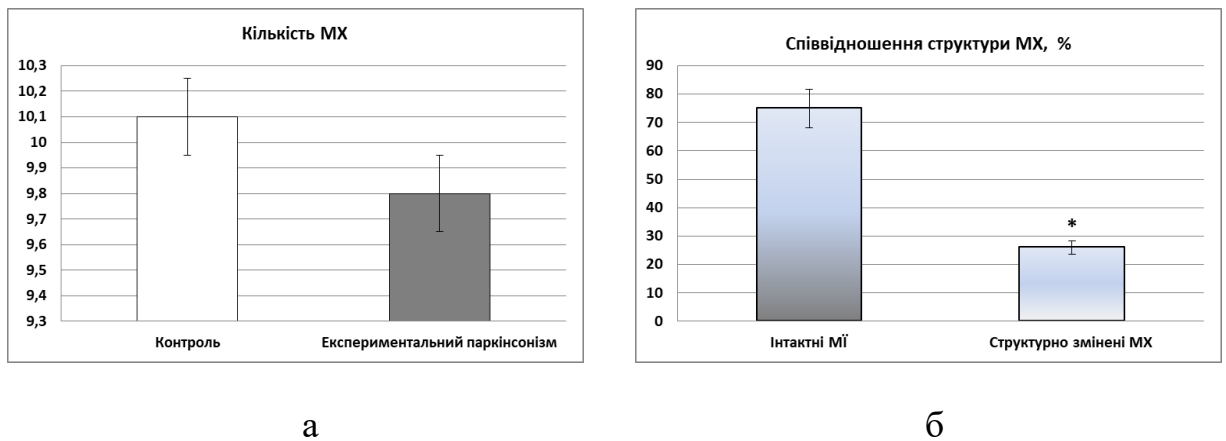
**Рис. 3.15.** Морфометричні зміни мітохондріального апарату міокарду при експериментальному паркінсонізмі. \* -  $p < 0,05$ .

Слід відмітити, що при зазначеній моделі експерименту досить значні порушення ультраструктури спостерігалися і в **легеневій тканині**. Виявлено значні зміни у мітохондріальному апараті з пошкодженням структури МХ: часткова вакуолізація, утворення септованих МХ, мітоптоз (пошкодження по некротичном типі не були переважаючими), інколи утворення мієліноподібних структур, що вважають ознакою формування мітохондріальної дисфункції (Рис. 3.16).

Попри суттєві структурні зміни у мітохондріальному апараті легеневої тканини та відсутність змін загальної кількості МХ, відсоток структурно пошкоджених органел був значно (майже у 2 рази) меншим, ніж у міокарді (рис. 3.17 а,б).



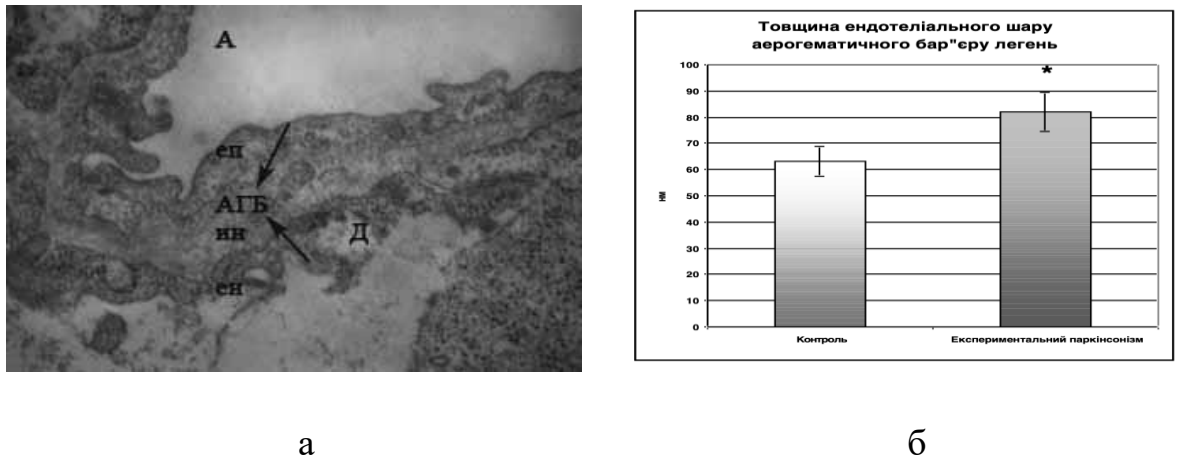
**Рис. 3.16.** Ультраструктура мітохондрій тканини легень при тривалому введенні ротнону. MX – мітохондрії. Зб. 9600



**Рис. 3.15.** Морфометричні зміни мітохондріального апарату тканини легень при експериментальному паркінсонізмі. \* -  $p < 0,05$ .

Спостерігався також розвиток ендотеліальної дисфункції, однак були менш виражені, ніж в міокарді гіпергідратація та прояви деструкції, котрі інколи зачіпали не тільки ендотелій капілярів, а й весь аерогематичний бар'єр (АГБ) (Рис. 3.16). Товщина ендотеліального шару АГБ зростала в середньому на 30,2%.

Як і при однократному введенні Р тканина легень пошкоджувалася менше, ніж міокард і, особливо, довгастий мозок, проте пошкодження ультраструктури були все ж достатньо вираженими.



**Рис. 3.16.** Морфофункціональний стан аерогематичного бар'єру легень при тривалому введенні ротенону. АГБ - аерогематичний бар'єр легень, еп – епітеліальний шар, ин – інтерстиціальний шар, ен – ендотеліальний шар, Д – деструкція. Зб. 9600

Отже, при розвитку паркінсоноподібного стану порушення ультраструктури тканин, розвиток мітохондріальної та ендотеліальної дисфункції спостерігається не тільки у відділах головного мозку – більш виражено в довгастому мозку, менш в стріатумі, але й в інших тканинах організму – більш виражено в міокарді, меншою мірою в тканині легень.

Основні результати підрозділів 3.1.1. та 3.1.2. відображені у публікаціях:

1. Belikova M, Rozova K, Putii Y. Possible ways of reducing the manifestation of mitochondrial dysfunction in patients with type 2 diabetes and parkinson's disease. *American Journal for Fundamental, Applied and Experimental Researches*. 2016; (1): 21– 9. ISSN 2313-7525 [80].

2. Путій ЮВ., Розова КВ. Формування порушень ультраструктури в різних тканинах організму при ротенон-токсичній моделі паркінсонізму». *X Міжнародний симпозиум «Актуальні проблеми біофізичної медицини. Київ - 2018: 54 – 6. [39].*

3. Путій ЮВ, Носар ВІ, Розова КВ. Функціональний стан мітохондрій у мозку, міокарді та легенях щурів при моделюванні паркінсоноподібного синдрому: корегувальна дія канікору. *IV International Scientific and Practical Conference. Vancouver, Canada, 2019: 631 – 41. [38].*

4. Розова КВ, Путій ЮВ, Сидоряк НГ. Ультроструктурні клітинні механізми розвитку супутньої патології при експериментальному паркінсонізмі та хворобі Паркінсона. *XII Міжнародна інтернет-конференція «Соціальні та екологічні технології : актуальні проблеми теорії та практики». 2020. Мелітополь. 87-9. [40].*

5. Rozova K, Putii Y. *The ultrastructural peculiarities of the cardiopulmonary insufficiency in experimental Parkinsonism and diabetes: the possibility of correction. Comorbidity in Pulmonology. 2017. Truskavetz: 20-2. [218].*

6. Путій ВБ, Фучко ОЛ, Ващенко НМ, Розова КВ. Формування ультроструктурних адаптивних реакцій у тканинах організму при експериментальному паркінсонізмі. *Фізіол. журн., 2023; 69 (3); 74-82. doi: <https://doi.org/10.15407/fz69.03.074> [41].*

### **3.2. Дослідження механізму нейродегенерації, пов'язаного з активністю мітохондріального АТФ-залежного $K^+$ каналу**

У даній роботі була зроблена спроба корекції мітохондріальної і ендотеліальної дисфункцій в тканинах мозку, які розвиваються при введенні тваринам ротенон. Раніше нами було показано, що розвиток окисного стресу попереджається активацією мітоКатФ [189, 216]. Відомо, що активатор цього каналу - уридиндифосфат не проходить в клітину [188], але утворюється в ній при введенні його метаболічного попередника - уридину [187], для якого є спеціальні системи транспорту в клітину [267].

Отримані нами позитивні зміни ультраструктури самої тканин мозку можна пов'язати з впливом утвореного із уридину уридиндифосфату на синтез фосфоліпідів мозку [187].

Введення уридину збільшувало загальну кількість мітохондрій (навіть відносно контролю), тоді як кількість структурно змінених органел зменшувалася в порівнянні з такими при ЕП майже в 2 рази. Середній діаметр мітохондрій був збільшений в тканинах довгастого мозку та стріатуму в середньому на 26-28%. Корируюча дія уридину щодо мітохондріального апарату клітин виражалася також в активації морфогенезу мітохондрій, нормалізації ультраструктури і у такому збільшенні їх діаметра, котре свідчить про помірне набухання мітохондрій, направлене, ймовірно, на оптимізацію синтезу АТФ.

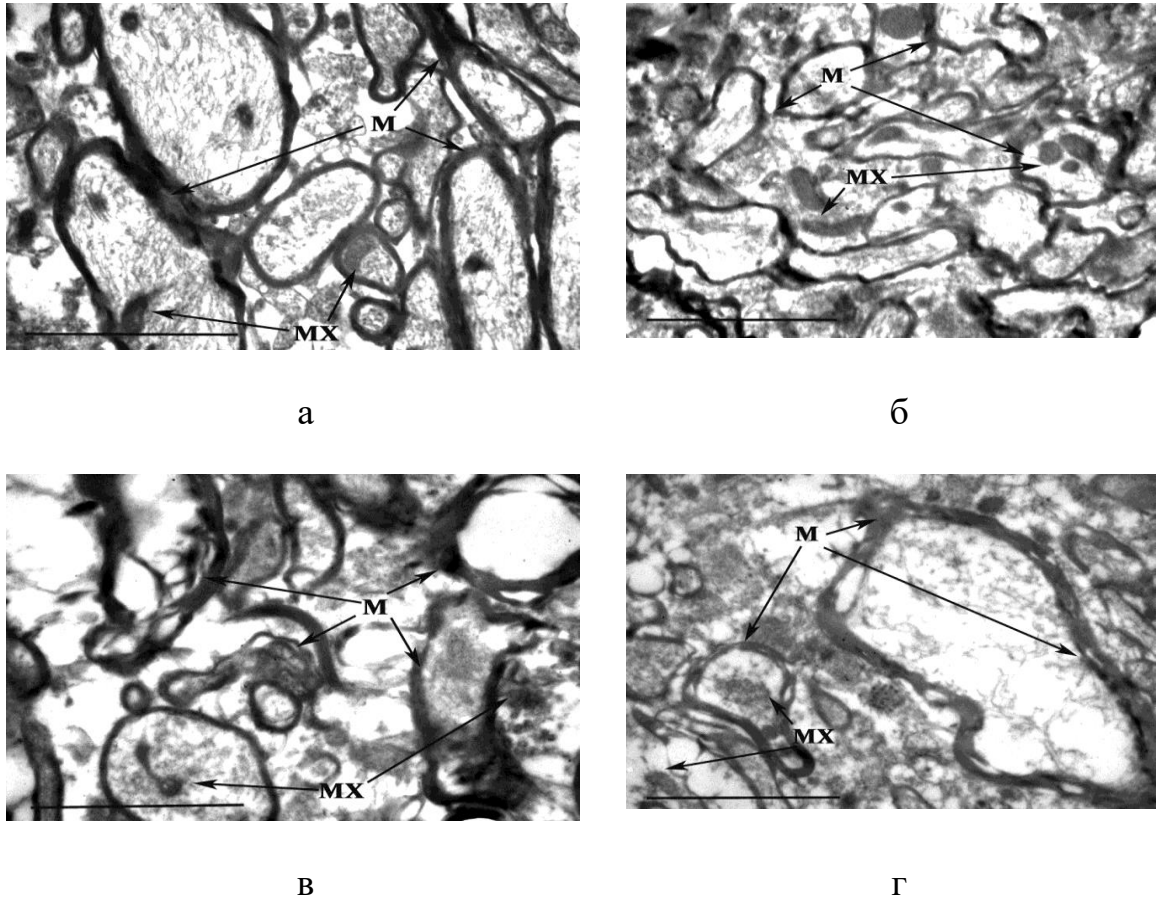
Крім того, слід нагадати, що при паркінсонізмі в нейронах розбалансовані процеси fission-fusion мітохондрій (переважно за рахунок посилення fission), що порушує внутрішньо- і міжклітинний обмін [134]. Під впливом уридину спостерігалася нормалізація динамічних процесів в мітохондріальному апараті клітин стріатуму (що ми розглядали вище, як включення компенсаторно-приспосувальної реакції при тривалому введенні ротенону) та довгастого мозку (що встановлено не було). При цьому зменшувалася гідратація ендотеліального шару гематоенцефалічного бар'єру (в середньому на 20-25%). Таким чином, можна констатувати, що введення уридину при ЕП сприяє усуненню структурної компоненти мітохондріальної і ендотеліальної дисфункцій.

Однак найбільш несподіваним результатом була нормалізація ультраструктури мієліну. Слід ще раз нагадати, що попри наявні на тепер дані ХП та паркінсонізм не відноситься до демієлінізуючих захворювань.

При цьому у сучасній фізіологічній науці, як в фундаментальному, так і прикладному її напрямках, велика увага приділяється одній з актуальних проблем сучасної неврології - вивченню механізмів, що обумовлюють руй-

нування мієлінової оболонки нервових волокон [9]. Процеси демієлінізації і ремієлінізації в нормі врівноважені і тривають протягом всієї життєдіяльності організму. Однак під впливом несприятливих ендо- та екзогенних факторів процес руйнування мієлінових оболонок може виявитися переважаючим – пробій та / або деструкція мієлінової шару є найбільш типовим і поширеним варіантом пошкодження нервової тканини. Руйнування мієліну вважається універсальним механізмом реакції на пошкодження. У разі прогресування демієлінізації, і при ураженні 40-60% всіх мієлінових оболонок розвиваються різні неврологічні синдроми, саме сукупність яких узагальнюється терміном «демієлінізуючі захворювання» [49]. В науковій літературі зазначається, що в останні роки спостерігається істотне збільшення числа випадків захворювань, що супроводжуються пошкодженням мієліну. У клінічній картині порушень структури мієліну присутні крім виражених розладів мислення та розвитку недоумства, порушення ходьби, парези, м'язова слабкість і вегетативна дисфункція [28], що також є характерним для паркінсонподібних станів, чому, на нашу думку, приділяється недостатньо уваги. І це незважаючи на те, що останнім часом при обстеженні пацієнтів з ХП, завдяки можливості отримання дифузійнотензорних зображень, які дозволяють оцінити дифузю молекул води в біологічних тканинах, а, отже, і ступінь гіпергідратації тканини, показано наявність у таких пацієнтів значних структурних порушень функціонально значущих провідних шляхів [70, 236].

Ми дозволимо собі дещо повторити отримані попередньо дані. Отже. При ЕП було встановлено, що відбувається виражене пошкодження структури, обумовлене набряком і / або деструкцією мієлінових оболонок в обох досліджуваних тканинах мозку (рис. 3.17).



**Рис. 3.17.** Ультраструктурна організація мієліну в довгастому мозку (а) і стріатумі (в) контрольних тварин і при експериментальному паркінсонізмі (б і г відповідно). М – мієлін, МХ – мітохондрії. Зб. 16000.

Виявлені зміни обумовлюються як гіпергідратацією мієлінових оболонок, так і деструктивними процесами з втратою їх регулярності. При проведенні порівняння патофізіологічних механізмів, відповідальних за розвиток ХП і клінічних її проявів, в даний час вважають, що найбільш виражені зміни білої речовини мозку (що пов'язано з процесами демієлінізації) на мікроструктурному рівні відповідальні за формування когнітивних розладів, немоторні порушення, відповідають більшою мірою тяжкості захворювання за шкалою Хен і Яра [116, 119].

До трофічних порушень можна з повним правом віднести і зміни споживання кисню тканинами, виникнення вторинної тканинної гіпоксії, що ві-

дбуваються в значній мірі завдяки структурним пошкодженням мітохондрій. ЕП супроводжувався істотними змінами в мітохондріальному апараті тканин мозку (табл. 3.4).

Таблиця 3.4.

Деякі морфометричні характеристики мітохондрій в довгастому мозку та стріатумі (М ± m)

Умови експерименту	Загальна кількість мітохондрій, од./10 мкм <sup>2</sup>		Кількість структурно пошкоджених мітохондрій, %	
	Довгастий мозок	Стріатум	Довгастий мозок	Стріатум
1. Контроль (a = 145)	14,3±2,5	15,9±1,8	7,6±1,8	6,4±1,2
2. Експериментальний паркінсонізм (a = 150)	9,4±1,1 *	14,0±1,6	47,3±6,4 **	31,8±8,4 **
3. Експериментальний паркінсонізм + уридин (a = 145)	18,0±1,9 *#	19,3±1,7 *#	24,3±3,1 *#	20,8±4,6 *#
4. Експериментальний паркінсонізм + 5НД (a = 120)	8,2±1,3 *	16,7±2,3	39,6±4,1 **	38,6±6,3 **
5. Експериментальний паркінсонізм + уридин + 5НД (a = 135)	11,3±1,5	13,5±1,3	36,4±2,8 **	32,0±4,1 **

Примітки: \* - p <0,05 відносно контролю; \*\* - p <0,01 відносно контролю, # - p <0,05 відносно експериментального паркінсонізму; a - кількість досліджених полів

Як свідчать отримані нами результати, при ЕП даннях серіях досліджень в тканини довгастого мозку відзначалося достовірно зменшення загальної кількості МХ (на 34,3%); в стріатумі ж таких змін не спостерігалось.

Поряд з цим в обох тканинах відбувається різке збільшення кількості структурно пошкоджених органел: в 6,2 рази в довгастому мозку і в 5 разів в стріатумі. Отже, нами ще раз показано, що ЕП супроводжується розвитком мітохондріальної дисфункції в досліджуваних структурах, що призводить до вторинної гіпоксії тканин з можливим розвитком у них деструктивних процесів. До останніх можна віднести і зазначені порушення цілісності мієліну.

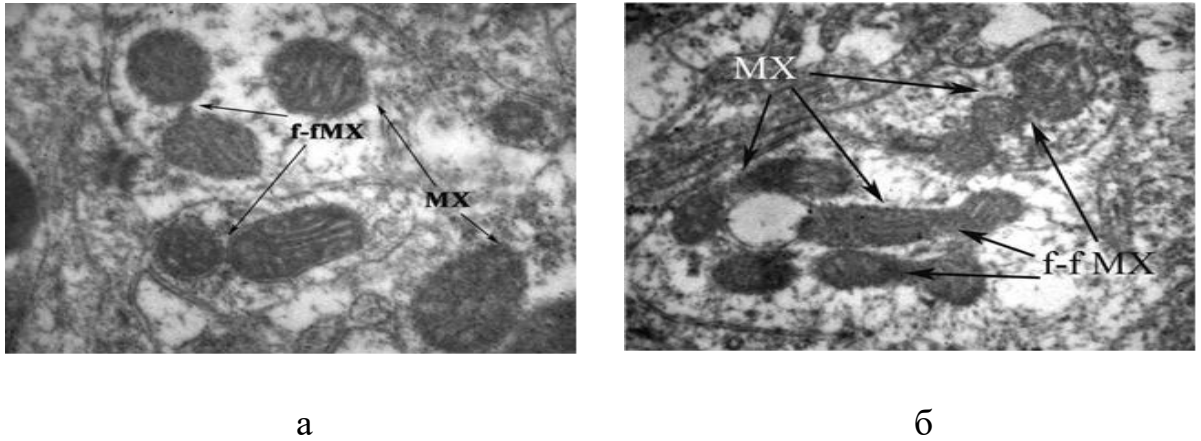
Проведені морфометричні визначення показали, що як в довгастому мозку, так і в стріатумі 50-70% мієліну (площа пошкоджень щодо загальної площі мієліну в полі зору) було деструктуровано та / або гіпергідратовано (див. рис. 3.17 в, г). Більш вираженим цей процес був в тканини довгастого мозку. Такі зміни прийнято, як вже зазначалося, вважати передумовою до формування судомної готовності за рахунок порушення проведення потенціалів по мієлінізованим нервовим волокнам внаслідок пошкодження мієлінових структур. Судомна готовність властива як організмам з паркінсоноподібними станами, так і хворим з ХП (особливо в нічний час), що поєднується з норадренергічною складовою (компонентою) патології, відповідальною за розвиток судом [210].

На даний момент вважають, що при пошкодженні нервів експресується так звана антисмислова РНК (AS-RNA). Експерименти на мишах показали, що AS-RNA регулює відновлення мієлінової оболонки [47, 224]. Субстратами і джерелами енергії для біосинтезу AS-RNA є макроерги, в тому числі АТФ [59]. Тому велику роль в пошкодженні мієліну може відігравати мітохондріальна дисфункція в тканинах мозку, наявність якої було показано дослідниками [143, 174].

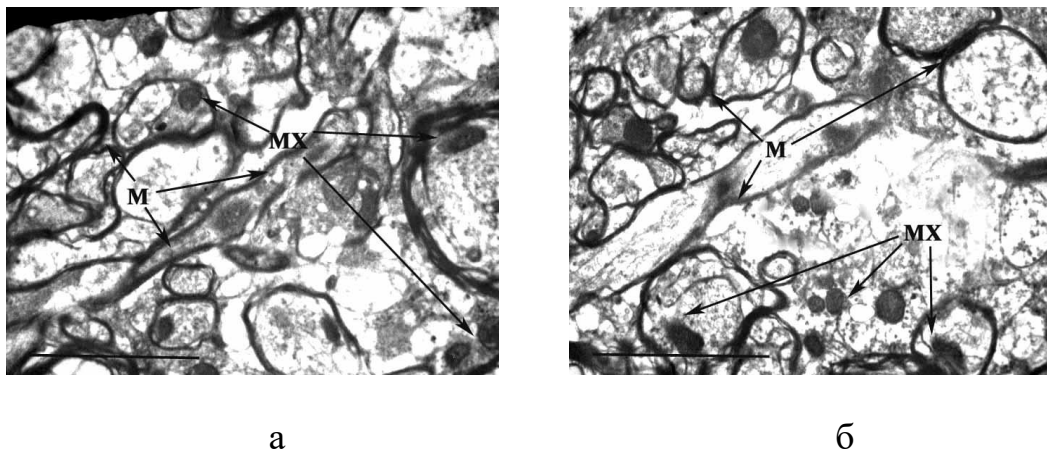
Ультраструктурно МД виражалася в: довгастому мозку - зменшенням загальної кількості МХ, в середньому на 34,3%; в стріатумі - тенденцією до зменшення загальної кількості МХ. При цьому різко збільшувалася кількість структурно пошкоджених органел (в 6,2 рази і на 86,7% відповідно). Отже, енергетичні можливості мітохондріального апарату стріатума і довгастого

мозку (в більшій мірі) при ЕП істотно знижуються, що, мабуть, є однією з основних (можливих) причин структурних пошкоджень мієліну. Застосування уридину (УД) супроводжувалося вираженим поліпшенням ультраструктури, а, отже, і морфофункціонального стану мітохондріального апарату в довгастому мозку і в стріатумі. У довгастому мозку відзначалася активація морфогенеза МХ зі збільшенням їх загальної кількості (на 25,8% відносно контрольних величин), при цьому кількість структурно змінених органел зменшувалася в порівнянні з визначеним при ЕП майже в 2 рази і перевищувало контрольні величини лише на 24,3% . Крім того, показано, що помірно зростала величина середнього діаметра МХ - на 26,7%, що свідчило про їх помірне набухання і оптимізацію синтезу АТФ. Отже, в тканини довгастого мозку при ЕП виявлялася корегуюча дію УД щодо мітохондріального апарату клітин, що обумовлено, зокрема, активацією АТФ-залежного К<sup>+</sup> каналу [189]. Схожа картина спостерігалася і в тканини стріатуму, з тією різницею, що загальне число МХ збільшувалася на 48,3% (порівняно з ЕП, чого не спостерігалася в довгастому мозку), кількість структурно пошкоджених органел зменшувалася в порівнянні з визначеним при ЕП більш ніж в 5,5 разів. Особливо слід вказати на факт відновлення процесу fission-fusion МХ в обох структурах мозку, що пов'язано з внутрішньо- і часто міжклітинним обміном інформацією [134]. Під впливом УД спостерігається істотна нормалізація динамічних процесів в мітохондріальному апараті клітин (рис. 3.18).

Результатом застосування УД була нормалізація ультраструктури мієліну - лише 20-30% М залишалося деструктурованими та / або гіпергідратованими як в довгастому мозку, так і в стріатумі, що можливо вказує на зниження судомної готовності в організмі при ЕП (рис. 3.19).



**Рис. 3.18.** Динамічні процеси в мітохондріальному апараті клітин довгастого мозку (а) і стріатума (б) при ЕП і дії УД. МХ - мітохондрії, f-f МХ - злиття-поділ мітохондрій. Зб. 24000.

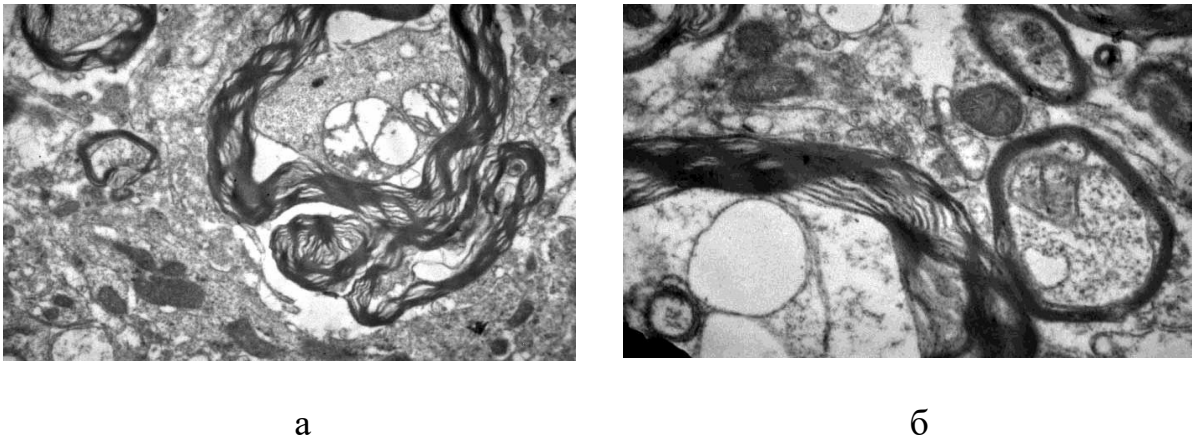


**Рис. 3.19.** Ультраструктурна організація мієліну в довгастому мозку (а) і стріатумі (в) при експериментальному паркінсонізмі і застосуванні уридину. М - мієлін, МХ - мітохондрії. Зб. 16000.

Мабуть, цей ефект, в значній мірі обумовлюється оптимізацією енергопродукції за рахунок поліпшення структурно-динамічних процесів в мітохондріальному апараті клітин і усунення МД, а, отже, і пластичних процесів, що вимагають енергетичних витрат.

Для підтвердження того, що саме активація мітохондріальних КатФ-каналів за допомогою УД призводила до виявлених позитивних змін ультра-

структури мієліну і мітохондріального апарату клітин застосовували блокатор мітохондріальних КатФ - каналів - 5НД. Якщо 5НД застосовувався одночасно з УД, позитивний ефект останнього практично повністю нівелювався, що виражалося з боку ультраструктури мієлінових волокон в збереженні властивих ЕП ушкоджень (як якісно, так і кількісно) (рис. 3.20). Це ж стосується і ультраструктури мітохондріального апарату клітин обох тканин (див. табл. 3.4).



**Рис. 3.20.** Ультраструктурна організація мієліну в довгастому мозку (а) і стріатумі (в) при експериментальному паркінсонізмі і спільному застосуванні уридину і 5НД. Зб. 16000.

Таким чином, отримані результати однозначно вказують на те, що при паркінсонізмі нейродегенерація зачіпає не тільки безпосередньо нейрони структур головного мозку, а й порушує мієлінізацію нервових волокон. Проведені дослідження дозволяють зробити висновок, що не тільки в формуванні мітохондріальної дисфункції, але і в процесі демієлінізації нервових волокон при експериментальному паркінсонізмі (ймовірно і при ХП) беруть безпосередню (або опосередковану) участь мітохондріальні КатФ - канали. Слід зазначити, що якщо при ЕП мітохондріальна дисфункція більшою чи меншою мірою виявляється і у вісцеральних органах, принаймні в легенях та серці, то

можна передбачити наявність подібного впливу модуляції активності мітохондріальних КатФ – каналів, що вимагає подальших досліджень.

*Основні результати підрозділу 3.2. відображені у публікаціях:*

1. Mosentsov AA, Rozova EV, Belosludtseva NV, Mankovskaya IN, Putiy YuV, Karaban IN, Mikheeva IB, Mironova GD. *Does the Operation of Mitochondrial ATP-Dependent Potassium Channels Affect the Structural Component of Mitochondrial and Endothelial Dysfunctions in Experimental Parkinsonism?*, *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2021. 170 (4): 431 – 5. doi: 10.1007/s10517-021-05081-y. [193].

2. Путий ЮВ, Миронова ГД, Розова ЕВ. *Исследование влияния активности митохондриального АТФ -зависимого K<sup>+</sup> канала на ультраструктуру миелина при экспериментальном паркинсонизме*. *International scientific journal «Grail of science»*. 2021; (4): 141 – 51. doi: 10.3074/grail-of-science.07.05.2021.026. [36].

### **3.3. Функціональний стан мітохондрій у мозку, міокарду та легень щурів при експериментальному паркінсонізмі**

Як вже неоднократно зазначалось, мітохондріальна дисфункція та оксидативний стрес є центральними ланками патогенезу ХП [151]. Першими дослідженнями, які пов’язували мітохондріальну дисфункцію з патогенезом ХП, було встановлення селективного інгібування мітохондріального комплексу I з одночасним розвитком паркінсонізму у людини [162]. Було показано, що мітохондріальна дисфункція, яка супроводжується зростанням продукції активних форм кисню (АФК) у мітохондріях, призводить до дегенерації дофамінергічних нейронів [151].

В наших дослідження та результатах, описаних вище, показано, що тривале введення ротенону викликає виражені морфологічні прояви мітохон-

дріальної дисфункції, а відтак й окислативного стресу у довгастому мозку та стріатумі, а також в тканинах серця та легень. Тому природно, що виникає питання вивчення особливостей функціонування мітохондрій при експериментальному паркінсонізмі. Як було показано раніше, вираженість цих симптомів у щурів корелює як з результатами спеціальних тестів в експерименті (з оцінкою гіпо- та акінезії, постуральних порушень, асиметрії симптоматики та ураження різних кінцівок поодино), так і зі ступенем дегенерації дофамінергічних нейронів у нігостріатних шляхах [194].

Проведено дослідження окисного фосфорилування в мітохондріях головного мозку, міокарді та тканині легень за окиснення різних субстратів.

У тканині **головного мозку** було показано, що після введення ротенону за умов окиснення як сукцинату (ФАД-залежного субстрату), так і глутамату з малатом (НАД-залежних субстратів) у мітохондріях сповільнювалося АДФ-стимульоване дихання, зменшувалося спряження дихання з фосфорилуванням на тлі зменшення ефективності споживання кисню. Зазначені зміни (табл. 3.5, 3.6) були більш вираженими при використанні НАД-залежних субстратів: так,  $V_3$  зменшувалася на 39% ( $P < 0,05$ ), дихальний контроль – на 36% ( $P < 0,05$ ), АДФ/О – на 26% ( $P < 0,05$ ) порівняно з контрольними значеннями.

Слід відмітити, що використання екзогенного субстрату дихального ланцюга мітохондрій — малату та сукцинату дає змогу оцінити функціонування всіх ділянок спряження окисного фосфорилування в умовах експерименту. Використання екзогенних субстратів окиснення дає змогу оцінити функціонування всіх ланок дихального ланцюга мітохондрій. Так, використовуючи як субстрат окиснення сукцинат, можна оцінити функціональний стан комплексів дихального ланцюга сукцинат-КоQ-оксидоредуктази, КоQ-цитохром с-оксидоредуктази та цитохромоксидази [69].

*Таблиця 3.5*

Дихання та фосфорилування у мітохондріях мозку щурів; ФАД-залежні суб-  
страти (5 ммоль/л сукцинату) ( $M \pm m$ )

	V4s	V3	V4 АТФ	V3/V4 АТФ	АДФ/0
Контроль	14,0±1,08	52,1±2,49	18,5±1,57	2,82±0,10	1,79±0,07
Однократне введення Р	19,2±1,91*	42,3±2,55*	20,2±1,72	2,09±0,06*	1,62±0,05*
Тривале введення Р	18,6±1,59*	45,4±1,90	21,0±1,71	2,16±0,11*	1,68±0,07*
Тривале введення Р +капікор	18,2±1,78*	49,7±2,36	19,6±1,50	2,53±0,07	1,72±0,11

Примітки.

V S 4 — інтенсивність дихання в стані 2 (до мітохондрій доданий екзогенний субстрат, але немає акцептора фосфату); V3— інтенсивність дихання в стані 3 (мітохондрії з субстратом окиснення і АДФ); V АТФ 4 — інтенсивність дихання в стані 4 (у системі вичерпується доданий акцептор фосфату, але концентрація субстратів окиснення продовжує залишатися високою); V3 /V4 АТФ -дихальний контроль; АДФ/О —ефективність фосфорилування доданого АДФ. \*P<0,05 відносно контролю.

Таблиця 3.6

Дихання та фосфорилування у мітохондріях мозку щурів; НАД-залежні суб-  
страти (10 ммоль/л глутамату +2,5 ммоль/л малату) ( $M \pm m$ )

	V4s	V3	V4 АТФ	V3/V4 АТФ	АДФ/0
Контроль	14,8±1,33	49,3±3,15	15,2±1,25	3,25±0,18	2,63±0,09
Однократне введення Р	12,±1,08	27,7±1,95*	16,1±1,26	1,72±0,09*	1,87±0,14*
Тривале введення Р	14,3±1,56	30,1±3,58*	14,5±1,17	2,08±0,30*	19,5±0,17*

	V4s	V3	V4 АТФ	V3/V4 АТФ	АДФ/О
Тривале введення Р +капікор	13,1±1,81	35,7±6,0	14,4±2,23	2,48±0,11	2,13±0,09

Примітка. Позначення ті ж, що і на таблиці 3.5.

Згідно з результатами проведених досліджень у мітохондріях **міокарду** щурів показники дихальної активності за умов моделювання паркінсоноподібного стану (табл. 3.7, 3.8), були відмінні в порівнянні з контролем. Реєстрували стаціонарну швидкість дихання у стані 4 (V4 s ) за умов окиснення субстрату (5 ммоль/л сукцинату чи 10 ммоль/л глютамату +2,5 ммоль/л малату) за відсутністю АДФ. Швидкість активного дихання при додаванні 300 мкмоль/л АДФ (V3) зменшилася на 11,7 % з ФАД-залежними субстратами, а з НАД-залежними субстратами цей показник опустився на 24 % нижче в порівнянні з контролем. Дані АДФ/О, які відображають кількісний зв'язок між споживанням O<sub>2</sub> і синтезом АТФ зменшились на 8,6 та 13,7 % відповідно.

Таблиця 3.7

Дихання та фосфорилування у мітохондріях міокарду щурів; ФАД-залежні субстрати (5 ммоль/л сукцинату) (M±m)

	V3	V4 АТФ	V3/V4 АТФ	АДФ/О
Контроль	67,6±4,93	19,4±1,53	3,5±0,06	1,65±0,08
Однократне введення Р	57,9±3,30*	19,6±2,03	3,0±0,07*	1,5±0,06
Тривале введення Р	59,6±2,51*	19,2±1,82	3,1±0,08*	1,5±0,06
Тривале введення Р +капікор	62,6±2,23	19,6±0,83	3,2±0,07*	1,55±0,04

Примітка. Позначення ті ж, що і на таблиці 3.5.

Таблиця 3.8

Дихання та фосфорилування у мітохондріях міокарду щурів; НАД-залежні субстрати (10 ммоль/л глутамату +2,5 ммоль/л малату) ( $M \pm m$ )

	V3	V4 АТФ	V3/V4 АТФ	АДФ/0
Контроль	59,5±6,1	15,5±2,53	3,8±0,37	2,6±0,07
Однократне введення Р	43,6±3,6*	15,8±2,86	2,8±0,39	2,2±0,05*
Тривале введення Р	45,2±3,8*	15,2±1,7	3,0±0,26*	2,3±0,03*
Тривале введення Р +капікор	49,6±1,83*	15,6±0,40	3,2±0,06	2,4±0,02*

Примітка. Позначення ті ж, що і на таблиці 3.5.

Аналіз отриманих результатів (див. табл. 3.9, 3.10) свідчить про те, що швидкість активного окиснення сукцинату (V3), швидкість “контрольованого” окиснення (V АТФ 4) у тканині **легень** вірогідно знижуються не настільки значимо порівняно з тканинами мозку та міокарду.

Таблиця 3.9

Дихання та фосфорилування у мітохондріях легень щурів; ФАД-залежні субстрати (5 ммоль/л сукцинату) ( $M \pm m$ )

	V3	V4 АТФ	V3/V4 АТФ	АДФ/0
Контроль	47,0±3,40	13,4±1,43	3,5±0,12	1,65±0,05
Однократне введення Р	41,6±2,20	12,7±1,34	3,3±0,07*	1,5±0,03
Тривале введення Р	42,3±3,21	13,2±0,98	3,2±0,05*	1,5±0,04*
Тривале введення Р +капікор	44,0±2,93	13,2±0,73	3,3±0,03	1,6±0,02

Примітка. Позначення ті ж, що і на таблиці 3.5.

Таблиця 3.10

Дихання та фосфорилування у мітохондріях легень щурів; НАД-залежні субстрати (10 ммоль/л глутамату +2,5 ммоль/л малату)

	V3	V4 АТФ	V3/V4 АТФ	АДФ/0
Контроль	41,2±5,0	9,9±1,33	4,15±0,07	2,6±0,07
Однократне введення Р	32,4±2,46*	9,91±0,98	3,3±0,05*	2,3±0,05
Тривале введення Р	34,2±3,11	9,71±1,23	3,5±0,06*	2,3±0,06*
Тривале введення Р +капікор	36,3±1,96	9,0±0,40	4,0±0,06	2,5±0,05

Примітка. Позначення ті ж, що і на таблиці 3.5.

Результати досліджень тканини легень показали, що стимуляція процесів дихання мітохондрій за допомогою екзогенної АДФ була неоднозначною і залежала від субстрату окиснення. В порівнянні з іншими тканинами,

легені піддавалися токсичній дії ротенону найменше [208]. Зокрема, при окисненні малатом зростало значення фосфорилюючого дихання на тлі вірогідного зниження ефективності окисного фосфорилювання. Так, за цих умов показник АДФ/О порівняно з контролем зменшився на 7 %. Спостерігалася тенденція до зниження спряження процесів дихання і фосфорилювання (V3/ V4). За умов окиснення НАД-залежного субстрату дихального ланцюга зниження фосфорилюючого дихання в стані V3 супроводжувалося зменшенням дихального контролю та ефективності процесу окисного фосфорилювання (АДФ/О). Таким чином, спостерігалася тенденція до обмеження ролі НАД-залежних субстратів у загальному окисненні, за умов дії стресового чинника, яким можна розглядати моделювання ПС введенням ротенону.

*Основні результати підрозділу 3.3. відображені у публікаціях:*

*1. Путий ЮВ, Носар ВІ, Бєлікова МВ, Розова КВ. Зміни дихання мітохондрій у довгастому мозку щурів при експериментальному паркінсонізмі. Фізіол. журн. 2016; 65 (3) (додаток): 204-5. [37].*

*2. Путий ЮВ, Носар ВІ, Розова КВ. Функціональний стан мітохондрій у мозку, міокарді та легенях щурів при моделюванні паркінсоноподібного синдрому: корегувальна дія капікору. Abstracts of IV International Scientific and Practical Conference Vancouver, Canada , 2019. 631-41. [38].*

*4. Путий ЮВ, Сидоряк НГ, Розова ЕВ. Корректирующее влияние препарата капикор на структурные компоненты митохондриальной и эндотелиальной дисфункции при экспериментальном паркинсонизме. Ліки - людині. «Сучасні проблеми фармакотерапії і призначення лікарських засобів». Харків: НФаУ, 2020: 455 – 8. [40].*

**3.4. Експресія генів-кандидатів (DJ1, PINK1) у тканинах організму при експериментальному паркінсонізмі**

В загальному етіологія хвороби Паркінсона до теперішнього часу залишається нез'ясованою у повному обсязі. Проте не піддається сумніву, що в її розвитку одне з чільних місць, поряд з впливами, що призводять до пошкодження дофамінових нейронів, виснаження в них запасів дофаміну з наступним їх пошкодженням, займає генетична компонента. З точки зору генетичного поліморфізму ХП являє собою не одне захворювання, а гетерогенну групу захворювань з широким спектром клінічних проявів в залежності від асоційованого гена. Вивчення генетичної природи захворювання почалося в кінці ХХ століття після ідентифікації мутації в гені, що кодує білок  $\alpha$ -синуклеїн (SNCA), виявлення ролі цього білка в утворенні тілець Леві і, відповідно, участі його в розвитку ХП. Сьогодні щорічно ідентифікуються нові мутації, асоційовані з розвитком даної патології. З багатьох досліджених генів-кандидатів часто розглядаються Parkin, PINK1 та DJ1 [166]. Як вже зазначалося, мутації Parkin вважають найпоширенішою причиною аутосомно-рецесивної ХП і особливо у поширенні захворювання з раннім початком. Parkin співпрацює з PINK1 в так званому контролі якості, наприклад нейроцитів, шляхом активації мітофагії в умовах пошкодження мітохондрій [219].

Мутації PINK1 є другою за частотою причиною ХП після Parkin. PINK1 функціонує найбільш помітно в активації мітофагії, накопичуючись на зовнішній мітохондріальній мембрані в умовах пошкодження мітохондрій [248]. Конкретний механізм патогенності гена при ХП на сьогодні незрозумілий і вимагає подальшого дослідження. Ген DJ-1 кодує молекулярний шаперон, який індукує оксидативний стрес. При наявності окисного стресу білок DJ-1 переноситься з цитоплазми в зовнішню мітохондріальну мембрану і може забезпечувати нейропротекцію [98].

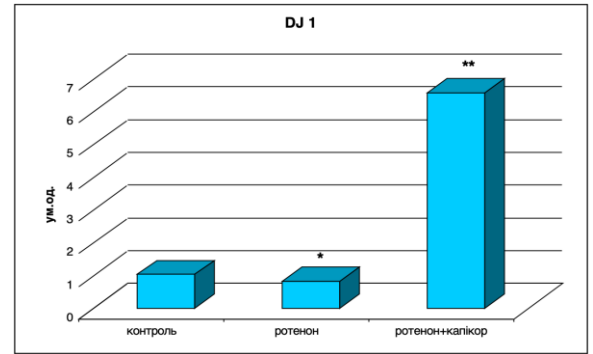
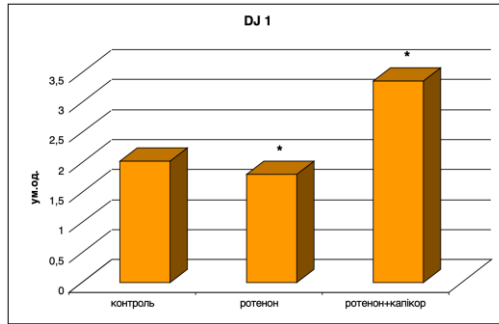
ХП супроводжується у нейронах порушенням динамічних процесів в мітохондріальному апараті, що супроводжується змінами енергетичного забезпечення клітин [134]. При хворобі Паркінсона відбувається придушення

мітохондріального поділу, тобто процесу fission. Порушення функції мітохондрій призводить до накопичення окисленого дофаміну, що викликає акумуляцію  $\alpha$ -синуклеїну і порушення функції лізосом [87]. Усі структурно-функціональні перебудови в мітохондріях супроводжуються генетично обумовленими процесами [204].

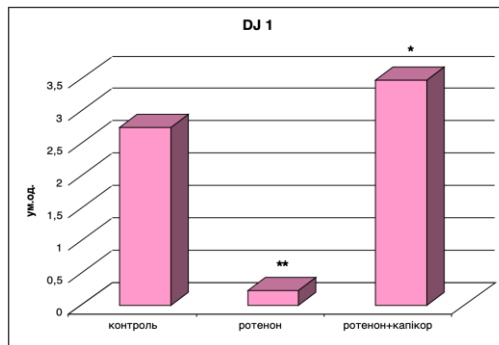
Описані вище уявлення висвітлюють переважно дослідження, котрі стосуються нервової тканини, хоча доведено, що причинами летальності при ХП є переважно бронхопневмонії або серцево-судинна патологія [167]. Таких досліджень є значно менше, що не дає сформувати завершену картину механізмів виникнення патологічних змін, що є необхідним для пошуку ефективних шляхів терапії ХП з метою поліпшення якості життя пацієнтів.

Проведені дослідження показали, що зміни рівня експресії мРНК гена DJ1 при експериментальному паркінсонізмі (ЕП) були односпрямованими в усіх досліджуваних тканинах, а саме її зниження: у довгастому мозку - на 11,4%; у стріатумі – на 19,2%; в тканині серця – у 11,7 рази, а в тканині легень - на 3 порядки, тобто майже до нуля (рис. 3.21). Отже попри односпрямованість змін, зниження експресії мРНК гена DJ1 при ЕП, як не дивно, було переважно більш вираженим не у тканинах мозку, а у тканинах досліджуваних вісцеральних органів.

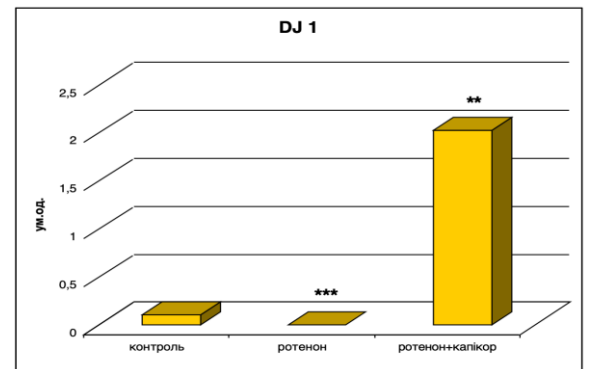
Щодо рівня експресії мРНК гена PINK1 то динаміка змін була також односпрямованою в усіх тканинах, проте зворотна до встановленої відносно гена DJ1 (рис. 3.22).



### Довгастий мозок



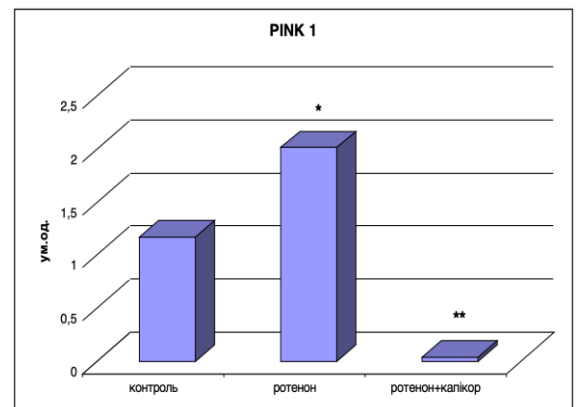
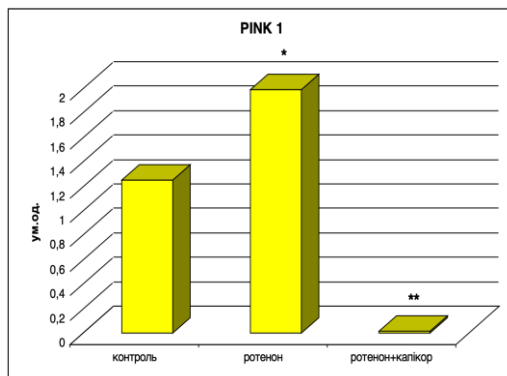
### Стріатум



### Серце

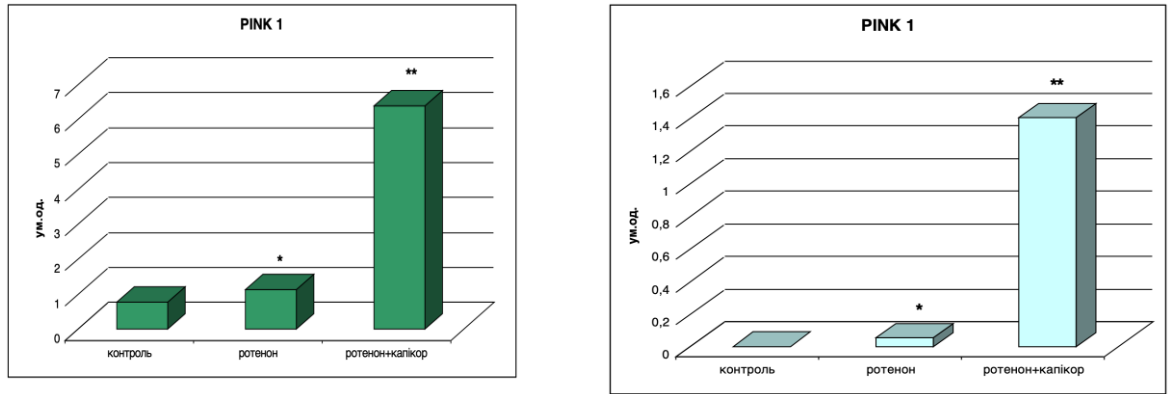
### Легені

**Рис. 3.21.** Зміни експресії мРНК гена DJ1 при експериментальному паркінсонізмі та застосуванні препарату Капікор. \* - достовірність відносно контролю  $p < 0,05$ ; \*\* - достовірність відносно контролю  $p < 0,01$ ; \*\*\* - достовірність відносно контролю  $p < 0,001$ .



### Довгастий мозок

### Стріатум



Серце

Легені

**Рис. 3.22.** Зміни експресії мРНК гена PINK1 при експериментальному паркінсонізмі та застосуванні препарату Капікор. \* - достовірність відносно контролю  $p < 0,05$ ; \*\* - достовірність відносно контролю  $p < 0,01$ .

Зростання експресії гена PINK1 становило у довгастому мозку – 59,2%; у стріатумі – 71,8%; в тканині серця – 46,8%, а в тканині легень – більш, ніж на порядок. Отже в тканинах мозку зміни експресії гена PINK1 також була суттєво менш вираженою, ніж в легенях та міокарді.

Оскільки вважають, що DJ1 безпосередньо пов'язаний з розвитком мітохондріальної дисфункції, є сенсором оксидативного стресу і здатний елімінувати перекисні сполуки шляхом самоокислення, а PINK1 діє як сенсор пошкодження мітохондрій і сприяє цьому процесу при значному накопиченні [98, 219], можна констатувати, що виявлені нами кількісні зміни в мітохондріальному апараті досліджуваних тканин та структурні пошкодження органел при ХП, встановлені у даних серіях досліджень, є значною мірою генетично обумовленими (табл. 3.11).

Таблиця 3.11

Кількісні зміни в мітохондріальному апараті досліджуваних тканин при експериментальному паркінсонізмі (M±m)

Умови експерименту	Загальна кількість мітохондрій, од/10мкм <sup>2</sup>	Середня кількість структурно пошкоджених мітохондрій, %
Довгастий мозок		
Контроль	14,3±1,8	8,4±1,2
Експериментальний паркінсонізм	9,4±1,6*	43,2±11,4**
Експериментальний паркінсонізм + Капікор	13,6±2,4	22,1±8,3*#
Стріатум		
Контроль	16,0±1,6	4,2±1,2
Експериментальний паркінсонізм	14,0±3,1	29,6±9,3*
Експериментальний паркінсонізм + Капікор	15,6±2,7	18,2±7,6*
Серце (значення середні для обох субпопуляцій мітохондрій – субсарколемальної та інтраміофібрилярної)		
Контроль	14,3±1,5	5,1±1,3
Експериментальний паркінсонізм	16,1±1,8	39,6±9,4**
Експериментальний паркінсонізм + Капікор	14,9±2,4	20,2±7,3*#
Легені		
Контроль	10,2±2,0	7,4±1,5
Експериментальний паркінсонізм	9,5±1,3	25,1±8,1*

Експериментальний паркінсонізм + Капікор	13,3±1,7	19,3±4,4*
--	----------	-----------

Примітки: \* - достовірність відносно контролю  $p < 0,05$ ; \*\* - достовірність відносно контролю  $p < 0,01$ ; # - достовірність відносно експериментального паркінсонізму без застосування Капікору  $p < 0,05$ .

Ймовірно, DJ1 та PINK1 можуть залучатися до цього процесу, котрий відбувається, з огляду на встановлений механізм їх впливу, значною мірою завдяки деполаризації мітохондріальних мембран, при порушенні імпорту білка та підвищення чутливості до перекисних сполук, тобто до оксидативного стресу, який є одним із головних патогенетичних механізмів розвитку ХП.

Отже, отримані результати показали, що при експериментальному паркінсонізмі окрім пошкодження ультраструктури мітохондріального апарату в клітинах тканин організму відбуваються значні зміни експресії мРНК генів DJ1 та PINK1, котрі пов'язують з участю у формуванні мітохондріальної дисфункції. Вони носять різноспрямований характер у тканинах мозку – зниження, та в тканинах серця та легень – зростання. Ступінь таких змін експресії є органоспецифічною і більшою мірою вираженою, як не дивно, у тканинах вісцеральних органів, а не у тканинах головного мозку.

Отримані дані свідчать про складний та неоднозначний взаємозв'язок рівня експресії досліджуваних генів-кандидатів, що беруть участь у формуванні експериментального паркінсонізму, та вираженості мітохондріальної дисфункції, яка є однією з патогенетичних причин розвитку паркінсонізму.

*Основні результати підрозділу 3.4. відображені у публікаціях:*

*1. Путь ЮВ. Деякі генетичні передумови формування мітохондріальної дисфункції при експериментальному паркінсонізмі. XII Всеукраїнської на-*

уково практичної конференції «Актуальні питання патології за умов дії надзвичайних факторів на організм». Тернопіль. 2020. 90-1. [33].

2. Путій ЮВ, Клименко ОО, Розова КВ. Деякі генетичні основи формування експериментального паркінсонізму. VIII Національний Конгрес патолофізіологів України «Патологічні фізіологія – охороні здоров'я України». 2020. Одеса. 166-8. [35].

3. Sidoryak NG, Putiy YV, Rozova EV. Investigation of structural-functional changes and features of genes - candidate expression in tissues of medulla oblongata and striatum under experimental parkinsonism. «Соціальні та екологічні технології: актуальні проблеми теорії і практики» XIII Міжнародна Інтернет-конференція. Мелітополь. 2021. 455-8. [40].

3. Rozova K, Putii Y. Is there an organ-specific expression of candidate genes (Dj1, PINK1) in tissues of the organism under experimental parkinsonism and its pathogenetic therapy? Open Access Peer-reviewed Journal Science Review. 2021; 1 (36): 31–7. doi: 10.31435/rsglobal\_sr/30012021/7378 [217].

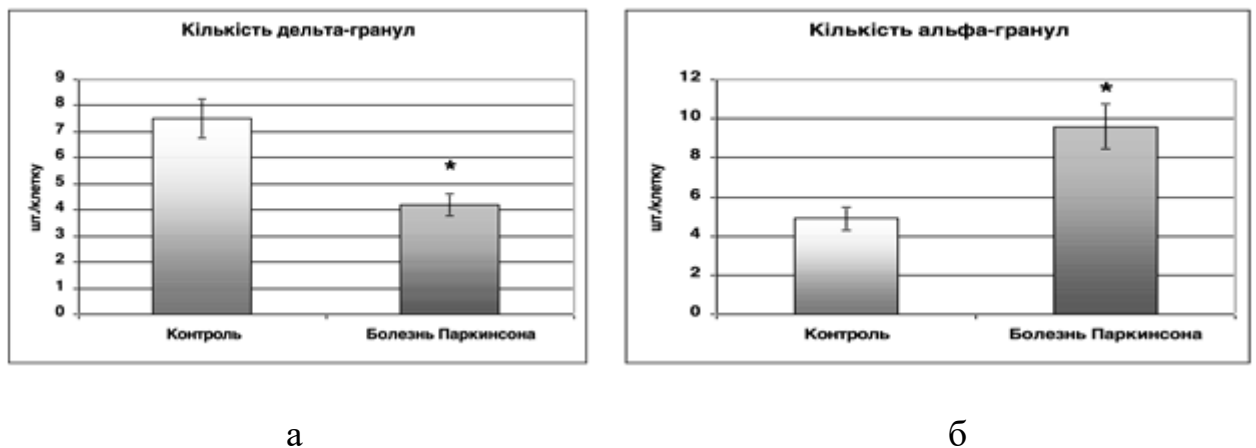
4. Путій ЮВ, Забуга ОГ, Розова КВ. Участь зміни експресії генів DJ1 та PINK1 у формуванні мітохондріальної дисфункції при експериментальному Паркінсонізмі, III науково-практична конференція студентів та молодих вчених з міжнародною участю, «Від експериментальної та клінічної патолофізіології до досягнень сучасної медицини та фармації». Харків. 2021. 141-3. [34].

### **3.5. Дослідження особливостей ультраструктури тромбоцитів у пацієнтів з хворобою Паркінсона**

Для вивчення МД, морфофункціонального стану інших клітинних органел і, опосередковано, ЕД у здорових людей і пацієнтів з різною патологією практично єдиними об'єктами (при відсутності оперативного втручання) є клітини крові, зокрема, тромбоцити. Вони являють собою високо спеціалізо-

вані без'ядерні клітини (по думку деяких дослідників - клітинні фрагменти, що утворилися з клітин-попередників – мегакаріоцитів [238]). Тромбоцити беруть участь у багатьох процесах в організмі, як пов'язаних, так і не пов'язаних з гемостазом: в регенерації тканин, розвитку запальних і імунних реакцій, забезпеченні первинного гомеостазу [129, 179]. Крім значної кількості різних гранул, що включають в себе глікопротеїни, білки, фактори росту, АДФ, АТФ, іони кальцію, серотонін, гістамін і т.п., тромбоцити містять певну кількість мітохондрій, що походять з мегакариоцитів, що дозволяє вивчати структуру і функції даних органел при розвитку патологічних станів різного генезу, у тому числі й ХП [258].

Електронномікроскопічне та морфометричне вивчення тромбоцитів (Т) у пацієнтів з ХП виявило наступне. Т були представлені переважно зрілими та старими клітинами. В них була знижена кількість щільних  $\delta$ -гранул, котра становила  $4,2 \pm 0,3$  шт. в клітині (у здорових осіб -  $7,5 \pm 0,8$  шт. в клітині;  $p < 0,05$ ) (Рис. 3.23 а, 3.24).

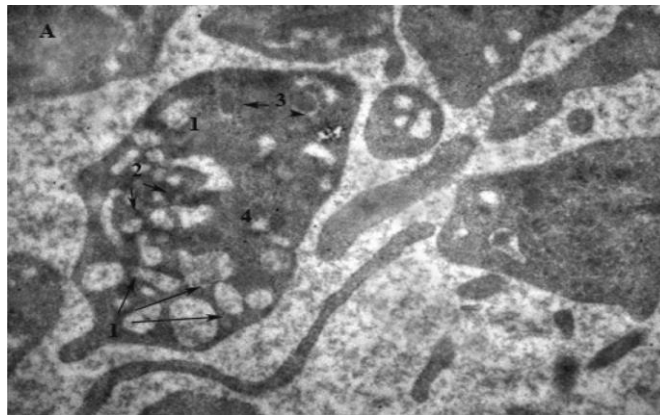


**Рис. 3.23.** Кількість гранул в тромбоцитах пацієнтів з хворобою Паркінсона. \* -  $p < 0,05$ .

Щільні гранули містять серотонін (С), а також акумулюють  $Ca^{2+}$ , містять АДФ та АТФ. Відомо, що важливою функцією Т є їх участь в метаболізмі С, причому кількість щільних гранул залежить саме від його кільк-

кості [109, 258]. Т – практично єдині клітини крові, у яких концентруються резерви С. Оскільки Т є резервуарами С, що надходить з плазми крові, його кількість, накопичена в  $\delta$ -гранулах, опосередковано свідчить про обмін С, котрий у обстежуваних пацієнтів значно знижений, що може обумовлювати наявність афективних розладів при ХП і вказувати на дисфункцію серотонінергічної системи, а також бути свідченням порушення регуляторних ефектів С відносно скоротливої здатності судинної стінки [139].

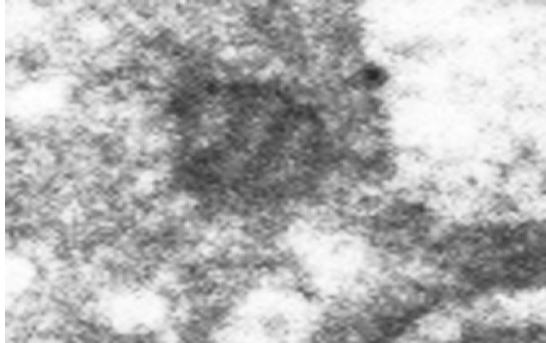
Кількість великих  $\alpha$ -гранул, котрі містять різні білки та глікопротеїни, що приймають участь в процесах згортання крові, фактори росту, протеолітичні ферменти, в Т була вищою, ніж у здорових людей (Рис. 3.23 б, 3.24) і досягала  $9,6 \pm 0,8$  шт. в клітині (у здорових осіб -  $4,9 \pm 1,1$  шт. в клітині;  $p < 0,05$ ). Можна припустити, що така значна кількість гранул, котрі містять антигепариновий фактор тромбоцитів 4, тромбоцитарний ростовий фактор, тромбоспондин (глікопротеїн G), які сприяють агрегації Т, вказує на зростання ризику тромбоутворення у пацієнтів з ХП [164].



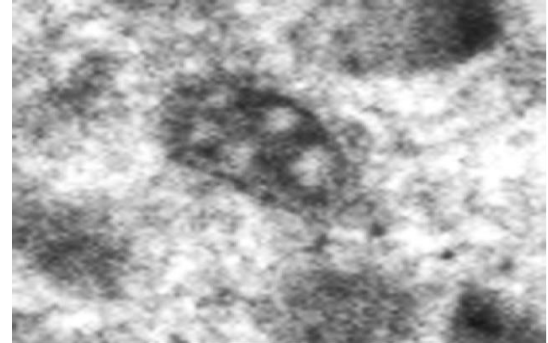
**Рис. 3.24** Ультраструктура тромбоцита у пацієнта з хворобою Паркінсона. 1 -  $\alpha$ -гранули, 2 – мікротрубочки, 3 -  $\delta$ -гранули, 4 – мітохондрії. Зб. 12000.

Значні порушення були виявлені в ультраструктурі МХ в Т хворих. Часто окрім втрати чіткості мембран МХ (зовнішньої та/або внутрішньої, кри-

стоутворюючої) спостерігалось утворення септованих органел (сМХ) (Рис. 3.25 б).



Контрольна група



Пацієнти з ХП

**Рис. 3.25.** Особливості ультраструктури мітохондрій тромбоцитів при хворобі Паркінсона. Зб. 32000.

Механізми та причини утворення сМХ до теперішнього часу є недостатньо дослідженими. Припускають, що цей процес подібний до ретенції, викликаній порушеннями транспорту метаболітів між внутрішньою мембраною МХ та цитоплазмою, крім того вважають, що сМХ здатні акумулювати  $\text{Ca}^{2+}$ . Оскільки відомо, що акумуляція  $\text{Ca}^{2+}$  та синтез АТФ – альтернативні процеси, пов'язані з переносом електронів, то посилення Са-акумулюючої здатності МХ може вказувати на зменшення синтезу АТФ в них. Крім того, існує думка, що поява сМХ свідчить про парціальний некроз клітини. На теперішній час вважають, що модуляції експресії ще одного гена, котрий може приймати участь у формуванні МД при ХП, гена ОПА1 впливають на утворення МХ з подібною формою крист, а також на величину дихального коефіцієнта МХ *in vivo* [111].

Отримані результати можуть вказувати на деякі механізми, що приймають участь у формуванні та перебігу патологічного процесу при хворобі Паркінсона. Особливості ультраструктури тромбоцитів у пацієнтів з ХП опо-

середковано дають підставу вважати, що розвиток захворювання супроводжується порушеннями з боку судинної стінки, зумовленими змінами функції серотонінергічної системи. При цьому, мабуть, підвищується і схильність до тромбоутворення, що в комплексі може сприяти формуванню патології серцево-судинної системи. Виявлені ж в ході досліджень порушення в мітохондріальному апараті клітин є прямим свідченням того, що при ХП, принаймні в клітинах крові, розвивається МД.

*Основні результати підрозділу 3.5. відображені у публікаціях:*

1. Розова КВ, Гончар ОО, Путій ЮВ, Маньковська ІМ. Вплив альфаліполієвої кислоти на про- та антиоксидантний баланс і активність тромбоцитів у пацієнтів з цукровим діабетом 2-го типу. *Експериментальна і клінічна медицина*. 2016;. 71 (2): 161-5. [43].

2. Rozova K, Putii Y. *The ultra structural peculiarities of the cardio-pulmonary insufficiency in experimental Parkinsonism and diabetes: the possibility of correction. Comorbidity in Pulmonology, Truskavetz*. 2017. 20-2. [218].

3. Розова ЕВ, Путій ЮВ, Беликова МВ. Морфофункціональні порушення в тромбоцитах у пацієнтів ссахарным діабетом второго типу и болезнью паркинсона: возможности коррекции. 2017; 15 (2): 94-106. [44].

### **3.6. Застосування препарату Капікор при тривалому застосуванні Ротенону та хворобі Паркінсона**

#### **3.6.1. Вплив препарату Капікор при експериментальному паркінсонізмі**

Проведені дослідження ультраструктури тканин при експериментальному паркінсонізмі і тромбоцитів у пацієнтів з ХП, морфофункціонального стану мітохондріального апарату за тих же умов та деяких генетичних чин-

ників формування експериментального паркінсонізму дозволило довести наявність ознак мітохондріальної та ендотеліальної дисфункції, ступінь вираженості яких мала органоспецифічний характер. За таких умов формується хибне коло, котре сприяє розвитку вторинної тканинної гіпоксії, яка, в свою чергу, сприяє поглибленню нейродегенерації та порушень ультраструктури в досліджуваних тканинах легень та серця (рис. 3.26).



**Рис. 3.26.** Розвиток вторинної тканинної гіпоксії при експериментальному паркінсонізмі та хворобі Паркінсона.

За таких умов корегуючі заходи мають включати антигіпоксичні підходи та препарати, до яких, зокрема, належить Капікор (рис. 3.27).



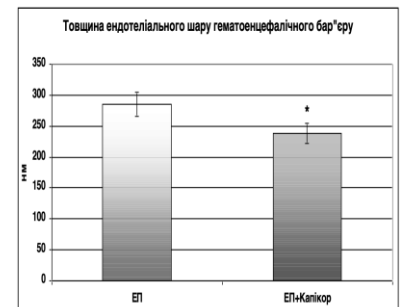
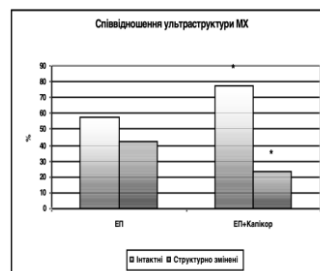
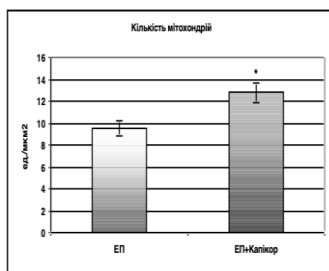
**Рис. 3.27.** Особливості препарату Капікор.

Препарат Капікор, завдяки наявності в його складі мельдонія дигідрату здатний впливати на індукцію біосинтезу NO, захищати клітини від токсичного впливу вільних радикалів, нормалізувати оксидантний гомеостаз на клітинному рівні, позитивно впливати на функцію ендотелію [191]. Таким чином він обумовлює виражені і швидкі NO-залежні ефекти: судинорозширювальний, антиагрегантний, антикоагулянтний; впливає на регуляцію апоптозу і проліферацію і підтримання судинного гомеостазу.

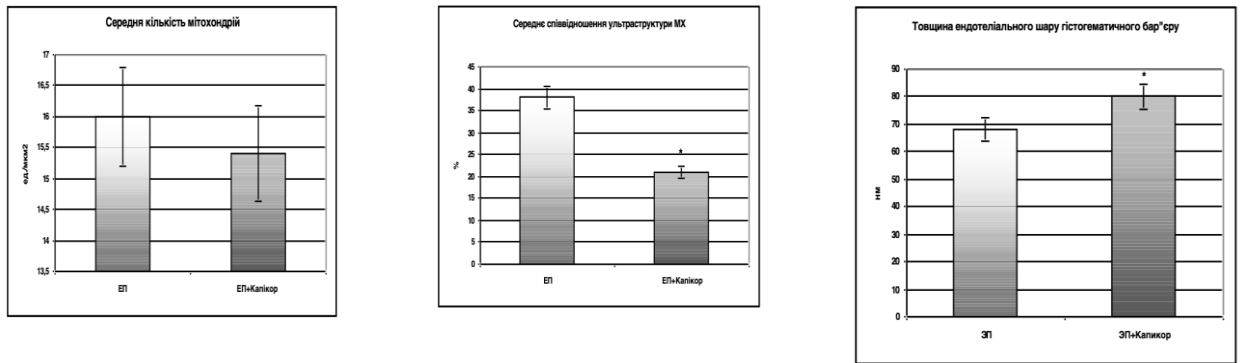
Роль  $\gamma$ -бутеробетаїну дигідрату полягає в гальмуванні транспорту довланцюгових жирних кислот і їх метаболітів в мітохондріях завдяки зниженню біосинтезу карнітину, що зберігає аеробний шлях метаболізму в умовах тканинної гіпоксії, запобігає виснаженню запасів АТФ і креатинфосфату в клітинах [6]. Завдяки такому, досить широкому спектру ефектів, Капікор, мабуть, може ефективно зменшувати вираженість як ЕД, так і МД.

Під впливом К дійсно суттєво зменшувалися прояви МД та ЕД, причому більш помітна нормалізація ультраструктури спостерігалася в тканинах з первісно вираженими пошкодженнями, а саме – в довгастому мозку та міокарді. Відмічались: активація морфогенезу МХ зі зростанням їх кількості на 20-45% в залежності від досліджуваної тканини, зниження гіпергідратації біологічних бар'єрів (див. табл. 3.11, Рис. 3.28); значне відновлення конвейера МХ зі зменшенням кількості структурно пошкоджених органел (Рис. 3.29).

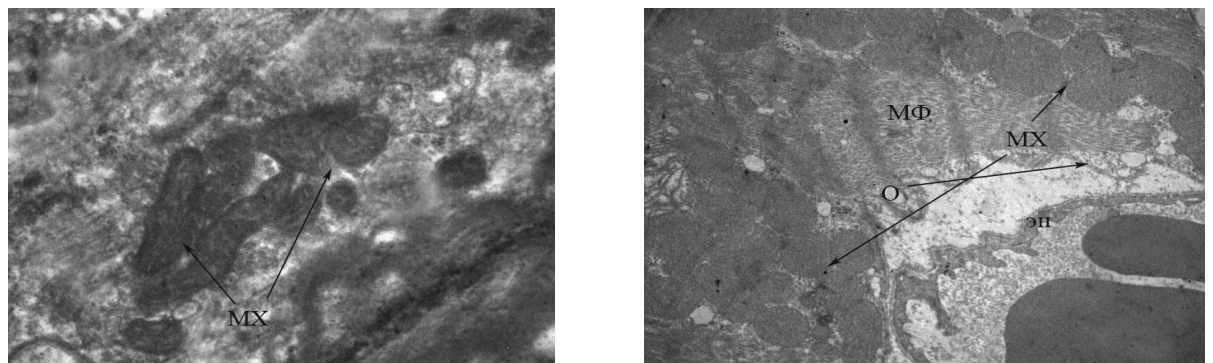
### Довгастий мозок



## Міокард



**Рис. 3.28.** Вплив Капікору на морфометричні показники ультраструктури тканини довгастого мозку та міокарду. \* -  $p < 0,05$



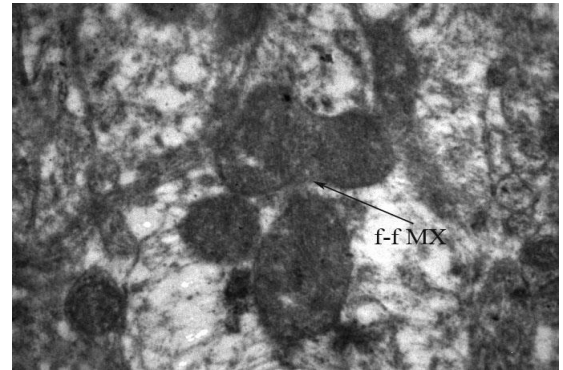
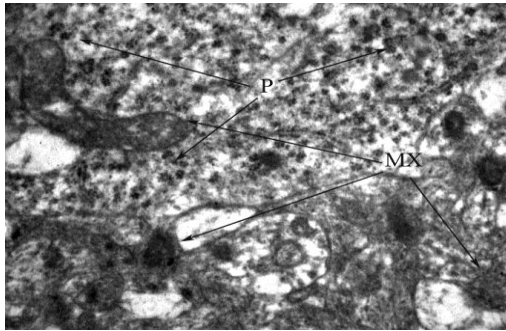
а

б

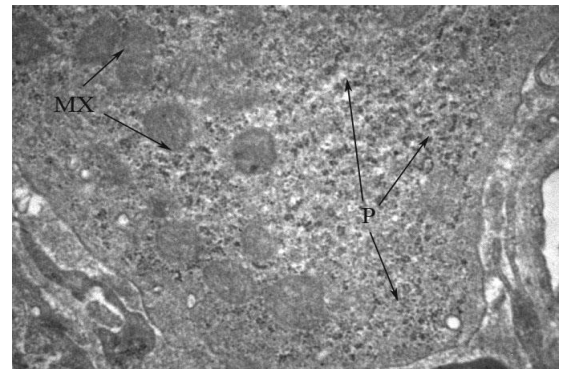
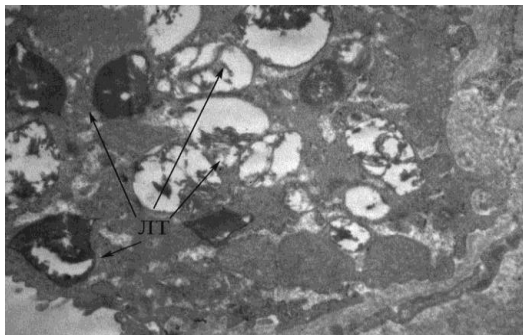
**Рис. 3.29.** Ультраструктура довгастого мозку (а) та міокарду (б) під впливом Капікору та тривалому введенні Ротенону. МХ – мітохондрії, МФ – міофібрили, ен – ендотелій, О – набряк. Зб. 9600

Візуально в усіх тканинах *неочікувано* виявлялася активація синтезу фосфоліпідів і білка; динамічних процесів в мітохондріальному апараті клітин; піноцитозного механізму проникнення в ендотеліальні клітини високомолекулярних сполук (особливо в стріатумі та тканині легень) (Рис. 3.30).

## Стріатум



## Легені



**Рис. 3.30.** Ультраструктура стріатуму та тканини легень під впливом Капікору та тривалому введенні Ротенону. МХ – мітохондрії, Р – рибосоми, ЛТ – ламелярні тільця, f-fMX – процес fission-fusion мітохондрій. Зб. 9600

Аналізуючи отримані результати відзначимо, що вплив ротенону на тлі щоденного введення капікору на енергетичний обмін в тканинах мозку, серця та легень щурів засвідчив існування модифікуючого протекторного ефекту цього препарату.

Щодо тканини довгастого мозку, то після введення капікору V4 S, V3 та АДФ/О поверталися до рівня контрольних значень (див. табл. 3.5, 3.6). За умов окиснення НАД-залежних субстратів дія К супроводжувалася однонаправленими, але менш значними змінами показників окисного фосфорилу-

вання в мітохондріях порівняно з такими при окисненні ФАД-залежного субстрату.

У групи тварин, яким після відтворення ротенонової моделі ЕП ще додатково наступні 2 тижні внутрішньоочеревинно вводили водний розчин препарату К в міокарді досліджувані показники функції мітохондрій покращилися в середньому в два рази в порівнянні з групами, яким вводили тільки Р (див. табл. 3.7, 3.8). Слід зазначити, що всі відзначені процеси в системі відбувалися значно активніше при додаванні НАД залежних субстратів.

Аналізуючи вплив введення К при ЕП нами було показано, що показники, котрі характеризують енергетичний метаболізм в тканині легень, достовірно не відрізнялися від характерних для контрольних щурів (див. табл. 3.9, 3.10).

Отже, отримані результати свідчать, що вплив Р на тлі щоденного введення К на енергетичний обмін в тканинах мозку, серця та легень щурів вказують на існування модифікуючого протекторного ефекту цього препарату.

Отримані результати є підтвердженням того, що Капікор виявляє стимульовальні ефекти на процеси окисного фосфорилування, які зумовлені економізацією роботи дихального ланцюга мітохондрій через переважну активацію НАД-залежних субстратів і може використовуватися для спрямованої метаболічної корекції негативних порушень кисневого забезпечення органів, викликаних нейродегенерацією. Таким чином, застосування капікору призводить до зниження пошкодження мітохондрій у щурів при ротеноніндукованому паркінсонізмі.

Отримані результати, до певної міри, можна пов'язати зі змінами експресії генів, задіяних в морфофункціональній модифікації мітохондрій. Було показано, що К може, як виявилось, ефективно знижувати не тільки вираженість мітохондріальної дисфункції, а й впливати на рівень експресії мРНК генів, в нашому випадку DJ1 і PINK1 (див. рис. 3.21, 3.22), тим самим, впливаючи на механізми розвитку паркінсонізму, що ймовірно може сприяти

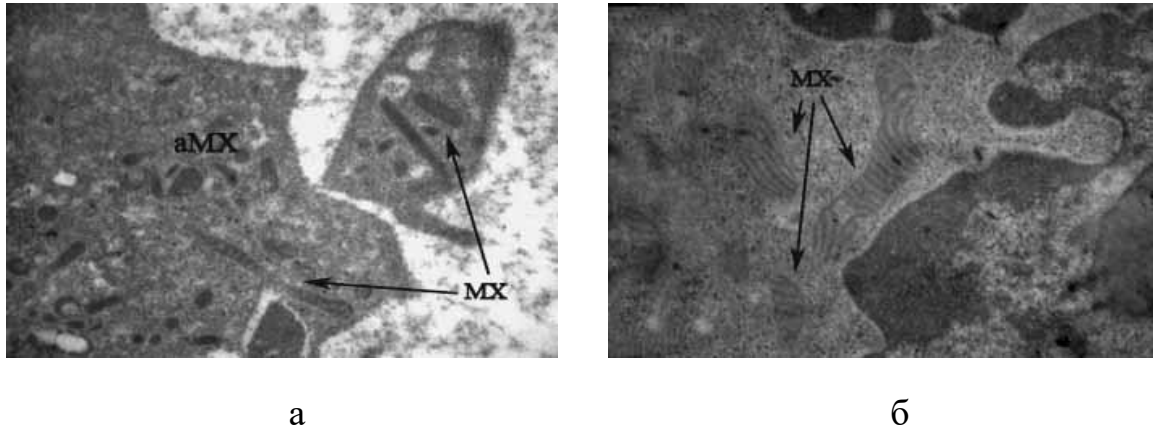
поліпшенню якості життя пацієнтів з ХП і попереджувати розвиток супутніх патологій.

Слід зазначити, що під впливом К рівень експресії DJ1, знижений у всіх досліджуваних тканинах у різному ступені, істотно підвищувався значно перевершуючи вихідні рівні, особливо в тканини стріатума (в 6,4 рази) і легнях (більш, ніж в 20 разів). Що стосується експресії гена PINK1, то вона також змінювалася не тільки органоспецифічно, але ще і різноспрямовано: різко зменшуючись (майже на 2 порядки) нижче початкового рівня в тканинах мозку і ще більше зростаючи, ніж при ЕП в тканинах серця (в 8,3 рази) і легень (в 9,4 рази). Якщо врахувати, що при застосуванні Капікора істотно зменшувалася кількість структурно пошкоджених при ЕП МХ, і при цьому відбувається зсув експресії мРНК гена DJ1 в сторону контрольних значень і навіть перевищення його, можна припустити існуючу роль даного генетичного механізму в нормалізації мітохондріального апарату клітин досліджуваних тканин. Щодо експресії мРНК гена PINK1 і її змін при застосуванні Капікора, то по всій видимості прямому взаємозв'язку з ультраструктурою МХ не проглядається. Ясність в це питання, як і уточнення ролі органоспецифічності експресії генів-кандидатів на роль ініціаторів розвитку нейродегенеративних патологій - DJ1 і PINK1 - може внести проведення подальших досліджень. Такі дослідження тим більш актуальні, оскільки показана можливість змін рівня експресії генів за допомогою застосування антиоксиданту широкого спектра дії, що може сприяти пошуку ефективних шляхів терапії супутньої патології.

### **3.6.2. Застосування препарату Капікор при лікуванні пацієнтів з хворобою Паркінсона**

При електронномікроскопічному дослідженні клітин крові у пацієнтів з ХП після лікування за допомогою Капікору встановлено його безсумнівний

позитивний вплив. Особливо це стосується стану мітохондріального апарату Т та лейкоцитів (Л), котрі також були долучені до дослідження (рис. 3.5.4).



**Рис. 3.31.** Мітохондріальний апарат тромбоцитів (а) та лейкоцитів (б) у пацієнтів з ХП при застосуванні Капікору. МХ – мітохондрії, аМХ – аутофагія мітохондрій. Зб. 9600 (а), 12000 (б)

Особливістю впливу препарату, як виявилось, є його здатність інтенсифікувати морфогенез МХ (табл. 3.5.1) та процес їх продольної асоціації (тобто процес fusion) з утворенням органел, середній діаметр яких досягав 1 мкм, а співвідношення максимального та мінімального діаметрів подекуди становило 1:7 (рис. 3.31 а), на 29,5% збільшувалася середня площа МХ. Окрім цього спостерігається значна кількість органел з дугоподібними кристами, особливо в Л (рис. 3.31 б). Такі зміни вважають свідченням зростання енергетичних можливостей МХ [29, 74]. Звертає на себе увагу значне збільшення інтенсивності аутофагії МХ (кількість МХ в стані аутофагії зростало у 2,5-3,7 рази в залежності від типу клітини). Вважають, що аутофагія (А) – один із засобів позбавлення клітин від пошкоджених органел та один з механізмів адаптації до широкого спектру несприятливих умов існування клітин. Тому інгібування А часто призводить до апоптотичної або некротичної загибелі клітини в цілому. Така ситуація спостерігається в патогенезі ря-

ду захворювань, зокрема й нейродегенеративних [165, 215]. Аутофагія сприяє підтриманню високих рівнів АТФ в клітині, підвищує здатність клітин протистояти метаболічному стресу, обмежує накопичення потенційно токсичних білків (в тому числі протеотоксинів), що викликають нейродегенерацію [192, 220].

Покращилися морфометричні характеристики Т (див. табл. 3.12). Під впливом Капікора покращилися і інші морфометричні характеристики тромбоцитів. Достовірно (в середньому на 47,6%) збільшувалася кількість δ-гранул, досягаючи величини, властивої здоровим особам (див. табл. 3.12).

Таблиця 3.12

Характеристики ультраструктури тромбоцитів у пацієнтів з хворобою Паркінсона (M±m)

Групи пацієнтів	Кількість дельта-гранул, шт. в клітині	Кількість альфа-гранул, шт. в клітині	Кількість МХ, шт. в клітині
1. Контроль	7,5±0,8	4,9±1,1	2,7±0,6
2. До лікування Капікором	4,2±0,2*	9,5±1,3*	2,1±0,8
3. Після лікування Капікором	6,2±0,3#	6,3±0,9*#	7,4±1,1*#

Примітки: \* - різниця між 2,3 і 1 групами достовірна (p<0,05); # - різниця між 2 і 3 групами достовірна (p<0,05)

Можна припустити, що застосування К позитивно позначалося на стані судинної стінки і сприяло зменшення ризику розвитку серцево-судинної патології. Кількість же α-гранул також достовірно - більше, ніж на 50% - зменшувалася (див. табл. 3.12), що можна певною мірою розглядати як ефект, що свідчить про зниження схильності до тромбоутворення.

Застосування з терапевтичною метою препарата, з потужними властивостями антиоксиданта і / або здатних впливати на вираженість ЕД і МД, призводить до істотного поліпшення морфофункціонального стану тромбоцитів як в плані їх утворення (набувають більших розмірів, що свідчить про наявність молодих клітин), так і функціонування (на що вказує зміна кількості гранул та органел).

Можна дійти до висновку, що включення в комплексну терапію ХП, препарата, який не впливає на основну патогенетичну ланку захворювання (нейродегенерація), ймовірно, здатне до певної міри запобігати формування (або зменшувати прояви) супутньої патології, обумовленої порушеннями, що відбуваються в судинній стінці, і розвитком мітохондріальної дисфункції. До того ж, якщо згадати, що в умовах експерименту застосування препарату призводило до значної активації синтезу фосфоліпидів, а саме – легеневих сурфактинтів, можна також припустити й проєктивний ефект Капікору щодо розвитку легеневої патології у таких пацієнтів.

*Основні результати підрозділів 3.6.1. та 3.6.2 відображені у публікаціях:*

1. Путій ЮВ, Носар ВІ, Розова КВ. Функціональний стан мітохондрій у мозку, міокарді та легенях щурів при моделюванні паркінсоноподібного синдрому: корегувальна дія капікору. *IV International Scientific and Practical Conference. Vancouver. Canada. 2019: 631 – 41. [38].*

2. Путій ЮВ, Носар ВІ, Белікова МВ, Розова КВ. Зміни дихання мітохондрій у довгастому мозку щурів при експериментальному паркінсонізмі. *Фізіол. журн. 2016; 65 (3, додаток): 204-5. [37].*

3. Путій ЮВ, Сидоряк НГ, Розова ЕВ. Корректирующее влияние препарата капикор на структурные компоненты митохондриальной и эндотелиальной дисфункции при экспериментальном паркинсонизме. *Ліки - людині. Харків. 2020. 455-8. [40].*

4. Rozova K, Putii Y. *The ultrastructural peculiarities of the cardio-pulmonary insufficiency in experimental Parkinsonism and diabetes: the possibility of correction. Comorbidity in Pulmonology. Truskavetz 2017. 20-2. [218].*

## РОЗДІЛ 4.

### ОБГОВОРЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ

Збільшення тривалості життя в розвинених країнах світу і тенденція до старіння населення зумовили збільшення поширеності паркінсонізму і хвороби Паркінсона (ХП). Такі тенденції призводять до зростання соціального та економічного тягаря на суспільство з постарінням населення, і не останню роль в цьому відіграють ейродегенеративні захворювання, котрі призводять до погіршення якості життя та інвалідизації і займають провідне місце серед геріатричних захворювань [15, 73]. Хвороба Паркінсона є другим за частотою (після хвороби Альцгеймера) нейродегенеративним захворюванням. За даними різних досліджень, поширеність ХП варіює від 60 до 160 на 100 тис. населення, а захворюваність на ХП становить від 12 до 20 на 100 тис. на рік [Юхно Н.Н. Болезнь Паркинсона – достижения и новые вопросы. Руководство для врачей. М.: 2008; С. 7 – 8]. Проте не слід мати на увазі, що за даними міжнародної асоціації «Робоча група по хворобі Паркінсона», найближчим часом ХП помітно торкнеться осіб працездатного віку. Адже вже сьогодні нею занедужує кожен десятий пацієнт до 50 років і кожен двадцятий - до 40 років, і це без врахування, так званого, ювенільного паркінсонізму або пракінсонізму з раннім початком [177]. Натепер вважають, що переважна частина випадків останнього пов'язана з рецесивними мутаціями нещодавно відкритих генів Паркіна, DJ.1 і PINK1, продукти яких контролюють процесінг нейрональних білків і особливості окисного метаболізму нігральних нейронів [2].

Незважаючи на вищезазначене, на тривалу історію дослідження захворювання етіологія ХП досі невідома. Ймовірно, в розвитку захворювання лежать вікові, генетичні та середовищні фактори (інфекції, інтоксикації, вплив металів, пестицидів, травмування тощо); ХП носить переважно спорадичний

характер. З спадковими факторами пов'язане лише невелика кількість випадків ХП (10%). Передбачають, що генетична схильність збільшує чутливість нігростріарної системи до впливу вказаних факторів і процесів старіння [84, 250].

Відповідно до сучасної концепції патогенезу ХП, дегенерація нігростріатних нейронів викликається порушеннями внутрішньоклітинного метаболізму: окислювальним стресом, ексайтотоксичність глутамату, надмірним надходженням всередину клітин іонів кальцію, зростанням активності внутрішньоклітинних протеаз, порушенням мітохондріального дихання з енергетичним дефіцитом нейрона, порушенням метаболізму заліза тощо. Ці фактори призводять до активації апоптозу; проте пусковий механізм, взаємодія і послідовність патогенетичних факторів нейродегенерації залишаються неясними [184, 221].

Отже, дослідження, присвячені з'ясуванню та уточненню патогенетичних механізмів розвитку паркінсонізму та ХП, мають не думку дослідників та практикуючих медиків неабияку актуальність.

Для з'ясування таких механізмів, як вказувалося, часто використовують модельні дослідження, зокрема моделювання експериментального паркінсонізму за допомогою ротенону [99], яка дозволяє відтворити значну кількість ознак ХП, включаючи й вплив на дихальний ланцюг мітохондрій. Саме таку модель ми використовували в нашій роботі.

В першу чергу, було досліджено вплив одноразового введення ротенону на ультраструктуру тканин мозку, легень та міокард.

Як показали наші дослідження, попри те, що при однократному введенні ротенону не було виявлено загибелі тварин, зміни, що відбувалися в морфофункціональному стані тканин довгастого мозку щурів в порівнянні з контрольною групою були істотними. Слід звернути увагу на більш, ніж 20-и разове зростання кількості структурно змінених МХ, що полягало у частковій або повній вакуолізації, руйнуванням МХ, утворенні септованих МХ,

що є свідченням «парціального некрозу» клітин; подекуди спостерігалася деструкція крист, різка гіпергідратація матриксу, що призводило до збільшення у 3,6 рази середнього діаметру МХ. Причому такі порушення відбувалися на тлі зменшення загальної кількості органел (на 33,8%). Тобто ротенон (а відтак і експериментальний паркінсонізм) у мозковій тканині викликає розвиток мітохондріальної дисфункції, що призводить до порушення енергетичного метаболізму тканини.

Ми звернули увагу на те, що паралельно з розвитком МД виявлялося порушення структури мієліну з набряком та деструкцією мієлінових волокон; клінічним проявом останнього вважають формуванням судорожних станів, притаманним не тільки експериментальним умовам, а й хворим з ХП [50, 108].

Також за умов експерименту були виявлені і суттєві порушення ультраструктури міокарда. Окрім МД виявлено структурні ознаки ендотеліальної дисфункції з вираженими змінами ультраструктури ендотелію капілярів з його набряком та деструкцією. Останнє дозволяло просочуватися в перикапілярний та навколоклітинний простір еритроцитам. Спостерігався також набряк та деструкція сарколеми, що вказує на порушення міжклітинного обміну інформацією в міокарді [46]. Встановлено різке розширення цистерн саркоплазматичного ретикулуму, що, ймовірно, вказує на зміни обміну кальцію, що може розглядатися як передумови для розвитку кардіоміопатії при формуванні паркінсоноподібного стану [86, 210]. Порушення ультраструктури МХ носили мозаїчний характер: часткова та повна вакуолізація; руйнування МХ мембран. Порушення ультраструктури МХ в міокарді носили мозаїчний характер у вигляді часткової та повної вакуолізації; руйнування МХ мембран (переважно внутрішньої), загальна кількість МХ при цьому достовірно збільшувалася. Встановлено, що, незважаючи на мозаїчність змін, більше 1/6 органел субсарколемальної субпопуляції і більше як 1/5 МХ з інтраміофібрилярної субпопуляції були структурно

зміненими. На противагу існуючим даним [55], нами було показано виражену активацію мітоптозу. Останнє слід відносити до позитивних змін, оскільки це один з шляхів (поряд, наприклад, з мітофагією) знешкодження «патологічних» МХ, здатних запускати мітохондріальний шлях апоптозу [27].

З досліджуваних нами тканин найменші зміни в МХ спостерігалися під впливом ротенону у тканині легень в порівнянні з контролем. Переважно мав місце помірний набряк аерогематичного бар'єру, а також у помітні прояви аутофігії, що можна розглядати як прояв адаптації мітохондріального апарату при несприятливому впливі [145]. Тим більше, що у ході дослідження не були відзначені різко виражені порушення ультраструктури МХ тобто МД.

Отже, при одноразовому введенні ротенону про наявність МХ та ендотеліальної дисфункції та оксидативного стресу повною мірою можна говорити щодо мозкової тканини, частково — про тканину серця; у тканині легень такий вплив виражених змін не викликає. На підтвердження саме такої динаміки можна навести отримані останнім часом дані щодо утворення при ХП тілець Леві (глибок з  $\alpha$ -синуклеїну) не тільки в мозку, а й у міокарді [62, 135]. В тканині легень таких утворень дотепер не знайдено.

Тривале введення тваринам ротенону супроводжувалося розвитком паркінсоноподібного стану, котрий визначається як експериментальний паркінсонізм. До його ознак належали такі клінічні прояви як гіпокінезія, слинотеча, ригідність м'язів, втрата маси тіла (на 10-15%), до чого з часом додавалися напади каталепсії, птоз, наростаюча ригідність м'язів тулуба та кінцівок, характерний „горбатий силует”, явища постуральної нестабільності, трофічні виразки шкіри. Відмічалася загибель тварин, котра становила 25-40% у групах щурів, котра не залежала від сезону дослідження.

При тривалому введенні ротенону (Р), як зазначалося у підрозділі 3.1.2 найбільш виражено поглиблювало прояви мітохондріальної та ендотеліальної дисфункції, а відтак й оксидативного стресу саме у довгастому мозку. Причини цього нами описані. Слід лише підкреслити, що було встановлено

достовірне зменшення загальної кількості МХ (на 35,7%;  $p < 0,05$ ), різке зростання їх середнього діаметра (на 65,5%;  $p < 0,05$ ) та кількості септованих органел. Щодо ендотеліальної дисфункції, то зростала її структурна складова, а саме - гіпергідратація ендотеліального шару гематоенцефалічного бар'єру (на 35,5%,  $p < 0,05$ ). Все це може бути безпосередньою причиною пошкодження безпосередньо не тільки нейроцитів, а й нервової тканини в цілому, свідченням чого ми вважаємо значні пошкодження мієлінових оболонок з їх набряком та деструкцією.

Оскільки розвиток паркінсонізму супроводжують нейрохімічні зміни в стріатумі [3], ми вивчали також ультраструктуру цієї тканини. При експериментальному паркінсонізмі структура стріатуму також зазнавала негативних змін під впливом Ротенону, однак зміни були менш вираженими, ніж у довгастому мозку. Ми знайшли підтвердження початку формування компенсаторних реакцій. Суттєво усувалися прояви МД, а саме: не спостерігалось достовірного зменшення кількості МХ, при цьому суттєво активувалися динамічні fission-fusion процеси в мітохондріальному апараті, котрі, як вказувалося, пошкоджуються значно пошкоджувалися при нейродегенерації, особливо в частині fission. Тобто можна передбачити відносну нормалізацію обмінних процесів між МХ, та поліпшення енергетичного метаболізму при ЕП [64, 244]. Ймовірно компенсаторні процеси при хронізації процесу розвиваються в тканинах мозку (досліджуваних нами) не одночасно, а у порядку, зворотному залученню структур в розвиток патології.

При тривалому введенні Р у міокарді розвивалися виражена мітохондріальна та ендотеліальна дисфункції. Причому слід відмітити, що саме в міокарді структурний компонент ЕД був виражений з досліджуваних тканин найбільше, а саме лише в міокарді спостерігалось потоншення ендотеліального шару гістогематичного бар'єру, обумовлене вираженими деструктивними процесами в ендотелії. При цьому, як було нами встановлено, спостерігалась гіпергідратація як перикапілярних просторів, так і міокарду в цілому з

внутрішньоклітинним набряком, набряком та деструкцією міофібрил тощо. До того ж і МД (її структурна складова) була значно вираженою близько 40% МХ (в середньому по обом субпопуляціям органел) виявлялися пошкодженими. Отже, за таких умов і доставка і споживання  $O_2$  в тканині мали бути порушеними, що призводить до розвитку вторинної тканинної гіпоксії. Тому стає зрозумілим, чому однією з найрозповсюдженіших причин розвитку супутньої патології та смертності пацієнтів з ХП є саме серцево-судинна [254].

Як і при однократному введенні Р тканина легень пошкоджувалася менше, ніж міокард, проте пошкодження ультраструктури були все ж достатньо вираженими. Спектр змін у мітохондріальному апараті свідчив про розвиток МД. Однак при цьому відсоток структурно пошкоджених органел був майже у 2 рази меншим, ніж у міокарді. Спостерігалася і гіпергідратація аерогематичного бар'єру легень, особливо його ендотеліального шару – його товщина в середньому на 30,2% ( $p < 0,05$ ). Незважаючи на вказане, загалом тканина легень пошкоджувалася менше, ніж міокард. Цей результат є не зовсім зрозумілим, оскільки бронхо-легенева патологія також відноситься до частішої супутньої патології при ХП, яка призводить до смертності пацієнтів. Мабуть у формуванні такої патології зміни ультраструктури відіграють не першочергову роль. Можна припустити провідне значення метаболічних процесів, котрі, звісно, відрізняються у тканинах легень та серця, попри їх приналежність до спільної кисеньтранспортної системи організму. Тим більше, що як вже неодноразово зазначалося, формування  $\alpha$ -синуклеїнових структур при паркінсонізмі притаманне окрім мозку міокарду (і ще деяким тканинам організму, наприклад, слинним залозам) та не встановлено для легеневої тканини.

Наступний етап наших досліджень стосувався вивченню деяких механізмів формування патологічних ультраструктурних змін при ЕП, зокрема в тканинах мозку. В першу чергу, увагу привернув факт суттєвого пошкод-

ження мієліну, попри те, що наявні на тепер дані ХП та паркінсонізм не відносяться до демієлінізуючих захворювань. Було встановлено, що за умов експерименту як в довгастому мозку, так і в стріатумі 50-70% мієліну (площа пошкоджень щодо загальної площі мієліну в полі зору) було деструктуровано та / або гіпергідратовано. Оскільки вважають, що при ураженні 40-60% всіх мієлінових оболонок розвиваються різні неврологічні синдроми, сукупність яких узагальнюється терміном «демієлінізуючі захворювання» [49], ми схилиємося до думки, що принаймні ЕП до такої патології має безпосереднє відношення. Тим більше, що в науковій літературі зазначається, що в останні роки спостерігається істотне збільшення числа патологічних станів, що супроводжуються пошкодженням мієліну.

Механізми виникнення таких змін при ЕП остаточно не з'ясовані. В нашому дослідженні показано, що активація АТФ-залежного К<sup>+</sup> каналу призводила до суттєвого поліпшення ультраструктури мієліну: при застосуванні УД лише 20-30% М залишалося деструктурованим та / або гіпергідратованим як в довгастому мозку, так і в стріатумі. Причина цього значною мірою, на наш погляд, полягає у оптимізації енергопродукції за рахунок поліпшення структурно-динамічних процесів в мітохондріальному апараті клітин і усунення МД, а, отже, і пластичних процесів, що вимагають енергетичних витрат. Про усунення МД в тканинах мозку при застосуванні УД свідчить активація морфогенезу МХ, зменшення кількості структурно змінених органел, помірне зростання величина середнього діаметра МХ, що свідчить про їх помірне набухання, котре вважають ознакою оптимізації синтезу АТФ [195]. Саме роль активації АТФ-залежних К<sup>+</sup> каналів доводиться усуненням позитивних змін ультраструктури тканин, зокрема МД та порушень ультраструктури М при блокаді вказаних каналів за допомогою їх селективного блокатора 5НД.

Численні дослідження останнього десятиліття показали, що одним з механізмів загибелі нервових клітин при дегенеративних захворюваннях не-

рвової системи, і зокрема при хворобі Паркінсона, є апоптоз [239]. Останній, як відомо відбувається, зокрема, за мітохондріальним шляхом. Причому дисфункція МХ безпосередньо пов'язана з оксидативним стресом. При ХП, паркінсонізмі (та інших патологічних станах) відбуваються взаємопов'язані процеси (рис. 4.1).



**Рис. 4.1.** Фактори і процеси, що призводять до загибелі клітин [3].

Отже, формування ультраструктурного компоненту МД при ЕП, причому не тільки в тканинах мозку, але й в серці та легенях, повинно супроводжуватися як загибеллю клітин, так і призводити до зміни енергетичної потужності МХ.

Так було показано, що у тканині головного мозку після введення роте-нону за умов окиснення як сукцинату (ФАД-залежного субстрату), так і глутамату з малатом (НАД-залежних субстратів) у мітохондріях сповільнювалося АДФ-стимульоване дихання, зменшувалося спряження дихання з фосфорилуванням на тлі зменшення ефективності споживання кисню.

У мітохондріях міокарду щурів показники дихальної активності за умов моделювання паркінсоноподібного стану також були суттєво відмінні від контрольних. Швидкість активного дихання при застосуванні обох субстратів зменшувалася (на 11,7 % з ФАД-залежними субстратами, та на 24% з

НАД-залежними субстратами). Величини АДФ/О, які відображають кількісний зв'язок між споживанням  $O_2$  і синтезом АТФ також зменшилися.

Отримані результати показали, що швидкість активного окиснення сукцинату ( $V_3$ ), швидкість “контрольованого” окиснення ( $V$  АТФ 4) у тканині легень знижуються не настільки значимо порівняно з тканинами мозку та міокарду. В порівнянні з іншими тканинами, легені піддавалися впливу ротенону найменше, що співпадає з описаними нами раніше результатами, отриманими при вивченні ультраструктури тканин, що вивчалися при ЕП.

Відомо, що роль накопичення  $\alpha$ -синуклеїну з утворенням або без утворення (у 25% випадків) тілець Леві в загибелі нейронів пояснюють з позицій оксидативного стресу, а також наявністю генетичних мутацій, що ведуть до пошкодження та інтранейронального його накопичення (рис. 4.2).



**Рис. 4.2.** Фактори, що впливають на агрегацію альфа-синуклеїну [3].

Отже, однією з причин розвитку ХП та ЕП є генетичний фактор із залученням генів, експресія яких найчастіше змінюється в таких умовах. Тому з точки зору генетичного поліморфізму ХП та паркінсонізм являє собою гетерогенну групу захворювань з широким спектром клінічних проявів в залежності від асоційованого гена.

Незважаючи на те, що мутації Parkin вважають найпоширенішою причиною аутосомно-рецесивної ХП і особливо у поширені захворювання з раннім початком, Parkin співпрацює з PINK1 в так званому контролі якості, наприклад нейроцитів, шляхом активації мітофагії в умовах пошкодження

мітохондрій [219]. Мутації PINK1 є другою за частотою причиною ХП після Parkin. Він функціонує найбільш помітно в активації мітофагії в умовах пошкодження мітохондрій [248]. Конкретний механізм патогенності цього гена при ХП на сьогодні незрозумілий і вимагає подальшого дослідження. Ген DJ-1 кодує молекулярний шаперон, який індукує оксидативний стрес, котрий лежить в основі МД, а відтак і загибелі клітин, яка притаманна нейродегенерації. Тому ми зосередилися саме на вивченні цих генів в тканинах при розвитку ЕП. Оскільки ХП є мультисимптомним та мультиорганичним захворюванням і супроводжується змінами не тільки в структурах мозку, але й у вісцеральних органах, особливості експресії мРНК генів DJ1 та PINK1 досліджували в тканинах довгастого мозку, стріатуму, серця та легень.

Проведені дослідження показали, що зміни рівня експресії мРНК гена DJ1 при ЕП були односпрямованими в усіх досліджуваних тканинах, а саме її зниження: у довгастому мозку - на 11,4%; у стріатумі – на 19,2%; в тканині серця – у 11,7 рази, а в тканині легень - на 3 порядки. Отже попри односпрямованість змін, зниження експресії гена DJ1 при ЕП, як не дивно, було переважно більш вираженим не у тканинах мозку, а у тканинах досліджуваних вісцеральних органів.

Щодо рівня експресії мРНК гена PINK1 то динаміка змін була також односпрямованою в усіх тканинах, проте зворотна до встановленої відносно гена DJ1. Зростання експресії гена PINK1 становило у довгастому мозку – 59,2%; у стріатумі – 71,8%; в тканині серця – 46,8%, а в тканині легень – більш, ніж на порядок. Отже в тканинах мозку зміни експресії гена PINK1 також була суттєво менш вираженою, ніж в легенях та міокарді.

Оскільки вважають, що DJ1 безпосередньо пов'язаний з розвитком мітохондріальної дисфункції, є сенсором оксидативного стресу і здатний елімінувати перекисні сполуки шляхом самоокислення, а PINK1 діє як сенсор пошкодження мітохондрій і сприяє цьому процесу при значному накопиченні [98, 219], можна вважати, що виявлені нами зміни в мітохондріальному апа-

раті досліджуваних тканин є значною мірою генетично обумовленими і до того ж органоспецифічними і більшою мірою вираженими, як не дивно, у тканинах вісцеральних органів, а не у тканинах головного мозку.

Паралельно з експериментальними дослідженнями нами було проведено вивчення МД, морфофункціонального стану інших клітинних органел і, опосередковано, ЕД у пацієнтів з ХП із застосуванням клітин крові.

Отримані нами результати вказують на деякі механізми, що приймають участь у формуванні та перебігу патологічного процесу при хворобі Паркінсона. Особливості ультраструктури тромбоцитів у пацієнтів з БП опосередковано дають підставу вважати, що розвиток захворювання супроводжується порушеннями з боку судинної стінки, зумовленими змінами функції серотонінергічної системи – встановлено, що в Т при ХП кількість щільних δ-гранул, які є резервуарами серотоніну, зменшена на 44%. Це може також бути свідченням відомої наявності афективних розладів при ХП, пов'язану з дисфункцією серотонінергічної системи [231].

Кількість великих α-гранул, котрі містять серед іншого білки та глікопротеїни, що приймають участь в процесах згортання крові, в Т була вищою, ніж у здорових людей у 2 рази. При цьому, мабуть, підвищується схильність до тромбоутворення, що в комплексі може сприяти формуванню патології серцево-судинної системи.

Виявлені в ході досліджень порушення в мітохондріальному апараті клітин - втрата чіткості мембран МХ (зовнішньої та/або внутрішньої, кристотворюючої), утворення септованих органел (здатних акумулювати  $Ca^{2+}$ , що може вказувати на зменшення синтезу АТФ, оскільки ці процеси вважаються альтернативними), є прямим свідченням того, що при БП, принаймні в клітинах крові, розвивається МД.

Як вже вказувалося, оксидативний стрес лежить в основі МД, клітинної загибелі при ХП та значній кількості інших патологічних станів. У його розвитку провідну роль відіграють вільні радикали, котрі можуть сприяти заги-

белі нервових клітин, що веде до розвитку хвороби Паркінсона. Метою вільних радикалів є, в першу чергу, ліпідні молекули, що входять до складу клітинних мембран, і молекули ДНК в мітохондріях. Вільні радикали «пропалюють» отвори в клітинних мембранах, через які всередину клітини проникає кальцій, викликаючи порушення кальцій-натрієвої рівноваги і в кінці кінців апоптоз. А руйнування ДНК викликає порушення головної функції клітини - виробництва енергії і білків. Вчені виявили у пацієнтів з ХП високий відсоток порушень структури ДНК в мітохондріях нейронів, що виробляють допамін [19]. Оскільки мітохондрії - це основа клітинного дихання, в результаті якого виробляються оксиданти, високий рівень мутацій мітохондріальних ДНК пояснюється цілком логічно. В даний час теорія вільних радикалів вже не ігнорується медиками, як це було всього 10 років тому, і багато хвороб потрапили в розряд «вільнорадикальних», в тому числі і хвороба Паркінсона. З огляду на це, нейтралізація вільних радикалів, перш ніж вони викличуть мутації, і ремонт отриманих ушкоджень може вважатися першочерговою задачею [126]. Концепція про роль оксидантного стресу в патохімічних механізмах нейронального пошкодження при ХП визначає один із шляхів її патогенетичної терапії антиоксидантами [203]. Однак, антиоксиданти вважаються поки лише другорядними, допоміжними речовинами при лікуванні ХП, навіть з огляду на наявність супутньої патології (як вказувалося, найчастіше серцево-судинної та бронхо-легеневої).

В нашому дослідженні корекцію виникаючих змін ультраструктури тканин в експерименті та клініці, морфофункціонального стану мітохондріального апарату тканин, та можливий вплив на генетичні маркери розвитку ХП здійснювали за допомогою препарату Капікор (К) (Олайнфарм АТ - Латвія, Олайне), що представляє собою дуплекс, який складається з мельдоній дигидрата і гамма бутиробетаїну дигідрату. Він ліцензований в Україні як антиоксидант широкого спектру дії. Слід ще раз вказати, що нас він зацікавив в зв'язку з тим, що відповідно до фармакодинаміки препарату мель-

доній дигідрат, впливаючи на індукцію біосинтезу NO, захищаючи клітини від токсичного впливу вільних радикалів, нормалізує оксидантний гомеостаз на клітинному рівні, позитивно впливає на функцію ендотелію. Гамма бутиробетаїну дигідрат гальмує транспорт довголанцюгових жирних кислот і їх метаболітів в мітохондріях, завдяки зниженню біосинтезу карнітину, що зберігає аеробний шлях метаболізму в умовах тканинної гіпоксії, запобігає виснаження запасів АТФ і креатинфосфату в клітинах.

Нами досліджувалася ультраструктура таких ділянок мозку, як довгастий мозок і стріатум, які беруть безпосередню участь у розвитку ХП на певному етапі формування патології, а також тканин легень і серця, оскільки, як зазначалося, в більшості випадків смерть в результаті хвороби Паркінсона настає у хворих на останніх етапах патологічного процесу від соматичних ускладнень. Також досліджувався вплив К на ультраструктуру тромбоцитів у пацієнтів з ХП.

В розділі 3 ми детально описали зміни, що відбуваються як в тканинах організму при ЕП та в клітинах крові у пацієнтів з ХП. Позитивний ефект препарату Капікор, проявлявся не тільки в структурах мозку але й у вісцеральних органах.

Під впливом К істотно зменшувалися прояви МД і ЕД, причому більш помітна нормалізація ультраструктури спостерігалася в тканинах зі спочатку більш вираженими ушкодженнями, а саме - в довгастому мозку і міокарді. Відзначалися: активація морфогенезу МХ з ростом їх кількості на 20-45% в залежності від досліджуваної тканини, спостерігалася суттєво виражене відновлення пулу МХ зі зменшенням кількості структурно пошкоджених органел. Активізувалися динамічні процеси в мітохондріальному апараті всіх досліджуваних тканин. Слід підкреслити, що описане в літературі порушення fission-fusion МХ в тканинах мозку при ХП та паркінсонізмі під впливом К суттєво нормалізувалося. Отже, розмикається (хоча б частково) метаболічне коло, котре пов'язане з порушенням саме вказаного процесу, і полягає у

накопичення окисленого дофаміну при порушенні динаміки МХ, що спричинює накопичення  $\alpha$ -синуклеїну та порушення функції лізосом [87, 134].

Знижувалися прояви гіпергідратації біологічних бар'єрів як аерогематичного, так і гематоенцефалічного. Товщина ж гістогематичного бар'єру в міокарді нормалізувалася за рахунок відсутності деструктивних процесів.

Застосування К супроводжувалося і досить несподіваним результатом, а саме, у всіх досліджуваних тканинах виявлялася активація синтезу фосфоліпідів (особливо в стріатумі і тканині легенів) і білка, отже, посилювалася напрацювання пластичного матеріалу для корекції деструктивних ушкоджень, які розвинулися при ЕП. Оскільки вважається, що К здатний оптимізувати споживання кисню, можна вважати - виявлені ефекти пов'язані зі зниженням проявів вторинної тканинної гіпоксії.

Таким чином, застосування препарату Капікор при ЕП позитивно впливає на ультраструктуру МХ з формуванням компенсаторно-пристосувальних змін в них, які вказують на зростання енергетичної потужності органел. Позитивний вплив є також на ультраструктуру ендотеліальної вистилки капілярів, що сприяє дифузійному поліпшенню забезпечення киснем досліджуваних тканин.

За таких умов повинно було покращитися постачання киснем МХ, що вплинуло б на енергетичний метаболізм тканин.

Наші дослідження показали, що тривале введення ротенону викликало найбільш виражені морфологічні прояви мітохондріальної дисфункції, а відтак й оксидативного стресу у головному мозку щурів. Його застосування призводило також до розвитку і у мітохондріях мозку, міокарді та легенях тварин характерних для ХП та паркінсонізму ознак (див. підрозділ 3.3). Таким чином, фармакологічні агенти із цільовим впливом на мітохондріальну дисфункцію та оксидативний стрес є першочерговими претендентами на антиоксидантну терапію при ХП. Саме до таких препаратів і відноситься К.

Результати, отримані нами, свідчать про наявність протекторної дії препарату Капікор на енергетичний обмін в тканинах мозку, серця та легень щурів. Дослідження вказують на те, що К стимулює процеси окисного фосфорилування, які зумовлені економізацією роботи дихального ланцюга мітохондрій через переважну активацію НАД-залежних субстратів і може використовуватися для спрямованої метаболічної корекції негативних порушень кисневого забезпечення органів, викликаних нейродегенеративними захворюваннями.

Отже, введення препарату капікор було доцільним задля зменшення кількісного та якісного патологічного впливу на МХ при ротеноніндукованому паркінсонізмі.

Препарат К може, як виявилось, ефективно знижувати не тільки вираженість МД, а й впливати на рівень експресії мРНК генів, в нашому випадку DJ1 і PINK1, тим самим, ймовірно, впливаючи на механізми, які сприятимуть розвитку паркінсонізму, що призведе до поліпшення якості життя пацієнтів з ХП і буде перешкоджати розвитку супутньої патології.

Слід зазначити, що під впливом препарату рівень експресії мРНК гена DJ1, в різному ступені знижений у всіх досліджуваних тканинах, істотно підвищувався значно перевершуючи вихідні рівні, особливо в тканини стриатума (в 6,4 рази) і легень (більш, ніж в 20 разів), що вказує на надекспресію DJ1 і збільшує толерантність до оксидативного стресу [268]. Що стосується експресії мРНК гена PINK1, то вона також змінювалася органоспецифічно, але ще і різноспрямовано: різко зменшуючись (майже на 2 порядки) нижче початкового рівня в тканинах мозку і ще більше зростаючи, ніж при ЕП в тканинах серця (в 8,3 рази) і легенях (в 9,4 рази). Якщо врахувати, що при застосуванні Капікора істотно зменшувалася кількість структурно пошкоджених при ЕП МХ, і при цьому відбувається зсув експресії мРНК гена DJ1 в сторону контрольних значень і навіть перевищення його, можна припустити існуючу роль даного генетичного механізму в нормалізації мітохондріально-

го апарату клітин досліджуваних тканин. Щодо експресії мРНК гена PINK1 і її змін при застосуванні Капікору, то мабуть прямого взаємозв'язку з ультраструктурою МХ не проглядається. Ясність в це питання, як і уточнення ролі органоспецифічності експресії мРНК генів-кандидатів на роль ініціаторів розвитку нейродегенеративних патологій - DJ1 і PINK1 - може внести проведення подальших досліджень. Такі дослідження тим більш актуальні, оскільки показана можливість змін рівня експресії генів за допомогою застосування антиоксиданту широкого спектра дії, що може сприяти пошуку ефективних шляхів терапії супутньої ХП патології.

Позитивна роль К показана нами не тільки відносно експериментальних умов, але й при застосуванні цього препарату в клінічних умовах відносно пацієнтів з ХП.

У пацієнтів з ХП після лікування за допомогою Капікору встановлено його безсумнівний позитивний вплив. Особливо це стосується стану мітохондріального апарату клітин крові: інтенсифікація морфогенезу, продольна асоціація МХ, утворення органел з дугоподібними кристами, що вказує на їх значну енергетичну потужність, значне збільшення інтенсивності аутофагії МХ (кількість МХ в стані аутофагії зростала у 2,5-3,7 рази в залежності від типу клітини).

Покращилися морфометричні характеристики Т: кількість дельта-гранул збільшилася на 47,6%; кількість альфа-гранул зменшилися на 33,7%. Тобто досліджувані показники суттєво наближались до притаманних здоровим особам.

Такі результати можна розглядати з точки зору певного проєктивного ефекту Капікору щодо можливості розвитку серцево-судинної патології. Якщо згадати, що в умовах експерименту застосування препарату призводило до значної активації синтезу фосфоліпідів, а саме – легеневих сурфактантів, можна також припустити й проєктивний ефект Капікору щодо розвитку легеневої патології у таких пацієнтів.

Отже, виражений позитивний ефект препарату доводить, що антиоксиданти дійсно здатні не тільки різнопланово покращувати стан тканин організму в експериментальних умовах, але й полегшувати перебіг патології при хворобі Паркінсона, принаймні щодо розвитку супутньої патології, а, можливо, й впливати на прогресування нейродегенерації завдяки зменшення проявів мітохондріальної дисфункції.

## ВИСНОВКИ

В дисертаційній роботі відповідно до поставлених цілей і завдань було проведено визначення особливостей клітинно-молекулярних перебудов в тканинах головного мозку, міокарду і легень при експериментальному паркінсонізмі, в клітинах крові при хворобі Паркінсона та з'ясування можливості застосування деяких коригуючих підходів. За допомогою відтворення ротенонової моделі експериментального паркінсонізму запропоновано механізм впливу АТФ-залежних мітохондріальних  $K^+$  каналів на формування мітохондріальної дисфункції та пошкодження мієліну при нейродегенерації. Розглянуто зміни експресії генів DJ1 та PINK1 при експериментальному паркінсонізмі в різних тканинах організму. Проведено оцінку морфофункціонального стану клітин крові у пацієнтів з хворобою Паркінсона. На основі отриманих результатів з'ясовано можливість корекції виникаючих пошкоджень за допомогою антиоксиданта широкого спектру дії Капікора.

1. При розвитку експериментального паркінсонізму порушення ультраструктури тканин, розвиток мітохондріальної та ендотеліальної дисфункції спостерігається не тільки у відділах головного мозку – більш виражено в довгастому мозку, менш в стріатумі, але й в інших тканинах організму – більш виражено в міокарді, меншою мірою в тканині легень.

2. При паркінсонізмі нейродегенерація зачіпає не тільки безпосередньо нейрони структур головного мозку, а й порушує мієлінізацію нервових волокон. Встановлено, що не тільки у формуванні мітохондріальної дисфункції, але і в процесах демієлінізації та мієлінізації нервових волокон за таких умов відіграє роль модуляція активності АТФ-залежних мітохондріальних  $K^+$  каналів.

3. У досліджуваних тканинах після введення ротенону за умов окиснення як сукцинату (ФАД-залежного субстрату), так і глутамату з малам (НАД-залежних субстратів) у мітохондріях сповільнюється АДФ-

стимульоване дихання, зменшується спряження дихання з фосфорилуванням на тлі зменшення ефективності споживання кисню. В порівнянні з іншими тканинами, легені піддавалися впливу ротенону найменше, що співпадає з результатами, отриманими при вивченні ультраструктури тканин, що вивчалися при експериментальному паркінсонізмі.

4. При експериментальному паркінсонізмі окрім пошкодження ультраструктури мітохондріального апарату в клітинах тканин організму відбуваються значні зміни експресії мРНК генів DJ1 та PINK1, котрі пов'язують з участю у формуванні мітохондріальної дисфункції. Вони носять різноспрямований характер: щодо гена DJ1 – зниження: у довгастому мозку - на 11,4%; у стріатумі – на 19,2%; в тканині серця – у 11,7 рази, а в тканині легень - на 3 порядки, тобто майже до нуля, щодо PINK1 – зростання: у довгастому мозку – 59,2%; у стріатумі – 71,8%; в тканині серця – 46,8%, а в тканині легень – більш, ніж на порядок. Ступінь таких змін експресії є органоспецифічним і більшою мірою вираженим, як не дивно, у тканинах вісцеральних органах, а не у тканинах головного мозку.

5. Особливості ультраструктури тромбоцитів у пацієнтів з хворобою Паркінсона дають підставу вважати, що розвиток захворювання супроводжується порушеннями з боку функції серотонінергічної системи (щільних  $\delta$ -гранул, які є резервуарами серотоніну, зменшена на 44%); кількість великих  $\alpha$ -гранул, котрі містять білки та глікопротеїни, що приймають участь в процесах згортання крові збільшена у 2 рази, що вказує на схильність до тромбоутворення; ультраструктурні порушення в мітохондріальному апараті клітин є прямим свідченням того, що при хворобі Паркінсона в клітинах крові розвивається МД.

6. Під впливом препарату Капікор при експериментальному паркінсонізмі суттєво зменшуються прояви мітохондріальної та ендотеліальної дисфункції, причому більш помітна нормалізація ультраструктури спостерігається в тканинах з первісно вираженішими пошкодженнями, а саме – в

довгастому мозку та міокарді; активізуються динамічні процеси в мітохондріальному апараті всіх досліджуваних тканин, відбувається активація синтезу фосфоліпідів (особливо в стріатумі і тканині легень) і білка. Капікор стимулює процеси окисного фосфорилування через переважну активацію НАД-залежних субстратів. Препарат впливає на рівень експресії мРНК генів: щодо гена DJ1 експресія у всіх досліджуваних тканинах, істотно підвищується; щодо гена PINK1 вона змінюється органоспецифічно і різноспрямовано - різко знижуючись (майже на 2 порядки) нижче початкового рівня в тканинах мозку і ще більше зростаючи, ніж при експериментальному паркінсонізмі в тканинах серця (в 8,3 рази) і легенях (в 9,4 рази).

7. Встановлено позитивний вплив Капікору у пацієнтів з хворобою Паркінсона, котрий стосується стану мітохондріального апарату клітин крові, морфометричних характеристик тромбоцитів: збільшення кількості дельта-гранул на 47,6% та зменшення кількості альфа-гранул на 33,7%. Виражений позитивний ефект препарату доводить, що він здатний покращувати стан тканин організму в експериментальних умовах і полегшувати перебіг хвороби Паркінсона, принаймні щодо розвитку супутньої патології, а, можливо, й впливати на прогресування нейродегенерації завдяки зменшенню проявів мітохондріальної дисфункції.

## СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Артамонова ОВ. Впровадження принципу трьох «R» векспериментальні гігієнічні дослідження [Інтернет]. 2011. Доступно на: <https://politcom.org.ua/vprovadzheniya-principu-trokh-r-v-eksperimentalni-gigiyenichni-doslidzhennya>
2. Артемьев ДВ. Лікування хвороби Паркінсона в молодому віці [Інтернет]. 2005. Доступно на: <http://parkinsonizm.ru/article.aspx?id=60>;
3. Ахметжанов ВК, Шашкин ЧС, Джамантаева БД. Болезнь Паркинсона. Патофизиология экстрапирамидной системы. Современные представления о причинах возникновения и патогенезе паркинсонизма. Нейрохирургия и неврол. Казахстана. 2016; 2 (43): 44 – 51.
4. Хвороба Паркінсона [Інтернет]. 2019. Доступно на: <https://7010303.ru/zabolevaniya/bolezni-parkinsona/>
5. Вашкинель ВК, Петров МН. Ультраструктура и функция тромбоцитов человека. Л.: Наука; 1982. 88 с.
6. Горобець НМ. Нові стратегічні підходи до корекції ендотеліальної дисфункції. Ліки України. 2015; 177 (2): 20-4.
7. Гречаніна ЮБ, Гречаніна ОЯ, Школьнікова ДВ. Мітохондріальні хвороби: генетична епідеміологія, діагностика та лікування [Інтернет]. 2020. [цитовано 2021 Січ 20]. Доступно на: <https://health-ua.com/article/61887-mitochondrialn-hvorobi-genetichna-epdemologiya-dagnostika-alkuvannya>
8. Дзюба В, Кучменко О. Сучасні уявлення про роль убіхінону в процесах метаболізму клітини. Вісн. Львівського ун-ту. Серія біологічна. 2017; 75: 3 – 13.
9. Дзяк ЛА. Ураження периферичної нервової системи: структурно-функціональні особливості. Нейронews. 2012; 7 (42): 3-10.
10. Долгачева ЛП, Федотова ЕИ, Абрамов АЮ, Бережнов АВ. Альфа-синуклеїн і дисфункція мітохондрій при хворобі Паркінсона. [Інтернет].

2018. Доступно на: [https://discovery.ucl.ac.uk/id/eprint/10048677/1/Долгачева%20и%20др\\_Исправлено\\_OUT2.pdf](https://discovery.ucl.ac.uk/id/eprint/10048677/1/Долгачева%20и%20др_Исправлено_OUT2.pdf)

11. Ефет ЕА. Думка про те, що хвороба Паркінсона загрожує тільки літнім людям хибна. [Інтернет]. 2020. Доступно на: <https://gpmu.org/news/news895>

12. Жарикова Ю.В. Хвороба Паркінсона: молекулярний патогенез. [Інтернет]. 2020. Доступно на: <https://umj.com.ua/uk/novyna-178449-hvoroba-parkinsona-molekulyarnij-patogenez>

13. Збірник наукових робіт по препарату Капікор. Київ: Б.в. 2016; (1): 105.

14. Карупу ВЯ. Электронная микроскопия. Київ: Вища школа; 1984. 208 с.

15. Козьолкін ОА, Ревенько АВ, Медведкльва СО. Хвороба Паркінсона : сучасні аспекти діагностики і лікування.– Запоріжжя: ЗДМУ, 2017. – 158 с.

16. Коваленко ВН, Гавриш АС, Гулая НМ. Ультраструктура тромбоцитів і дисфункція NO-системи у хворих з ревматоїдним артритом. Укр. мед. часопис. 2001; (3): 129 – 32.

17. Коляда ОК, Вайсерман ОМ, Карабань ІМ. Генетичні основи хвороби Паркінсона (огляд літератури та власних досліджень). Журн. НАМН України. 2013; 19 (1): 65 – 74.

18. Карабань ІМ. Хвороба Паркінсона: патогенетичні аспекти медикаментозної терапії та клінічного перебігу. Наук. журн. МОЗ України. 2014; (2): 60 – 70.

19. Катуніна ЕА. Антиоксидантна терапія в комплексному лікуванні хвороби Паркінсона. [Інтернет]. 2010. Доступно на: <http://www.pandia.ru/text/77/28/96957.php>

20. Килимчук В. Хвороба Паркінсона: патогенез захворювання і основні принципи лікування. Мед. газета «Здоров'я України». 2011; 4 (19).
21. Коляда ОК. Генетичні дослідження хворих на паркінсонізм в Україні. Клін. генетика і перинатальн. діагност. 2013; (1): 96 – 8.
22. Козьолкін ОА, Ревенько АВ, Медведкова СО. Хвороба Паркінсона: сучасні аспекти діагностики і лікування. Запоріжжя: ЗДМУ; 2017. 158 с.
23. Крамар ЮА. Роль мітохондріальних порушень у розвитку психічних розладів. НейроNews. 2017; (4): 30 – 1.
24. Малиновська НА, Гасимли ЭД, Баглаєва ОВ, Базарова АС, Пищиков ОВ. Експериментальні ротенонові моделі хвороби Паркінсона на щурах. [Інтернет]. 2012. Доступно на: <https://www.sworld.com.ua/konfer29/1114.pdf>
25. Малиновська НА, Моргун АВ, Панина ЮА, Комлева ЮК. Щурячі ротенонові моделі хвороби Паркінсона (огляд літератури). [Інтернет]. 2010. Доступно на: <https://www.sworld.com.ua/index.php/veterinary-medicine-and-pharmaceuticals-412/veterinary-medicine-and-zooengineers-412/15646-412-1113>
26. Манковская ІМ, Розова КВ, Гончар ОО, Носар ВІ, Братусь ЛВ, Древитська ТІ, Карасевич НВ, Глазирін ВД, Карабань ІМ. Вплив капікору на патогенетичні ланки хвороби Паркінсона. Фізіол. журн. 2018; 64 (1): 16-24. doi: <https://doi.org/10.15407/fz64.01.016>
27. Мельниченко РК. Апоптоз та інші види запрограмованої клітинної загибелі. [Інтернет]. 2020. Доступно на: <http://eprints.zu.edu.ua/20753/1/Melnichenko.pdf>
28. Мієлін та його роль в роботі нейрона. [Інтернет]. 2017. Доступно на: <http://neurodoc.ru/anatomy/mielin.html>
29. Мінцер ОП, Потяженко ММ, Невойт ГВ. Мітохондріальна дисфункція у загальному континуумі неінфекційних захворювань із позиції системної медицини. Частина І. Огляд літератури і результати теоретичного

дослідження. [Інтернет]. 2022. Доступно на: <https://umj.com.ua/uk/publikatsia-227281-mitochondrialna-disfunktsiya-u-zagalnomu-kontinuumi-neinfektsijnih-zahvoryuvan-iz-pozitsiyi-sistemnoyi-medsini-chastina-i-oglyad-literaturi-i-rezultati-teoretichnogo-doslidzhennya>

30. Мотов ММ. Ювенільний паркінсонізм [Інтернет]. 2020. Доступно на: <https://mrt-v-msk.ru/yuvenilnyu-parkinsonizm/>

31. Мяловицька ОА. Сучасні погляди на етіопатогенез, діагностику та лікування хвороби Паркінсона і вторинного синдрому паркінсонізму. Укр. неврол. журн. 2016; (1): 12 – 20.

32. Осипов ВП, Лукьянова ЕМ, Антипкин ЮГ. Методика статистической обработки медицинской информации в научных исследованиях. К.: Планета людей; 2002. 200 с.

33. Путій ЮВ. Деякі генетичні передумови формування мітохондріальної дисфункції при експериментальному паркінсонізмі. XII Всеукраїнська науково-практична конференція «Актуальні питання патології за умов дії надзвичайних факторів на організм». Тернопіль, 2020: 90 –1.

34. Путій ЮВ, Забуга ОГ, Розова КВ. Участь змін експресії генів DJ1 та PINK1 у формуванні мітохондріальної дисфункції при експериментальному паркінсонізмі. III науково-практична конференція студентів та молодих вчених з міжнародною участю «Від експериментальної та клінічної патофізіології до досягнень сучасної медицини і фармації». Харків, 2021: 141-3.

35. Путій ЮВ, Клименко ОО, Розова КВ. Деякі генетичні основи формування експериментального паркінсонізму. VIII Національний Конгрес патолофізіологів України «Патологічна фізіологія – охороні здоров'я України». Одеса, 2021: 166-8.

36. Путій ЮВ, Миронова ГД, Розова ЕВ., Исследование влияния активности митохондриального АТФ-зависимого K<sup>+</sup> канала на ультраструктуру

миелина при експериментальном паркинсизми., *Internat. Sci. J. «Grail of science»*. 2021; (4): 141 – 51. doi: 10.3074/grail-of-science.07.05.2021.026

37. Путій Ю.В., Носар В.І., Белікова М.В., Розова К.В. Зміни дихання мітохондрій у довгастому мозку щурів при експериментальному паркінсонізмі. *Фізіол. журн.* 2016; 65 (3, додаток): 204-5.

38. Путій ЮВ, Носар ВІ, Розова КВ. Функціональний стан мітохондрій у мозку, міокарді та легенях щурів при моделюванні паркінсоноподібного синдрому: корегувальна дія капикору. *IV International Scientific and Practical Conference. Vancouver, Canada, 2019: 631 – 41.*

39. Путій ЮВ, Розова КВ. Формування порушень ультраструктури в різних тканинах організму при ротенон-токсичній моделі паркінсонізму. *X Міжнародний симпозиум «Актуальні проблеми біофізичної медицини»*. Київ, 2018: 54 – 6.

40. Путій ЮВ, Сидоряк НГ, Розова ЕВ. Корректирующее влияние препарата капикор на структурные компоненты митохондриальной и эндотелиальной дисфункции при экспериментальном паркинсонизме. *Ліки - людині. «Сучасні проблеми фармакотерапії і призначення лікарських засобів»*. Харків: НФаУ, 2020: 455 – 8.

41. Путій ВВ, Фучко ОЛ, Ващенко НМ, Розова КВ. Формування ультраструктурних адаптивних реакцій у тканинах організму при експериментальному паркінсонізмі. *Фізіол. журн.*, 2023; 69 (3); 74-82. doi: <https://doi.org/10.15407/fz69.03.074>

42. Рекомендації щодо діагностики та лікування хвороби Паркінсона. *НейроNwes [Інтернет]*. 2017. Доступно на: <https://neuronews.com.ua/ua/archive/2017/9%2892%29/pages-33-58/rekomendaciyi-shchodo-diaagnostiki-ta-likuvannya-hvorobi-parkinsona#gsc.tab=0>

43. Розова КВ, Гончар ОО, Путій ЮВ, Маньковська ІМ. Вплив альфа-ліпоєвої кислоти на про- та антиоксидантний баланс і активність тромбо-

цитів у пацієнтів з цукровим діабетом 2-го типу. Експериментальна і клінічна медицина. 2016; (2): 161 – 5.

44. Розова ЕВ, Путий ЮВ, Беликова МВ. Морфофункціональні порушення в тромбоцитах у пацієнтів з цукровим діабетом другого типу і захворюванням Паркінсона: можливості корекції. Патологія Реабілітація Адаптація. 2017; 15 (2): 94 –106.

45. Савельєва-Кулик НА. Молекулярні аспекти патогенезу хвороби Паркінсона. [Інтернет]. 2018. Доступно на: <http://medlib.dp.gov.ua/jirbis2/ua/novini-medichnoji-nauki-i-praktiki/2206-molekulyarnye-aspekty-patogeneza-bolezni-parkinsona.html>

46. Сарколема. FreeJournal [Інтернет]. 2020. Доступно на: <https://ru.freejournal.org/572141/1/sarkolemma.html>

47. Семенов ІВ. Набряк, демієлінізація та викривлення інформації в нервовій системі. Питання етіології, патофізіології та культурології духовно-психосоматичних хвороб. [Інтернет]. 2018. Доступно на: [https://www.psyoffice.ru/8/psychology/book\\_o744\\_page\\_24.html](https://www.psyoffice.ru/8/psychology/book_o744_page_24.html)

48. Стасенко Т. Сучасні можливості та перспективи діагностики і лікування екстрапірамідних захворювань. Укр. мед. часопис [Інтернет]. 2017. Доступно на: <https://www.umj.com.ua/article/117451/suchasni-mozhливosti-ta-perspektivi-diagnostiki-i-likuvannya-ekstrapiramidnih-zahvoryuvan>

49. Стеценко ТІ. Демієлінізуючі захворювання. Нейронews [Інтернет]. 2009. 1 (12). Доступно на: <https://neuronews.com.ua/ru/archive/2009/1%2812%29/article-166/demieliniziruyushchie-zabolevaniya-cns#gsc.tab=0>

50. Судоми при хворобі Паркінсона: причини, особливості, можливості лікування. [Інтернет]. 2017. Доступно на: <https://www.parkinson-help.ru/o-parkinsone/parkinson-simptomy/sudorogi-pri-bolezni-parkinsona/>.

51. Ташке К. Введение в количественную цито-гистологическую морфологию. Бухарест: Изд-во Академии СРР; 1980. 192 с.
52. Федотова ЕЮ, Иванова ЕО. Хвороба Паркінсона і підходи до її лікування. [Интернет]. 2017. Доступно на: <https://www.neurology.ru/stati-dlya-praktikuyushchih-vrachej/bolezn-parkinsona-i-podhody-k-ee-lecheniyu>
53. Хайтович МВ. ГАМКВ-ергічна нейропротекція: клінічне застосування. Ліки України. 2016; (1-2): 33 – 38.
54. Хвороба Паркінсона: яка роль мітохондрій дофамінових клітин? [Интернет]. 2021. Доступно на: <http://primamed.if.ua/hvoroba-parkinsona-yaka-rol-mitohondrij-dofaminovyh-klityn/>
55. Холін ВО. Мітохондріальна дисфункція при нейродегенеративних порушеннях: від патогенезу до терапії. Міжнародний неврологічний журнал. 2020; 16 (4): 68-79. ISSN 2224-0713.
56. Чекман ІС, Беленічев ВТ, Колесник ЮМ, Горчакова НО, Бухтіярова НВ, Моргунцова СА. Фармакологія з основами патології. Запоріжжя: ЗДМУ; 2016. 515 с.
57. Чекман ІС, Сирова АО, Лукьянова ЛВ. Біотичний аспект при розробці, вивченні та впровадженні в медичну практику нанопрепаратів – «концепція трьох R» [Интернет]. 2013. Доступно на: <http://repo.knmu.edu.ua>
58. Шадрина ВК, Тальковбка МІ, Устемчук АМ, Нижегородова ДБ. Методологічний підхід до моделювання ротенон-індукованого паркінсонізму у щурів лінії wistar [Интернет]. 2018. Доступно на: <https://elib.bsu.by/bitstream/123456789/199755/1/369-371.pdf>.
59. Штадельманн К. Миелинизация - невропатология рассеянного склероза. MS News [Интернет]. 2020. Доступно на: <https://g35.club/mielinizatsiya-nevropatologiya-rasseyannogo-skleroza-kristin-shtadelmann.html>.

60. Abou-Sleiman PM, Muqit MM, McDonald NQ. A heterozygous effect for PINK1 mutations in Parkinson's disease? *Ann Neurol.* 2006; 60 (4): 414-9. doi: 10.1002/ana.20960
61. Abramov AY, Berezhnov AV, Fedotova EI, Zinchenko VP, Dolgacheva LP. Interaction of misfolded proteins and mitochondria in neurodegenerative disorders. *Biochem Soc Trans.* 2017; 45(4): 1025-33. DOI: 10.1042/BST20170024
62. Adler CH, Dugger BN, Hentz JG, Hinni ML, Lott DG, Driver-Dunckley E, et al. Peripheral Synucleinopathy in Early Parkinson's Disease: Submandibular Gland Needle Biopsy Findings. *Mov Disord.* 2016; 31(2): 250-6. DOI: 10.1002/mds.26476
63. Agostinho P, Oliveira CR. Involvement of calcineurin in the neurotoxic effects induced by amyloid-beta and prion peptides. *Eur. J. Neurosci.* 2003; 17 (6): 1189–96. DOI: 10.1046/j.1460-9568.2003.02546.x
64. Annesley SJ, Fisher PR Mitochondria in Health and Disease. *Cells.* 2019; 58 (7): 680. DOI: 10.3390/cells8070680
65. Alam M, Mayerhofer A, Schmidt WJ. The neurobehavioral changes induced by bilateral rotenone lesion in medial forebrain bundle of rats are reversed by L-DOPA. *Behav. Brain Res.* 2004; 151 (1-2): 117-24. DOI: 10.1016/j.bbr.2003.08.014
66. Alcalay RN, Caccappolo E, Mejia-Santana H. Frequency of known mutations in early-onset Parkinson disease: implication for genetic counseling: the consortium on risk for early onset Parkinson disease study. *Arch Neurol.* 2010; 67 (9): 1116-22. doi:10.1001/archneurol.2010.194
67. Aleksandrova Y, Chaprov K, Podturkina A. [et al.] Monoterpenoid Epoxidol Ameliorates the Pathological Phenotypes of the Rotenone-Induced Parkinson's Disease Model by Alleviating Mitochondrial Dysfunction. *Int J Mol Sci.* 2023; 24(6): 5842. doi: 10.3390/ijms24065842

68. Annesi G, Savettieri G, Pugliese P, D'Amelio M, Tarantino P, Ragonese P, et al. DJ-1 mutations and parkinsonism-dementia-amyotrophic lateral sclerosis complex. *Ann Neurol.* 2005; 58(5): 803–7. DOI: 10.1002/ana.20666
69. Anderson M. Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological samples. *Methods Enzymol.* 1985; 113: 548-51.
70. Arčan IŠ, Kouter K, Paska AV. Depressive disorder and antidepressants from an epigenetic point of view. *World J Psychiatry.* 2022; 12(9): 1150–68. doi: 10.5498/wjp.v12.i9.1150
71. Armogida M, Spalloni A, Amantea D. The protective role of catalase against cerebral ischemia in vitro and in vivo. *Int. J Immunopathol Pharmacol.* 2011; 24 (3): 735-47. DOI: 10.1177/039463201102400320
72. Arteaga O. Role of Antioxidants in Neonatal Hypoxic-Ischemic Brain Injury: New Therapeutic Approaches. *Intern. J. Mol. Sci.* 2017; 2 (18): 265-87. doi: 10.3390/ijms18020265
73. Bäckström D, Granåsen G, Mo SJ. [et al.] Prediction and early biomarkers of cognitive decline in Parkinson disease and atypical parkinsonism: a population-based study. *Brain Commun.* 2022; 4(2): fcac040. doi: 10.1093/braincomms/fcac040
74. Balaban RS. Modeling mitochondrial function *Am J. Physiol Cell Physiol.* 2006; 291 (6): 1107-13. DOI: 10.1152/ajpcell.00223.2006
75. Baptista MA, Dave KD, Frasier MA, Sherer TB, Greeley M, Beck MJ, et al. Loss of leucine-rich repeat kinase 2 (LRRK2) in rats leads to progressive abnormal phenotypes in peripheral organs. *PLoS One.* 2013; 14 (8): e8075. DOI: 10.1371/journal.pone.0080705
76. Bartels T, Choi JG, Selkoe DJ.  $\alpha$ -Synuclein occurs physiologically as a helically folded tetramer that resists aggregation. *Nature.* 2011; 477 (7364): 107-11. DOI: 10.1038/nature10324

77. Barzilai A, Melamed E. Molecular mechanisms of selective dopaminergic neuronal death in Parkinson's disease. *Trends Mol Med.* 2003; 9 (3): 126–32. DOI: 10.1016/s1471-4914(03)00020-0
78. Beal MF. Mitochondria and the pathogenesis of ALS. *Brain.* 2000; 123 (7): 1291–92. Beal MF. Mitochondria and the pathogenesis of ALS. *Brain.* 2000; 123 (7): 1291–92. DOI: 10.1016/s1471-4914(03)00020-0
79. Beal MF, Ann NY. Mitochondria, oxidative damage, and inflammation in Parkinson's disease. *Acad Sci.* 2003; (991): 120-31.
80. Belikova M, Rozova K, Putii Y. Possible ways of reducing the manifestation of mitochondrial dysfunction in patients with type 2 diabetes and parkinson's disease. *American Journal for Fundamental, Applied and Experimental Researches.* 2016; (1): 21– 9.
81. Bernardi P. The mitochondrial permeability transition from in vitro artifact to disease target. *FEBS J.* 2006; 273 (10): 2077–99. DOI: 10.1111/j.1742-4658.2006.05213.x
82. Betarbet R. Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson's disease. *Nat. Neurosci.* 2000; 3(12): 1301–6. DOI: 10.1038/81834
83. Bhandary B, Marahatta A, Kim HR, Chae HJ. An Involvement of Oxidative Stress in Endoplasmic Reticulum Stress and Its Associated Diseases. *Int. J. Mol. Sci.* 2013; 14 (1): 434-56. doi: 10.3390/ijms14010434
84. Blauwendraat C, Nalls MA, Singleton AB. The genetic architecture of Parkinson's disease. *Lancet Neurol.* 2020; 19(2): 170-8. doi: 10.1016/S1474-4422(19)30287-X
85. Blesa J, Przedborski S. Parkinson's disease: animal models and dopaminergic cell vulnerability. *Frontiers in Neuroanatomy* 2014; (8): 155. DOI: 10.3389/fnana.2014.00155
86. Boyman L, Karbowski M, Lederer WJ Regulation of Mitochondrial ATP Production: Ca<sup>2+</sup> Signaling and Quality Control. *Trends Mol Med.* 2020; 26(1): 21-39. DOI: 10.1016/j.molmed.2019.10.007

87. Burbulla LF, Song F, Mazzulli JR, Zampese E, Wong YC, Jeon S, et al. Dopamine oxidation mediates mitochondrial and lysosomal dysfunction in Parkinson's disease. *Science*. 2017; 57 (6357): 1255-1261. DOI: 10.1126/science.aam9080
88. Bonifati V, Rizzu P, van Baren MJ. Mutations in the DJ-1 gene associated with autosomal recessive early-onset parkinsonism. *Science*. 2003; 299 (5604): 256-9. DOI: 10.1126/science.1077209
89. Bonifati V, Rohé CF, Breedveld GJ. Italian Parkinson Genetics Network. Early-onset parkinsonism associated with PINK1 mutations: frequency, genotypes, and phenotypes. *Neurology*. 2005; 65 (1): 87-95. DOI: 10.1212/01.wnl.0000167546.39375.82
90. Bras J, Singleton A, Cookson MR, Hardy J. Emerging pathways in genetic Parkinson's disease: Potential role of ceramide metabolism in Lewy body disease. *FEBS J*. 2008; 275 (23): 5767-73. doi: 10.1111/j.1742-4658.2008.06709.x
91. Brouillet E, Jacquard C, Bizat N, Blum D. 3-Nitropropionic acid: a mitochondrial toxin to uncover physio-pathological mechanisms underlying striatal degeneration in Huntington's disease. *J. Neurochem*. 2005; 95 (6): 1521-40. DOI: 10.1111/j.1471-4159.2005.03515.x
92. Brown AM, Gordon D, Lee H, Caudy M, Hardy J, Haroutunian V. Association of the dihydrolipoamide dehydrogenase gene with Alzheimer's disease in an Ashkenazi Jewish population. *Genet B Neuropsychiatr Genet*. 2004; 131B (1): 60-6. DOI: 10.1002/ajmg.b.30008
93. Caboni P. Rotenone, deguelin, their metabolites, and the rat model of Parkinson's disease. *Chem. Res. Toxicol*. 2004; 17 (11): 1540-8. DOI: 10.1021/tx049867r
94. Caboni P, Sherer TB, Zhang N. Rotenone, Deguelin, Their Metabolites, and the Rat Model of Parkinson's Disease. *Chem. Res. Toxicol*. 2004; 17 (11): 1540 -8. DOI: 10.1016/j.bbr.2014.11.002

95. Caccappolo E, Alcalay RN, Mejia-Santana H. Neuropsychological profile of Parkin mutation carriers with and without Parkinson disease: the CORE-PD Study. *J Int Neuropsychol Soc.* 2011; 17 (1): 91-100. DOI: 10.1017/S1355617710001190
96. Calabrese V, Scapagnini G, Giuffrida Stella AM, Bates TE, Clark JB. Mitochondrial involvement in brain function and dysfunction: relevance to aging, neurodegenerative disorders and longevity. *Neurochem. Res.* 2001; 26 (6): 739–64. DOI: 10.1023/a:1010955807739
97. Campello S, Scorrano L. Mitochondrial shape changes: orchestrating cell pathophysiology. *EMBO Rep.* 2010; 11 (9): 678-84. DOI: 10.1038/embor.2010.115
98. Canet-Aviles RM, Wilson MA, Miller D.W. The Parkinson's disease protein DJ-1 is neuroprotective due to cysteine-sulfinic acid-driven mitochondrial localization. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004; 101 (24): 9103-8. DOI: 10.1073/pnas.0402959101
99. Cannon JR, Tapias V, Na HM, Honick AS, Drolet RE, Greenamyre JT. A highly reproducible rotenone model of Parkinson's disease. *Neurobiol Dis.* 2009; 34(2): 279-90. DOI: 10.1016/j.nbd.2009.01.016
100. Cardoso SM, Oliveira CR. The role of calcineurin in amyloid-beta-peptides-mediated cell death. *Brain Res.* 2005; 1050 (1-2): 1–7. DOI: 10.1016/j.brainres.2005.04.078
101. Chance B, Williams G. The respiratory chain and oxidative phosphorylation. *Adv Enzymol.* 1956; (17): 65-134. DOI: 10.1002/9780470122624.ch2
102. Chaturvedi RK, Beal M. Mitochondrial approaches for neuroprotection. *Ann NY Acad Sci.* 2008; 1147 (12): 395–412. DOI: 10.1196/annals.1427.027
103. Chee FC, Mudher A, Cuttle MF, Newman TA, Mac-Kay D, Lovestone S, Shepherd D. Over-expression of tau results in defective synaptic

transmission in *Drosophila* neuromuscular junctions. *Neurobiol. Dis.* 2005; 20 (3): 918–28. DOI: 10.1016/j.nbd.2005.05.029

104. Chen X, Yan SD. Mitochondrial Abeta: a potential cause of metabolic dysfunction in Alzheimer's disease. *IUBMB Life.* 2006; 58 (12): 686–94. DOI: 10.1080/15216540601047767

105. Chia SJ, Tan EK, Chao YX. Historical Perspective: Models of Parkinson's Disease. *Int J Mol Sci.* 2020; 21 (7): 2464. DOI: 10.3390/ijms21072464

106. Choi DH, Cristovao AC, Guhathakurta S. NADPH oxidase 1-mediated oxidative stress leads to dopamine neuron death in Parkinson's disease. *Antioxid. Redox. Signal.* 2012; 16(10): 1033-45. doi: 10.1089/ars.2011.3960

107. Chung SJ. Genomic determinants of motor and cognitive outcomes in Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat. Disord.* 2012; 10 (2): 257-60. DOI: 10.1016/j.parkreldis.2012.04.025

108. ClarkeJulie CE, Clarke SJA. Pramipexole for levodopa-induced complications in Parkinson's disease. [Internet]. 2000. Available from: <https://www.cochranelibrary.com/cdsr/doi/10.1002/14651858.CD002261/full>

109. Clauser S, Cramer-Borde E. Role of platelet electron microscopy in the diagnosis of platelet disorders. *Semin Thromb Hemost.* 2009; 35 (2): 213-23. DOI: 10.1055/s-0029-1220329

110. Clinical and Research Information on Drug-Induced Liver Injury [Internet]. Bethesda (MD): National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases; 2012–2017.

111. Cogliati S, Frezza C, Soriano ME, Varanita T, Quintana-Cabrera R, Corrado M, et al. Mitochondrial cristae shape determines respiratory chain super-complexes assembly and respiratory efficiency. *Cell.* 2013; 155 (1): 160-71. DOI: 10.1016/j.cell.2013.08.032

112. Connor K, Cheng E, Siebens HC [et al.]. Study protocol of “CHAPS”: a randomized controlled trial protocol of Care Coordination for HealthPromotion and Activities in Parkinson’s Disease to improve the quality of care for individuals withParkinson’s disease. *BMC Neurol.* 2015; 15: 258. doi: 10.1186/s12883-015-0506-y
113. Compta Y, Revesz T. Neuropathological and Biomarker Findings in Parkinson’s Disease and Alzheimer’s Disease: From Protein Aggregates to Synaptic Dysfunction. *J Parkinsons Dis.* 2021; 11(1): 107–21. doi: 10.3233/JPD-202323
114. Connolly B. S., Lang A. E. Pharmacological treatment of Parkinson’s disease: a review. *JAMA.* 2014; 311 (16): 1670–1683. DOI: 10.1001/jama.2014.3654
115. de Lau LM, Breteler MM. Epidemiology of Parkinson’s disease. *Lancet Neurol.* 2006; 5 (6): 525–35. doi: 10.1016/S0733-8619(05)70259-0
116. De Leeuw FE, de Groot JC, Oudkerk M. Hypertension and cerebral white matter lesions in a prospective cohort study. *Brain [Internet].* 2002 [cited 2021 Feb 19]; 12: 762. Available from: <http://dx.doi.org/10.1093/brain/awf07721>.
117. Deng H, Le WD, Hunter CB. Heterogeneous phenotype in a family with compound heterozygous parkin gene mutations. *Arch Neurol.* 2006; 63 (2) 273-7. DOI: 10.1001/archneur.63.2.273
118. Dave KD, De Silva S, Sheth NP, Ramboz S, Beck NJ, Quang C, et al. Phenotypic characterization of recessive gene knockout rat models of Parkinson's disease. *Neurobiology of Disease.* 2014; 17 (1): 190–203. DOI: 10.1016/j.nbd.2014.06.009
119. Dean DC, III, Sojkova J, Hurley S [et al.] Alterations of Myelin Content in Parkinson’s Disease: A Cross-Sectional Neuroimaging Study. *PLoS One.* 2016; 11(10): e0163774. doi: 10.1371/journal.pone.0163774
120. Devi L, Raghavendran V, Prabhu BM, Avadhani NG, Anandatheerthavarada HK. Mitochondrial import and accumulation of alpha-

synuclein impair complex I in human dopaminergic neuronal cultures and Parkinson disease brain. *J. Biol. Chem.* 2008; 283 (14): 9089-100. doi: 10.1074/jbc.M710012200

121. Doherty KM, Silveira-Moriyama L, Parkkinen L. Parkin disease: a clinicopathologic entity? *JAMA Neurol.* 2013; 70 (5): 571- 9. DOI: 10.1001/jamaneurol.2013.172

122. Douglas CD, Sojkova J, Hurley S, Kecskemeti S, Okonkwo O, Bendlin BB, et al. Alterations of Myelin Content in Parkinson's Disease: A Cross-Sectional Neuroimaging Study Affiliations expand. *PLoS One.* 2016; 5; 1(10): e0163774. doi: 10.1371/journal.pone.0163774

123. Enriquez J, Lenaz G. Coenzyme Q and the respiratory chain coenzyme Q pool and mitochondria supercomplexes. *Mol. Syndromol.* 2014; 5 (3-4): 119–40. DOI: 10.1159/000363364

124. Estabrook RW. Mitochondrial respiratory control and the polarographic measurement of ADP/O ratios. *Methods Enzymol.* 1967; 10 (1): 41-7.

125. Ferraris A, Ialongo T, Passali GC. Olfactory dysfunction in parkinsonism caused by PINK1 mutations. *Mov Disord.* 2009; 24 (16): 2350-7. DOI: 10.1002/mds.22816

126. Filograna R, Beltramini M, Bubacco L, Bisaglia M. Anti-Oxidants in Parkinson's Disease Therapy: A Critical Point of View. *Curr Neuropharmacol.* 2016; 14(3): 260–71. doi: 10.2174/1570159X13666151030102718

127. Fu Y, Paxinos G, Watson C, Halliday GM. The substantia nigra and ventral tegmental dopaminergic neurons from development to degeneration. *J Chem Neuroanat.* 2016; 76 (Pt B): 98–107. DOI: 10.1016/j.jchemneu.2016.02.001

128. Fuji RN, Flagella M, Baca M, Baptista MA, Brodbeck J, Chan BK, et al. Effect of selective LRRK2 kinase inhibition on nonhuman primate lung. *Sci Transl Med.* 2015; 4 (7): 273ra15. DOI: 10.1126/scitranslmed.aaa3634

129. Fujimi S, MacConmara MP, Maung AA, Zang Y, Mannick JA, Lederer JA, Lapchak PH. Platelet depletion in mice increases mortality after

thermal injury. *Blood*. 2006; 107(11): 4399-406. DOI: 10.1182/blood-2005-09-3776

130. 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-q13.1. *Ann Neurol*. 2002; 51 (3): 296-301. DOI: 10.1002/ana.10113

131. Funayama M, Hasegawa K, Ohta E. An LRRK2 mutation as a cause for the parkinsonism in the original PARK8 family. *Ann Neurol*. 2005; 57 (6): 918-21. DOI: 10.1002/ana.20484

132. Gamache J, Yun Y, Chiba-Falek O. Sex-dependent effect of *APOE* on Alzheimer's disease and other age-related neurodegenerative disorders. *Dis Model Mech*. 2020; 13(8): dmm045211. doi: 10.1242/dmm.045211

133. Gan DA., Johnson JAJ. Keap1-Nrf2 activation in the presence and absence of DJ-1. *Li European Journal of Neuroscience*. 2010; 31(6): 967-977. DOI: 10.1111/j.1460-9568.2010.07138.x

134. Gao J, Wang L, Liu J, Xie F, Su B, Wang X. Abnormalities of Mitochondrial Dynamics in Neurodegenerative Diseases. *Antioxidants (Basel)*. 2017; 6 (2): 25. DOI: 10.3390/antiox6020025

135. Gelpi E, Navarro-Otano J, Tolosa E, Gaig C, Compta Y, María Jesús Rey MJ. Multiple organ involvement by alpha-synuclein pathology in Lewy body disorders. *Mov Disord*. 2014; 29 (8): 1010-8. DOI: 10.1002/mds.25776

136. Ghebremedhin E, Del Tredici K, Langston JW, Braak H. Diminished tyrosine hydroxylase immunoreactivity in the cardiac conduction system and myocardium in Parkinson's disease: an anatomical study. *Acta Neuropathol*. 2009; 118 (6): 777-84. DOI: 10.1007/s00401-009-0596-y

137. Goldstein DS, Sharabi Y. The heart of PD: Lewy body diseases as neurocardiologic disorders. *Brain Res*. 2019; 1 (1702): 74-84. DOI: 10.1016/j.brainres.2017.09.033

138. Gopurappilly R. Pluripotent Stem Cell Derived Neurons as *In Vitro* Models for Studying Autosomal Recessive

Parkinson's Disease (ARPD): *PLA2G6* and Other Gene Loci. *Adv Exp Med Biol.* 2021; 1347 (1): 115–33. doi: 10.1007/5584\_2021\_643

139. Harrison P. Platelet function analysis. *Blood Rev.* 2005, 19 (2): 111–23. doi: 10.1016/j.blre.2004.05.002.

140. Hartmann A, Agid Y, Schapira H. Pathophysiology of Parkinson's disease. *Parkinsonian Disorders in Clinical Practice.* Wiley-Blackwell: Blackwell Publishing Ltd; 2009. p. 1-10.

141. Hauser DN, Primiani CT, Cookson MR. The effects of variants in the *PARK2* (parkin), *PINK1*, and *PARK7* (DJ-1) genes along with evidence for their pathogenicity. *Curr Protein Pept Sci.* 2017; 18 (7): 702–714. DOI: 10.2174/1389203717666160311121954

142. Hedrich K, Eskelson C, Wilmot B. Distribution, type, and origin of Parkin mutations: review and case studies. *Mov Disord.* 2004; 19 (10): 1146-57. DOI: 10.1002/mds.20234

143. Henchcliffe C, Beal MF. Mitochondrial biology and oxidative stress in Parkinson's disease pathogenesis. *Nature Clin. Pract. Neurology.* 2008; 4 (11): 600-9. DOI: 10.1038/ncpneuro0924

144. Höftberger R, Lassmann H. Inflammatory demyelinating diseases of the central nervous system. *Handb Clin Neurol.* 2017; 145 (2): 263-83. DOI: 10.1016/B978-0-12-802395-2.00019-5

145. Hou X, Watzlawik JO, Fiesel FC, Springer W. Autophagy in Parkinson's Disease. *J Mol Biol.* 2020; 432 (8): 2651-72. DOI: 10.1016/j.jmb.2020.01.037

146. Hicks AA. A susceptibility gene for late-onset idiopathic Parkinson's disease. *Ann. Neurol.* 2012; 52 (4): 549- 555. DOI: 10.1002/ana.10324

147. Huynen MA, de Hollander M, Szklarczyk R. Mitochondrial proteome evolution and genetic disease. *Biochim. Biophys. Acta.* 2009; 1792 (12): 1122–9. DOI: 10.1016/j.bbadis.2009.03.005

148. Ibáñez P, Lesage S, Lohmann E. French Parkinson's Disease Genetics Study Group. Mutational analysis of the PINK1 gene in early-onset parkinsonism in Europe and North Africa. *Brain* 2006; 129 (Pt 3): 686-94. DOI: 10.1093/brain/awl005
149. Inden M, Kitamura Y, Takahashi K, Takata K, Ito N, Niwa R, et al. Protection against dopaminergic neurodegeneration in Parkinson's disease-model animals by a modulator of the oxidized form of DJ-1, a wild-type of familial Parkinson's disease-linked PARK7. *J Pharmacol Sci.* 2011; 117(3): 189–203. DOI: 10.1254/jphs.11151fp
150. Ishikawa A, Tsuji S. Clinical analysis of 17 patients in 12 Japanese families with autosomal-recessive type juvenile parkinsonism. *Neurology* 1996; 47 (1) 160-6. DOI: 10.1212/wnl.47.1.160
151. Jenner P. The contribution of the MPTP-treated primate model of the development of new treatment strategies for Parkinson disease. *Parkinsonism and related disorders.* 2003; 9: 131–7. DOI: 10.1016/s1353-8020(02)00115-3
152. Jenner P. Oxidative stress in Parkinson's disease. *Ann Neurol.* 2003; 53 (suppl 3): 26–36. DOI: 10.1002/ana.10483
153. Johnson ME, Bobrovskaya L. An update on the rotenone models of Parkinson's disease: their ability to reproduce the features of clinical disease and model gene-environment interactions. *Neurotoxicology.* 2015; 46 (1): 101-16. DOI: 10.1016/j.neuro.2014.12.002
154. Karbowski M, Youle RJ. Dynamics of mitochondrial morphology in healthy cells and during apoptosis. *Cell Death Differentiation.* 2003; 10 (8): 870-80. DOI: 10.1038/sj.cdd.4401260
155. Kasten M, Weichert C, Lohmann K, Klein C. Clinical and demographic characteristics of PINK1 mutation carriers--a meta-analysis. *Mov Disord* 2010; 25 (7): 952-4. DOI: 10.1002/mds.23031

156. Kay DM, Moran D, Moses L. Heterozygous parkin point mutations are as common in control subjects as in Parkinson's patients. *Ann Neurol*. 2007; 61 (1) 47-54. DOI: 10.1002/ana.21039
157. Kay DM, Stevens CF, Hamza TH. A comprehensive analysis of deletions, multiplications, and copy number variations in PARK2. *Neurology*. 2010; 75 (13): 1189-94. DOI: 10.1212/WNL.0b013e3181f4d832
158. Kilarski LL, Pearson JP, Newsway V. Systematic review and UK-based study of PARK2 (parkin), PINK1, PARK7 (DJ-1) and LRRK2 in early-onset Parkinson's disease. *Mov Disord* 2012; 27 (12): 1522-9. DOI: 10.1002/mds.25132
159. Kim JM, Lee JY, Kim HJ. The LRRK2 G2385R variant is a risk factor for sporadic Parkinson's disease in the Korean population. *Parkinsonism Relat Disord* 2010; 16 (2): 85-8. DOI: 10.1016/j.parkreldis.2009.10.004
160. Klein C, Schumacher K, Jacobs H. Association studies of Parkinson's disease and parkin polymorphisms. *Ann Neurol* 2000; 48 (1): 126-7. doi: 10.1002/1531-8249(199905)45:5<655::aid-ana15>3.0.co;2-g.
161. Konnova EA, Swanberg MI, Stoker TB, Greenland JC. editors. Animal models of Parkinson's disease. *Parkinson's Disease: Pathogenesis and Clinical Aspects*. Brisbane (AU): Codon Publications. 2018. p. 5. DOI: 10.15586/codonpublications.parkinsonsdisease.2018.ch5
162. Langston JW, Ballard P, Tetrud JW, Irvin I. Chronic Parkinsonism in humans due to a product of meperidine analog synthesis. *Science*. 1983; 219 (4587): 979–80. DOI: 10.1126/science.6823561
163. Lansbury Jr PT, Brice A. Genetics of Parkinson's disease and biochemical studies of implicated gene products. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 2002; 12(3): 299-306. DOI: 10.1016/s0959-437x(02)00302-7
164. Leiter O, Walker TL. Platelets in Neurodegenerative Conditions—Friend or Foe? *Front Immunol*. 2020; 11: 747. doi: 10.3389/fimmu.2020.00747
165. Leontieva OV, Blagosklonny MV. DNA damaging agents and p53 do not cause senescence in quiescent cells, while consecutive re-activation of mTOR

is associated with conversion to senescence. *Aging (Albany NY)*. 2010; 2(7): 924-35. DOI: 10.18632/aging.100265

166. Lesage S, Brice A. Parkinson's disease: from monogenic forms to genetic susceptibility factors. *Hum Mol Genet* 2009; 18 (R1): R48-R59. DOI: 10.1093/hmg/ddp012

167. Levin OS, Dokadina LV. J. Epidemiologija parkinsonizma i bolesti Parkinsona. *Nevrologičeskij zhurnal*. 2005; 5 (1): 41–90.

168. Liddel SA, Guttenplan KA, Clarke LE, Bennett FC, Bohlen CJ, Schirmer L, et al. Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia. *Nature*. 2017; 541 (7638): 481-7. doi: 10.1038/nature21029

169. Loogvali EL, Roostalu U, Malyarchuk BA, Derenko MV, Kivisild T, Metspalu E, et al. Disuniting uniformity: a pied cladistic canvas of mtDNA haplogroup H in Eurasia. *Mol. Biol. Evol.* 2004; 21(11): P.2012-21. DOI: 10.1093/molbev/msh209

170. Loeffler DA, Camp DM, Conant SB. Complement activation in the Parkinson's disease substantia nigra: an immunocytochemical study. *J. Neuroinflammation*. 2006; (3): 1-8. DOI: 10.1186/1742-2094-3-29

171. Lovas JR, Wang X. The meaning of mitochondrial movement to a neuron's life. *Biochim Biophys Acta. Disease. Free Radic. Res.* 2015; 49(5): 681-91. doi: 10.1016/j.bbamcr.2012.04.007

172. Ludtmann MR, Abramov AY. Mitochondrial calcium imbalance in Parkinson's disease. *Neurosci Lett.* 2018; 663 (1): 86–90. DOI: 10.1016/j.neulet.2017.08.044

173. Malešević N, Bokan G, Đajić V. Flutamide Induced Liver Injury in Female Patients. [Internet]. *Eur J Med Health Sci*. 2020; 2 (4): Available from: <https://www.ejmed.org/index.php/ejmed/article/view/476>

174. Mankovska I, Rozova K, Karaban I, Gonchar O, Bratus L. Pharmacological targeting of mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease: approaches and perspectives. *Drug Target Rev.* 2018; (3): 49-53.

175. Marder KS, Tang MX, Mejia-Santana H. Predictors of parkin mutations in early-onset Parkinson disease: the consortium on risk for early-onset Parkinson disease study. *Arch Neurol.* 2010; 67 (6): 731-8. doi: 10.1001/archneurol.2010.95.
176. Marella M, Boo Seo B, Nakamaru-Ogiso E. Protection by the NDI1 Gene against Neurodegeneration in a Rotenone Rat Model of Parkinson's Disease. *PLoS ONE.* 2008; (1): 1-8. DOI: 10.1371/journal.pone.0001433
177. Marotta N, Kim S, Krainc D. Organoid and Pluripotent Stem Cells in Parkinson's Disease Modeling: An Expert View on their Value to Drug Discovery. *Expert Opin Drug Discov.* 2020; 15(4): 427–441. doi: 10.1080/17460441.2020.1703671
178. Mattson MP. Mitochondrial regulation of neuronal plasticity. *Neurochem. Res.* 2007; 32(4–5): 707–15. DOI: 10.1007/s11064-006-9170-3
179. Mazzarini M, Falchi M, Bani D, Migliaccio AR. Evolution find new frontiers of histology in bio-medical research. *Microsc Res Tech.* 2021; 84(2): 217–237. doi: 10.1002/jemt.23579
180. Mehra S, Sahay S, Maji SK.  $\alpha$ -Synuclein misfolding and aggregation: Implications in Parkinson's disease pathogenesis. *Biochim. Biophys. Acta (BBA) - Proteins and Proteomics.* 2019; 1867 (10): 890-908. DOI: 10.1016/j.bbapap.2019.03.001
181. Michael RR, Böhm, Harutyun Melkonyan<sup>1</sup> and Solon Thanos. Lifetime expression of the proteins peroxiredoxin, beta-synuclein, PARK7/DJ-1, and stathmin in the primary visual and primary somatosensory cortices in rats. *Front. Neuroanatomy.* 2015; 9 (1): 190-203. DOI: 10.3389/fnana.2015.00016
182. Mielcarek M, Inuabasi L, Bondulich MK, Muller T, Osborne GF, Franklin SA, et al. Dysfunction of the CNS-heart axis in mouse models of Huntington's disease. *PLoS Genet.* 2014; 10 (8): e1004550. DOI: 10.1371/journal.pgen.1004550

183. Miklavc P, Ehinger K, Thompson KE, Hobi N, Shimshek DR, Frick M. Surfactant secretion in LRRK2 knock-out rats: changes in lamellar body morphology and rate of exocytosis. *PLoS One*. 2014; 9 (1): e84926. DOI: 10.1371/journal.pone.0084926
184. Miller DB, O'Callaghan JP. Biomarkers of Parkinson's disease: present and future. *Metabolism*. 2015; 64(1): 40-6. DOI: 10.1016/j.metabol.2014.10.030
185. Miklavc P, Ehinger K, Thompson KE, Hobi N, Shimshek DR, Frick M. Surfactant secretion in LRRK2 knock-out rats: changes in lamellar body morphology and rate of exocytosis. *PLoS One*. 2014; 9 (1): e84926. DOI: 10.1371/journal.pone.0084926
186. Mirelman A, Bernad-Elazari H, Thaler A. Arm swing as a potential new prodromal marker of Parkinson's disease. *Mov Disord* 2016; 31 (10): 1527-34. DOI: 10.1002/mds.26720
187. Mironova GD, Khrenov MO, Talanov EYu, Glushkova OV, Parfenyuk SB, Novoselova TV. The role of mitochondrial KATP channel in anti-inflammatory effects of uridine in endotoxemic mice. *Arch. Biochem. Biophys*. 2018; 654 (9): 70-6. DOI: 10.1016/j.abb.2018.07.006
188. Mironova GD, Negoda AE, Marinov BS, Paucek P, Costa ADT, Grigoriev SM, et al. Functional distinctions between the mitochondrial ATP-dependent K<sup>+</sup> channel (mitoKATP) and its inward rectifier subunit (mitoKIR). *J. Biol. Chem*. 2004; 279 (31): 562-8. DOI: 10.1074/jbc.M401115200
189. Mironova GD, Rozova EV, Belosludtseva NV, Man'kovskaya IN. Dynamic Restructuring of the Myocardial Mitochondria in Response to Uridine Modulation of the Activity of Mitochondrial ATP-Dependent Potassium Channel under Conditions of Acute Hypoxic Hypoxia. *Bull. Exp. Biol. Med*. 2019; 166 (6): 806-10. DOI: 10.1007/s10517-019-04445-9

190. Morgan J, Currie L, Harrison M, Bennett J, Trugman J, Wooten G. Mortality in Levodopa-Treated Parkinson's Disease. *Parkinson's Disease* [Internet]. 2014. 1-8. Available from: <https://doi.org/http://dx.doi.org/2014/426976>

191. Moritz KU, Meissner K, Roskopf D, Eckel L, Bohm M, Jedlitschky G, Kroemer HK Uptake of cardiovascular drugs into the human heart: Expression, regulation, and function of the carnitine transporter OCTN2 (SLC22A5). *Circulation*. 2006; 113 (6): 1114–22. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.105.586107

192. Morselli E, Maiuri MC, Markaki M, Megalou E, Pasparak A, Palikaras K, et al. Caloric restriction and resveratrol promote longevity through the Sirtuin-1-dependent induction of autophagy. *Cell Death Dis*. 2010; 1 (1): 10. DOI: 10.1038/cddis.2009.8

193. Mosentsov AA, Rozova EV, Belosludtseva NV, Mankovskaya IN, Putiy YuV, Karaban IN, Mikheeva IB, Mironova GD. Does the Operation of Mitochondrial ATP-Dependent Potassium Channels Affect the Structural Component of Mitochondrial and Endothelial Dysfunctions in Experimental Parkinsonism? *Bul. Experim. Biol. Med*. 2021; 170 (4): 431 – 5. doi: 10.1007/s10517-021-05081-y.

194. Normando EN, Davis BM, Lies De Groef L. [et al.] The retina as an early biomarker of neurodegeneration in a rotenone-induced model of Parkinson's disease: evidence for a neuroprotective effect of rosiglitazone in the eye and brain. *Acta Neuropathol Commun*. 2016; 4: 86. doi: 10.1186/s40478-016-0346-z

195. Obad A, Peeran A, Janay I, Little JL. [et al.] Alcohol-Mediated Organ Damages: Heart and Brain. *Front Pharmacol*. 2018; 9: 81. doi: 10.3389/fphar.2018.00081

196. Obeso JA, Stamelou M, C.G. GoetzCG. [et al.]. Past, Present, and Future of Parkinson's Disease: A Special Essay on the 200th Anniversary of the Shaking Palsy. *Mov Disord*. 2017; 32(9): 1264–310. doi: 10.1002/mds.27115

197. Orimo S, Uchihara T, Nakamura A, Mori F, Kakita A, Wakabayashi K, Takahashi H. Axonal alpha-synuclein aggregates herald centripetal

degeneration of cardiac sympathetic nerve in Parkinson's disease. *Brain*. 2008; 131 (Pt 3): 642-50. DOI: [10.1093/brain/awm302](https://doi.org/10.1093/brain/awm302)

198. Orimo S, Uchihara T, Kanazawa T, Itoh Y, Wakabayashi K, Kakita A, Takahashi H. Unmyelinated axons are more vulnerable to degeneration than myelinated axons of the cardiac nerve in Parkinson's disease. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 2011; 37 (7): 791-802. DOI: [10.1111/j.1365-2990.2011.01194.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2990.2011.01194.x)

199. Paddock C. Scientists confirm the role of ‘molecular switch’ in Parkinson’s disease. *Medical News Today*. 2018; (9).

200. Pankratz N, Kissell DK, Pauciulo MW. Parkinson Study Group-PROGENI Investigators. Parkin dosage mutations have greater pathogenicity in familial PD than simple sequence mutations. *Neurology*. 2009; 73 (4): 279-86. DOI: [10.1212/WNL.0b013e3181af7a33](https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e3181af7a33)

201. Panov A, Dikalov S, Shalbuyeva N. Rotenone Model of Parkinson Disease. Multiple brain mitochondria dysfunctions after short term systemic rotenone intoxication. *J. Biol. Chem.* 2005; 280 (51): 42026-42035. DOI: [10.1074/jbc.M508628200](https://doi.org/10.1074/jbc.M508628200)

202. Pantiya P, Thonusin C, Chattipakorn N, Chattipakorn SC. Mitochondrial abnormalities in neurodegenerative models and possible interventions: Focus on Alzheimer's disease, Parkinson's disease, Huntington's disease. *Mitochondrion*. 2020; 55: 14-47. DOI: [10.1016/j.mito.2020.08.003](https://doi.org/10.1016/j.mito.2020.08.003)

203. Park H-A, Amy C. Ellis Dietary Antioxidants and Parkinson’s Disease. *Antioxidants*. 2020; 9(7): 570. <https://doi.org/10.3390/antiox9070570>

204. Patten DA, Wong J, Khacho M, Soubannier V, Mailloux R, Pilon-Larose K, et al. OPA1-dependent cristae modulation is essential for cellular adaptation to metabolic demand. *EMBO J*. 2014 18; 33(22): 2676-91. DOI: [10.15252/emj.201488349](https://doi.org/10.15252/emj.201488349)

205. Petrosillo G, Matera M, Casanova G. Mitochondrial dysfunction in rat brain with aging Involvement of complex I, reactive oxygen species and cardiolipin. *Neurochem. Int*. 2008; 53 (1): 126-31. DOI: [10.1016/j.neuint.2008.07.001](https://doi.org/10.1016/j.neuint.2008.07.001)

206. Piston D, Alvarez-Erviti L, Bansal V, Gargano D, Yao Z, Szabadkai G, et al. DJ-1 is a redox sensitive adapter protein for high molecular weight complexes involved in regulation of catecholamine homeostasis. *Hum Mol Genet.* 2017; 26 (20): 4028–41. DOI: 10.1093/hmg/ddx294
207. Pramstaller PP, Schlossmacher MG, Jacques TS. Lewy body Parkinson's disease in a large pedigree with 77 Parkin mutation carriers. *Ann Neurol.* 2005; 58 (3): 411-22. DOI: 10.1002/ana.20587
208. Putilina FE. Biochemical assay of glutathione enzymes. *Methods Biochem.* 1982; 205 (1): 174-6. doi: 10.1155/2012/736837
209. Ray S, Liu M. Current understanding of LRRK2 in Parkinson's disease: biochemical and structural features and inhibitor design. *Future Med Chem.* 2012; 4 (13): 1701-13. doi: 10.4155/fmc.12.110
210. Ren J, Porter JE, Wold LE, Aberle NS, Muralikrishnan D, Haselton JR. Depressed contractile function and adrenergic responsiveness of cardiac myocytes in an experimental model of Parkinson disease, the MPTP-treated mouse. *Neurobiol Aging.* 2004; 25 (1): 131-8. doi: 10.3390/ijms25020707
211. Radad K, Al-Shraim M, Al-Emam A, Wang F, Kranner B, Rausch WD. Folia Rotenone: from modelling to implication in Parkinson's disease. *Neuropathol.* 2019; 57 (4): 317-26. DOI: 10.5114/fn.2019.89857
212. Rezai M, Mahmoodi M, Kaeidi A, Karimabad MN, Khoshdel A, Hajizadeh MR. Effect of crocin carotenoid on BDNF and CREB gene expression in brain ventral segmental area of morphine treated rats. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine.* 2018; 8(8): 387-93. DOI: 10.4103/2221-1691.239426
213. Rinholm JE, Vervaeke K, Tadross MR, Tkachuk AN, Kopek BG, Brown TA, et al. Movement and structure of mitochondria in oligodendrocytes and their myelin sheaths. *Glia.* 2016; 64 (5): 810-25. DOI: 10.1002/glia.22965
214. Rivetti di Val Cervo P, Romanov RA, Spigolon G, Masini D, Martín-Montañez E, Toledo E.M, et al. Induction of functional dopamine neurons from

human astrocytes in vitro and mouse astrocytes in a Parkinson's disease model. *Nat Biotechnol.* 2017; 35 (5): 444-52. DOI: 10.1038/nbt.3835

215. Rodríguez JJ, Witton J, Olabarria M, Noristani HN, Verkhratsky A. Increase in the density of resting microglia precedes neuritic plaque formation and microglial activation in a transgenic model of Alzheimer's disease. *Cell Death Dis.* 2010; 1: e1. DOI: 10.1038/cddis.2009.2

216. Rozova EV, Mankovskaya IN, Belosludtseva NV, Khmil NV, Mironova GD. Uridine as a protector against hypoxia-induced lung injury. *Sci. Rep.* 2019; 9 (1): 9418. DOI: 10.1038/s41598-019-45979-2

217. Rozova K, Putii Y. Is there an organ-specific expression of candidate genes (Dj1, PINK1) in tissues of the organism under experimental parkinsonism and its pathogenetic therapy? *Sci. Rev.* 2021; 36 (1): 31–7. doi: 10.31435/rsglobal\_sr/30012021/7378

218. Rozova K, Putii Y. The ultrastructural peculiarities of the cardio-pulmonary insufficiency in experimental Parkinsonism and diabetes: the possibility of correction. *Comorbidity in Pulmonology.* Truskavetz, 2017: 20-2.

219. Rub C, Wilkening A, Voos W. Mitochondrial quality control by the Pink1/Parkin system. *Cell Tissue Res.* 2017; 367 (1): 111-23. DOI: 10.1007/s00441-016-2485-8

220. Rubinsztein DC, Marino G, Kroemer G. Autophagy and aging. *Cell.* 2011; 146(6): 682-95. DOI: 10.1016/j.cell.2011.07.030

221. Rukavina K, Leta V, Sportelli C, Buhidma Y, Duty S, Malcangio M, et al. Pain in Parkinson's disease: new concepts in pathogenesis and treatment. *Curr Opin Neurol.* 2019; 32 (4): 579-88. DOI: 10.1097/WCO.0000000000000711

222. Ryu D-W, Han K, Cho A-H. Mortality and causes of death in patients with Parkinson's disease: a nationwide population-based cohort study. *Front Neurol.* 2023; (14): 1236296. doi: 10.3389/fneur.2023.1236296

223. Raz L, Knoefel J, Bhaskar K. The neuropathology and cerebrovascular mechanisms of dementia. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2016 Jan; 36 (1): 172–186. doi: 10.1038/jcbfm.2015.164
224. Sakita M, Murakami S, Nonaka K. [et al.]. Different patterns in age-related morphometric alteration of myelinated fibers and capillaries of the tibial nerve: a longitudinal study in normal rats. *J Anat.* 2020; 236 (6): 1101–11. doi: 10.1111/joa.13168.
225. Salari S, Bagheri M. In vivo, in vitro and pharmacologic models of Parkinson's disease. *Physiol Res.* 2019; 68(1): 17-24. DOI: 10.33549/physiolres.933895
226. Salzer JL, Zalc B. Myelination. *Curr Biol.* 2016; 26 (20): R971-R975.
227. Samaranch L, Lorenzo-Betancor O, Arbelo JM. PINK1-linked parkinsonism is associated with Lewy body pathology. *Brain.* 2010; 133 (4): 1128-42. DOI: [10.1093/brain/awq051](https://doi.org/10.1093/brain/awq051)
228. Savica R, Grossardt BR, Bower JH, Ahlskog JE, Boeve BF, Graff-Radford J, et al. Survival and Causes of Death Among People With Clinically Diagnosed Synucleinopathies With Parkinsonism: A Population-Based Study. *JAMA Neurol.* 2017; 74(7): 839-46. DOI: 10.1001/jamaneurol.2017.0603
229. Schapira AHV, Hartmann A, Agid Y. Parkinsonian Disorders in Clinical Practice. Wiley-Blackwell Publishing Ltd. ISBN: 978-1-405-19601-7. 2009. 208 p.
230. Schapira AH, Jenner P. Etiology and pathogenesis of Parkinson's disease. *Movement Disorders Journal.* 2011; 26(6): 1049- 55. DOI: 10.1002/mds.23732
231. Schrag A, Taddei RN Depression and Anxiety in Parkinson's Disease. *Int Rev Neurobiol.* 2017; 133: 623-655. DOI: 10.1016/bs.irn.2017.05.024
232. Schmelzer C, Kitano M, Rimbach G. Effects of ubiquinol-10 on microRNA-146a expression in Vitro and in Vivo. Hindawi publishing corporation

mediators of inflammation [Internet]. 2009. Available from: <https://www.hindawi.com/journals/mi/2009/415437/>

233. Schmelzer C, Niklowitz P, Okun J. Ubiquinol-induced gene expression signatures are translated into altered parameters of trythropoesis and reduced low destiny lipoprotein cholesterol levels in humans. *IUBMB Life*. 2011; 63(1): 42–8. DOI: 10.1002/iub.413

234. Sherer T B. Subcutaneous rotenone exposure causes highly selective dopaminergic degeneration and alpha-synuclein aggregation. *Exp. Neurol*. 2003; 179 (1): 9–16. DOI: 10.1006/exnr.2002.8072

235. Sironi F, Primignani P, Ricca S. DJ1 analysis in a large cohort of Italian early onset Parkinson disease patients. *Neurosci Lett*. 2013; 557: 165-70. DOI: 10.1006/exnr.2002.8072

236. Sijens PE. Relationships between brain water content and diffusion tensor imaging parameters (apparent diffusion coefficient and fractional anisotropy) in multiple sclerosis. *Eur. Radiol*. 2006; 16 (4): 898–904. DOI: 10.1007/s00330-005-0033-0

237. Stephenson J, Nutma E, van der Valk P, Amor S. Inflammation in CNS neurodegenerative diseases. *Immunology*. 2018; 154 (2): 204-19. DOI: 10.1111/imm.12922

238. Strijkova V, Todinova S, Andreeva T. [et al.] Platelets' Nanomechanics and Morphology in Neurodegenerative Pathologies *Biomedicines*. 2022; 10(9): 2239. doi: 10.3390/biomedicines10092239

239. Subramaniam SR, Chesselet MF. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in Parkinson's disease. *Prog Neurobiol*. 2013; 106-107 (7-8), 17-32. DOI: 10.1016/j.pneurobio.2013.04.004

240. Sun J, He C, Yan QX, Wang HD, Li KX, Sun X, et al. Parkinson-like early autonomic dysfunction induced by vagal application of DOPAL in rats. *CNS Neurosci Ther*. 2021; 27 (5): 540-51. DOI: 10.1111/cns.13589

241. Takanashi M, Li Y, Hattori N. Absence of Lewy pathology associated with PINK1 homozygous mutation. *Neurology* 2016; 86 (23): 2212-3. DOI: 10.1212/WNL.0000000000002744
242. Tanner CM, Kamel F, Ross GW, Hoppin JA, Goldman SM, Korell M, et al. Rotenone, paraquat, and Parkinson's disease. Langston JW. *Environ Health Perspect*. 2011; 119(6): 866-72. DOI: 10.1289/ehp.1002839
243. Tanti GK, Goswami SK. SG2NA recruits DJ-1 and Akt into the mitochondria and membrane to protect cells from oxidative damage. *Free Radic Biol Med*. 2014; 75 (1): 1–13. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2014.07.009
244. Tilokani L, Nagashima S, Paupe V, Prudent J. Mitochondrial dynamics: overview of molecular mechanisms. *Essays Biochem*. 2018; 62 (3): 341-60. DOI: 10.1042/EBC20170104
245. Thyagarajan D, Pressman S, Bruno C, Przedborski S, Shanske S, Lynch T. [et al.]. A novel mitochondrial 12Sr RNA point mutation in parkinsonism, deafness, and neuropathy. *Ann Neurol*. 2000; 48(5): 730-6.
246. Titova N, Padmakumar C, Lewis S. Parkinson's: a syndrome rather than a disease? *J. Neural Transm*. 2017; 124 (8): 907-14. DOI: 10.1007/s00702-016-1667-6
247. Titova N, Schapira AHV, Chaudhuri K.R. Nonmotor symptoms in experimental models of Parkinson's disease. *Nonmotor Parkinson's: The Hidden Face*. *International Review of Neurobiology*. Elsevier, Academic Press (OX) [Internet]. 2017. 133. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/bs.irm.2017.05.012>.
248. Truban D, Hou X, Caulfield TR. PINK1, Parkin, and mitochondrial quality control: what can we learn about Parkinson's disease pathobiology? *J Parkinsons Dis*. 2017; 7 (1), 13-29. DOI: 10.3233/JPD-160989
249. Tully M, Shi R. New insights in the pathogenesis of multiple sclerosis - role of acrolein in neuronal and myelin damage. *Int J Mol Sci*. 2013; 14 (10): 20037-47. DOI: 10.3390/ijms141020037

250. Tysnes OB, Storstein A. Epidemiology of Parkinson's disease. *J Neural Transm (Vienna)*. 2017; 124(8): 901-5. DOI: 10.1007/s00702-017-1686-y
251. Valente EM, Abou-Sleiman PM, Caputo V. Hereditary early-onset Parkinson's disease caused by mutations in PINK1. *Science*. 2004; 304(5674): 1158-60. DOI: 10.1126/science.1096284
252. Valente EM, Bentivoglio AR, Dixon P.H. Localization of a novel locus for autosomal recessive early-onset parkinsonism, PARK6, on human chromosome 1p35-p36. *Am J Hum Genet*. 2001; 68 (4): 895-900. DOI: 10.1086/319522
253. Valente EM, Salvi S, Ialongo T. PINK1 mutations are associated with sporadic early-onset parkinsonism. *Ann Neurol* 2004; 56 (3): 336-41. DOI: 10.1002/ana.20256
254. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol*. 2007; 39(1): 44-84. DOI: 10.1016/j.biocel.2006.07.001
255. Van Duijn CM, Dekker MC, Bonifati V. Park7, a novel locus for autosomal recessive early-onset parkinsonism, on chromosome 1p36. *Am J Hum Genet*. 2001; 69 (3): 629-34. DOI: 10.1086/322996
256. Wakabayashi K, Tanji K, Odagiri S, Miki Y, Mori F, Takahashi H. The Lewy body in Parkinson's disease and related neurodegenerative disorders. *Mol Neurobiol*. 2013; 47(2): 495-508. DOI: 10.1007/s12035-012-8280-y
257. Wang T, Liu Y-y, Wang X. [et al.] Protective effects of octacosanol on 6-hydroxydopamine-induced Parkinsonism in rats via regulation of ProNGF and NGF signaling. *Acta Pharmacol Sin*. 2010 Jul; 31(7): 765-774. doi: 10.1038/aps.2010.69
258. Weibel ER. Stereological principles for morphometry in electron microscopic cytology. *Int Rev Cytol.*, 1969, 26 (2), 235-302. doi: 10.1016/s0074-7696(08)61637-x.

259. Wei-Bin Shen, Kimberly A. McDowell, Aubrey A. Siebert, [et al.]. Environmental neurotoxin-induced progressive model of parkinsonism in rats *Ann Neurol*. *Ann Neurol*. 2010; 68(1): 70–80. doi: 10.1002/ana.22018
260. Weintraub D. Management of psychiatric disorders in Parkinson's disease: Neurotherapeutics – Movement Disorders Therapeutics. *Neurotherapeutics*. 2020; 17(4): 1511–24. doi: 10.1007/s13311-020-00875-w
261. Wheble PC, Sena ES, MR. Macleod A systematic review and meta-analysis of the efficacy of piracetam and piracetam-like compounds in experimental stroke. *Cerebrovasc Dis*. 2008; 25 (1-2): 5-11. DOI: 10.1159/000111493
262. Weakley BS. *A Beginner's Handbook in Electron Microscopy*. – Edinburgh and London: Churchill Livingstone, 1972. – 228 p.
263. Xiong N, Long X, Xiong J. Mitochondrial complex I inhibitor rotenone-induced toxicity and its potential mechanisms in Parkinson's disease models. *Crit. Rev. Toxicol*. 2012; 42(7): 613–32. DOI: 10.3109/10408444.2012.680431
264. Xiong N, Huang J, Zhang Z. Stereotaxical Infusion of Rotenone: A Reliable Rodent Model for Parkinson's Disease. *PLoS ONE*. 2009; 4 (11): 1-11. DOI: 10.1371/journal.pone.0007878
265. Yu D, Pan HX, Zhang RG, Li Y, Nie X. Nucleus DJ-1/Park7 acts as a favorable prognostic factor and involves mucin secretion in invasive breast carcinoma in Chinese population. *Int J Clin Exp Med*. 2017; 10(4): 6558–67. doi: 10.1007/s10863-019-09798-4
266. Zaltieri M, Grigoletto J, Longhena F, Navarria L, Favero G., Castrezati S, et al.  $\alpha$ -synuclein and synapsin III cooperatively regulate synaptic function in dopamine neurons. *J. Cell Sci*. 2015; 128 (13): 2231-43. DOI: 10.1242/jcs.157867

267. Zhang Y, Guo S, Xie C, Fang J. Uridine Metabolism and Its Role in Glucose, Lipid, and Amino Acid Homeostasis [Internet]. 2020. *Biomed. Res. Int.* Available from: <https://www.hindawi.com/journals/bmri/2020/7091718/>

268. Zhou W, Bercury K. Phenylbutyrate Up-regulates the DJ-1 Protein and Protects Neurons in Cell Culture and in Animal Models of Parkinson Disease. *J Biol Chem.* 2011; 286 (17): 14941-51. DOI: 10.1074/jbc.M110.211029

269. Zhu LH, Luo XG, Zhou YS. Lack of association between three single nucleotide polymorphisms in the PARK9, PARK15, and BST1 genes and Parkinson's disease in the northern Han Chinese population. *Chin. Med. J. (Engl).* 2012; 125(4): 588-92. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0366-6999.2012.04.006