



Хроническое внутрижелудочковое введение убаина вызывает моторные нарушения у мышей линии C57Bl/6

Ю.А. Тимошина^{1,3}, Р.Б. Казанская^{2,3}, В.А. Завьялов², А.Б. Вольнова², А.В. Латанов¹, Т.Н. Федорова³, Р.Р. Гайнетдинов², А.В. Лопачев^{2,3}

¹ФГБОУ ВО «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова», Москва, Россия;

²ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет», Санкт-Петербург, Россия;

³ФГБНУ «Научный центр неврологии», Москва, Россия

Аннотация

Введение. Кардиотонические стероиды являются природными лигандами Na^+ , K^+ -АТФазы, которые регулируют её активность и сигнальную функцию. Ранее было показано, что убаин при однократном внутрижелудочковом введении вызывает гиперлокомоцию у мышей линии C57Bl/6 вследствие уменьшения скорости обратного захвата дофамина из синаптической щели.

Материалы и методы. В исследовании были использованы 40 мышей линии C57Bl/6. На протяжении 4 дней животным ежедневно вводили 1,5 мкл 50 мкМ убаина в латеральный желудочек головного мозга. На 5-й день производили оценку локомоторной активности и моторных нарушений при помощи тестов «открытое поле», «удержание на планке» и «лесенка с перекладинами». В тканях мозга оценивали изменение активации сигнальных каскадов, соотношения про- и антиапоптотических белков, а также количества $\alpha 1$ - и $\alpha 3$ -изоформ α -субъединицы Na^+ , K^+ -АТФазы при помощи иммуноблоттинга. Активность Na^+ , K^+ -АТФазы оценивали в грубой синаптосомальной фракции тканей мозга.

Результаты. Через 24 ч после последнего введения убаина у мышей наблюдались гиперлокомоция и стереотипность движений в тесте «открытое поле». У мышей, получивших убаин, на 5-й день эксперимента увеличивалось время прохождения и количество ошибок в тестах «лесенка с перекладинами» и «удержание на планке». В стриатуме мышей активность киназы Akt снижалась, соотношение про- и антиапоптотических белков не менялось, как и количество α -субъединиц Na^+ , K^+ -АТФазы. Активность Na^+ , K^+ -АТФазы увеличивалась в стриатуме и уменьшалась в стволе головного мозга.

Выводы. Продолжительное воздействие убаина вызывает моторные нарушения, опосредованные изменениями активации сигнальных каскадов в нейронах дофаминергической системы.

Ключевые слова: Na^+ , K^+ -АТФаза; убаин; кардиотонические стероиды; дофаминергическая система

Этическое утверждение. Авторы подтверждают соблюдение институциональных и национальных стандартов по использованию лабораторных животных в соответствии с «Consensus Author Guidelines for Animal Use» (IAVES, 23.07.2010). Протокол исследования одобрен Этическим комитетом СПбГУ (протокол № 131-03-1 от 25.03.2019).

Источник финансирования. Исследование выполнено за счёт гранта Российского научного фонда № 22-75-10131, <https://rscf.ru/project/22-75-10131/> и при поддержке гранта СПбГУ № 94030300. Работы с животными проводились на базе вивария, входящего в состав ресурсного центра СПбГУ.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Адрес для корреспонденции: 125367, Россия, Москва, Волоколамское шоссе, д. 80. ФГБНУ «Научный центр неврологии». E-mail: lopachev@neurology.ru. Лопачев А.В.

Для цитирования: Тимошина Ю.А., Казанская Р.Б., Завьялов В.А., Вольнова А.Б., Латанов А.В., Федорова Т.Н., Гайнетдинов Р.Р., Лопачев А.В. Хроническое внутрижелудочковое введение убаина вызывает моторные нарушения у мышей линии C57Bl/6. *Анналы клинической и экспериментальной неврологии*. 2023;17(4):40–51.

DOI: <https://doi.org/10.54101/ACEN.2023.4.5>

Поступила 17.04.2023 / Принята в печать 12.05.2023 / Опубликовано 25.12.2023

Long-term Intracerebroventricular Administration of Ouabain Causes Motor Impairments in C57Bl/6 Mice

Yulia A. Timoshina^{1,3}, Rogneda B. Kazanskaya^{2,3}, Vladislav A. Zavialov², Anna B. Volnova², Alexander V. Latanov¹,
Tatiana N. Fedorova³, Raul R. Gainetdinov², Alexander V. Lopachev^{2,3}

¹Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia;

²Saint Petersburg State University, St. Petersburg, Russia;

³Research Center of Neurology, Moscow, Russia

Abstract

Introduction. Cardiac glycosides are natural ligands of Na^+/K^+ -ATPase, which regulate its activity and signaling. Intracerebroventricular administration of ouabain has been previously shown to induce hyperlocomotion in C57Bl/6 mice via a decrease in the rate of dopamine reuptake from the synaptic cleft.

Materials and methods. This study involved forty C57Bl/6 mice. 1.5 μL of 50 μM ouabain was administered daily into the left lateral cerebral ventricle over the course of 4 days. On day 5, open field, beam balance, and ladder rung walking tests were performed to assess the locomotor activity and motor impairments in the mice. We evaluated changes in the activation of signaling cascades, ratios of proapoptotic and antiapoptotic proteins, and the amount of $\alpha 1$ and $\alpha 3$ isoforms of the Na^+/K^+ -ATPase α -subunit in brain tissue using Western blotting. Na^+/K^+ -ATPase activity was evaluated in the crude synaptosomal fractions of the brain tissues.

Results. We observed hyperlocomotion and stereotypic behavior during the open field test 24 hours after the last injection of ouabain. On day 5, the completion time and the number of errors made in the beam balance and ladder rung walking tests increased in the mice that received ouabain. Akt kinase activity decreased in the striatum, whereas the ratio of proapoptotic and antiapoptotic proteins and the number of Na^+/K^+ -ATPase α -subunits did not change. Na^+/K^+ -ATPase activity increased in the striatum and decreased in the brainstem.

Conclusions. Long-term exposure to ouabain causes motor impairments mediated by changes in the activation of signaling cascades in dopaminergic neurons.

Keywords: Na^+/K^+ -ATPase; ouabain; cardiac glycosides; dopaminergic system

Ethics approval. Authors confirm compliance with institutional and national standards for the use of laboratory animals in accordance with «Consensus Author Guidelines for Animal Use» (IAVES, 23 July 2010). The research protocol was approved by the Ethics Committee of the St. Petersburg State University (protocol No. 131-03-1, March 25, 2019).

Source of funding. The study was supported by grant No. 22-75-10131 from the Russian Science Foundation, <https://rscf.ru/project/22-75-10131/>, and grant No. 94030300 from Saint Petersburg State University. All research conducted on animals was performed in the vivarium of the Saint Petersburg State University Resource Center.

Conflict of interest. The authors declare no apparent or potential conflicts of interest related to the publication of this article.

For correspondence: 125367, Russia, Moscow, Volokolamskoye shosse, 80. Research Center of Neurology. E-mail: lopachev@neurology.ru. Lopachev A.V.

For citation: Timoshina Yu.A., Kazanskaya R.B., Zavialov V.A., Volnova A.B., Latanov A.V., Fedorova T.N., Gainetdinov R.R., Lopachev A.V. Long-term intracerebroventricular administration of ouabain causes motor impairments in C57Bl/6 mice. *Annals of Clinical and Experimental Neurology*. 2023;17(4):40–51. (In Russ.)

DOI: <https://doi.org/10.54101/ACEN.2023.4.5>

Received 17.04.2023 / Accepted 12.05.2023 / Published 25.12.2023

Введение

Кардиотонические стероиды (КТС), также называемые сердечными гликозидами, — группа соединений, синтезируемых рядом растений и животных. При попадании в организм КТС связываются с насосной α -субъединицей Na^+/K^+ -АТФазы, обратимо ингибируя её активность. В ингибированном состоянии Na^+/K^+ -АТФаза прекращает поддерживать и, в случае нейронов, восстанавливать электрохимический градиент на плазматической мембране. Специфический сайт связывания КТС был обнаружен между трансмембранными доменами М1–М2, М5–М6 и М7–М8 $\alpha 3$ -субъединицы, на внеклеточной стороне белка. При связывании КТС комплекс Na^+/K^+ -АТФазы стабилизируется в конформации E2, и его насосная активность обратимо ингибируется [1]. Несмотря на то, что в высоких концентрациях КТС ингибируют Na^+/K^+ -АТФазу [2], наномолярные концентрации КТС, напротив, способны приводить к повышению её активности [3]. Данный эффект

объясняется наличием на плазматической мембране клетки тетрамерных комплексов неактивных гетеротетрамеров Na^+/K^+ -АТФазы, которые распадаются при связывании одного из ферментов КТС. Распад тетрамерных комплексов гетеротетрамеров Na^+/K^+ -АТФазы приводит к увеличению количества активного фермента [4]. У лабораторных грызунов к КТС нечувствительна $\alpha 1$ -изоформа Na^+/K^+ -АТФазы, которая присутствует во всех клетках, что делает грызунов удобными для изучения влияния КТС конкретно на центральную нервную систему (ЦНС) [5]. Помимо $\alpha 1$ -изоформы Na^+/K^+ -АТФазы, в ЦНС также присутствуют $\alpha 2$ -изоформа в астроцитах и $\alpha 3$ -изоформа, специфичная для нейронов [6].

На клеточных культурах нейронов крыс показано, что концентрации КТС, оказывающие ингибирующее воздействие на $\alpha 3$ -изоформу Na^+/K^+ -АТФазы, обладают нейротоксическим эффектом [7], а концентрации, не снижающие активность Na^+/K^+ -АТФазы, обладают нейропротекторной

активностью [8, 9]. Несмотря на свою токсичность в высоких концентрациях, КТС применяются в фармакологии. Например, КТС дигоксин, продуцируемый наперстянкой (*Digitalis lanata*), используется при лечении сердечной недостаточности [10]. Более того, ряд исследований свидетельствует о наличии у млекопитающих эндогенных аналогов КТС [11]. Однако было обнаружено, что применение низких концентраций дигоксина вызывает у пациентов перепады настроения [12] и в некоторых случаях — состояние бреда [13]. Данное открытие привело к разработке ряда моделей биполярного расстройства, основанных на внутрижелудочковом (ICV) введении уабаина крысам и мышам [14–16].

КТС уабаин (строфантин-Г), как и дигоксин, является гликозилированным карденолидом и применяется в качестве лекарственного препарата для лечения сердечной недостаточности. В 2019 г. была описана модель уабаин-индуцированного биполярного расстройства на мышах, где было продемонстрировано, что однократное ICV-введение уабаина вызывает мани-подобное поведение, повышенный синтез дофамина и сниженную скорость обратного захвата дофамина из синаптической щели [16]. Таким образом, было подтверждено, что эффекты, наблюдаемые после введения уабаина, опосредованы в том числе изменением работы дофаминергической системы. Также было воспроизведено ранее показанное на крысах изменение активности киназы Akt, а также MAPK-киназы ERK1/2, которые связаны с активацией D2-рецептора к дофамину.

У пациентов с болезнью Паркинсона (БП) наблюдается повышенная концентрация дигоксина в крови [17], что свидетельствует о вероятном участии эндогенных аналогов КТС в патогенезе БП. Кроме того, КТС нерифолин используют для моделирования паркинсонизма на *Danio rerio* [18]. Несмотря на то, что механизмы участия эндогенных КТС в патогенезе БП не изучены, их участие в развитии биполярного расстройства и депрессии показано в ряде исследований [19].

Нейротоксичность КТС связывают с развитием окислительного стресса и запуском апоптоза, опосредованного гиперактивацией киназы ERK 1/2 [20]. Стоит подчеркнуть, что аналогичный механизм наблюдается при моделировании паркинсонизма при помощи 6-гидроксидаофамина. На основании приведённых данных можно предположить, что хроническое воздействие КТС посредством их косвенного воздействия на работу DAT способно влиять на функционирование и жизнеспособность дофаминергических нейронов. Предположительно, одним из механизмов, приводящих к развитию дегенеративных процессов в дофаминергических нейронах является хроническое нарушение рециркуляции дофамина [21]. Ряд исследований указывает на то, что такие нейропсихиатрические расстройства как биполярное расстройство, синдром дефицита внимания и гиперактивности, а также депрессия являются факторами риска развития БП — в патогенезе всех перечисленных расстройств ключевую роль играет нарушение работы дофаминовых рецепторов и обратного захвата дофамина [22–25]. Дисбаланс активности данных транспортёров, с преобладанием активности мембранных DA-транспортёров (DAT), приводит к накоплению токсичных продуктов метаболизма дофамина в цитоплазме, вызывая развитие окислительного стресса [26–28]. Однако дисфункция DAT также является пагубной для функции

нейронов. При частичной потере функции DAT может развиваться биполярное расстройство, в то время как полная дисфункция DAT приводит к развитию ювенильного паркинсонизма [29]. Некоторые исследователи даже предлагают использовать показатель уровня активности DAT в обонятельных луковицах человека в качестве прогностического фактора риска развития БП [30]. Из данных литературы можно сделать вывод о том, что нарушение активности DAT как в сторону понижения, так и в сторону повышения способно приводить к развитию ряда патологических процессов, и, возможно, играет значимую роль в патогенезе БП. Непродолжительное ингибирующее воздействие на DAT не оказывает достоверного эффекта на риск развития БП, и функция дофаминергической системы достаточно быстро восстанавливается [31, 32]. Таким образом, факторы, вызывающие развитие долговременного нарушения функции DAT и, как следствие, дофаминергической системы в целом, необходимо искать за пределами её непосредственных элементов. Воздействие данных факторов должно приходиться на связующие звенья, нарушение функции которых наблюдается при воздействии факторов, вызывающих гибель дофаминергических нейронов. Одним из таких звеньев может быть Na^+, K^+ -АТФаза.

Изучение нарушений, вызванных хроническим воздействием КТС в низких концентрациях на дофаминергическую систему, позволит выявить новые механизмы нарушения и регуляции её работы, а также приблизит нас к пониманию роли эндогенных КТС в ЦНС.

Целью данного исследования стало изучение влияния хронического введения КТС уабаина в латеральный желудочек мозга мышей линии C57Bl/6 на моторные функции животных, активность дофаминзависимых сигнальных каскадов и соотношения белков-регуляторов апоптоза семейства Bcl-2 в стриатуме животных, а также влияние однократного введения используемой дозы уабаина на активность Na^+, K^+ -АТФазы в отделах головного мозга животных.

Материалы и методы

Экспериментальные животные

Эксперименты проводили на 4–6-месячных самцах мышей линии C57Bl/6 ($n = 40$) из вивария Санкт-Петербургского государственного университета, содержащихся в индивидуальных вентилируемых клетках при $22 \pm 1^\circ\text{C}$, относительной влажности воздуха 50–70% и 12-часовом цикле свет : темнота (свет с 8 утра до 8 вечера), пище и воде *ad libitum*. Мышей содержали в соответствии с правилами использования лабораторных животных в научных исследованиях (согласно рекомендациям Федерации европейских ассоциаций по науке о лабораторных животных и Ассоциации специалистов по лабораторным животным).

Порядок проведения экспериментов утверждён этическим комитетом по экспериментам на животных СПбГУ (протокол № 131-03-1 от 25.03.2019).

Введение веществ

Животных анестезировали газовым наркозом изофлуран («IsoFlo»). После тщательного очищения черепа от поверхностных тканей им унилатерально устанавливали на-

правляющую канюлю, изготовленную из игл 26g («KDF») с закреплённым пластиковым держателем размером 1×2 мм [33], при помощи стереотаксической установки по координатам: AP = -0,5; L = 1,0; на глубину 2,0 мм таким образом, что кончик канюли находился над латеральным желудочком, но не проникал внутрь, и фиксировали при помощи пломбировочного материала на основе акрилоксида. После закрепления в направляющую канюлю вставляли закрывающую канюлю, изготовленную из 33g игл («Mesogam»), длиной 3,9–4,0 мм для предотвращения закупоривания направляющих после операции. Эксперименты начинали через 3 дня после постановки канюли.

ICV-введение осуществляли посредством инъекционной канюли, изготовленной из 33g игл, соединенных инъекционной системой с Гамильтоновым шприцом, установленной на глубину 2,5 мм в направляющую канюлю. Равномерность введения обеспечивали шприцевой помпой, подающей растворы со скоростью 0,75 мкл/мин. Животным вводили 1,5 мкл убаина, растворённого в искусственной цереброспинальной жидкости (125 мМ NaCl, 26 мМ NaHCO₃, 4 мМ KCl, 1,25 мМ NaH₂PO₄, 2 мМ CaCl₂, 2 мМ MgCl₂, 25 мМ глюкозы). Контрольным животным вводили 1,5 мкл искусственной цереброспинальной жидкости.

Поведенческое тестирование

В тесте «открытое поле» оценивали локомоторную активность и стереотипное поведение. Животное помещали в центр арены размерами $40 \times 40 \times 40$ см, подключённой к системе видеослежения («EthoVision XT», «Noldus»), и фиксировали пройденное расстояние в течение 20 мин. В программном пакете «EthoVision» изображение квадратного поля визуально разделяли на зоны: 4 угла, 4 края и центральную. Центральная зона представляла собой квадрат, расположенный по центру поля с диагональю, равной 1/2 диагонали всего поля. Двигательную стереотипию животных в «открытом поле» оценивали с использованием алгоритма анализа программы «EthoVision XT». Данный алгоритм рассчитывает индекс спонтанных чередований следующим способом: количество чередований (Alt) соответствует количеству отрезков траектории, где животное последовательно проходило соседние зоны «открытого поля» (за исключением центральной); максимально возможное число чередований (mAlt) рассчитывается как разность между общим числом зон, в которые животные заходили нерегулярно, и количества выбранных для анализа зон без одной зоны; индекс чередований (индекс стереотипии, IAlt) рассчитывается как процентное отношение количества чередований к максимально возможному числу чередований:

$$I_{Alt} = \text{Alt}/\text{mAlt} \times 100\%.$$

В тесте «удержание на планке» определяли координацию движений животных. Мышей помещали всеми четырьмя конечностями в начале гладкого деревянного стержня с круглым сечением (диаметр — 10 мм, длина 100 см), приподнятого на 80 см от поверхности пола, ориентируя тело животного вдоль стержня. На противоположном конце стержня располагали плоскую прямоугольную платформу размером 15×15 см. Перед проведением эксперимента животных обучали хождению вдоль стержня. Во время эксперимента фиксировали время прохождения от начала стержня до платформы, количество соскальзываний лап (ошибок) и падений при выполнении теста.

В тесте «лестница с перекладинами» оценивали мелкую моторику конечностей и координацию движений животных. Мышей помещали в начало лестницы, состоящей из металлических прутьев диаметром 2 мм, расположенных на расстоянии 1,5 см друг от друга, и наклонённой под углом 15°. В начале лестницы располагали домашнюю клетку. Перед проведением эксперимента животных обучали хождению по лестнице. Во время эксперимента фиксировали время прохождения теста и количество соскальзываний лап с перекладин лесенки (ошибки).

Сбор материала

Животных эвтаназируют при помощи дислокации шейных позвонков. Мозг извлекали на льду с последующим разделением на отделы (стриатум, ствол мозга, мозжечок, гиппокамп) и замораживали в жидком азоте. Материал хранили при -80°C .

Определение активности Na⁺, K⁺-АТФазы

Активность Na⁺, K⁺-АТФазы определяли по методу накопления неорганического фосфата. Все операции проводили на льду. Взвешенную ткань гомогенизировали в десятикратном объёме буфера для выделения (0,25 М сахароза, 1 мМ ЭДТА, 20 мМ Трис, pH 7,45), содержащего коктейли ингибиторов протеаз и фосфатаз (1 : 1000, «Sigma»), добавленных непосредственно перед использованием, с помощью гомогенизатора «Schuett Homgenplus» («SchuettBiotec GmbH»). Гомогенат центрифугировали в течение 2 мин при 4°C и 1000g. Супернатант переносили в отдельную пробирку и повторно центрифугировали в течение 15 мин при 4°C и 10 000g. Синаптосомальную фракцию ресупендируют в буфере для выделения и хранили при -80°C . Для определения концентрации белка часть препарата лизировали с помощью RIPA-буфера («Sigma»), содержащего коктейли ингибиторов протеаз и фосфатаз, и определяли концентрацию белка с помощью набора «DC Protein Assay Kit» («Bio-Rad»). Синаптосомальную фракцию с концентрацией белка 2 мкг/мкл инкубировали в присутствии 0,065% дезоксихолата натрия на холодной водяной бане в течение 30 мин. Полученный препарат Na, K-АТФазы в конечной концентрации 0,05 мкг/мкл добавляли в реакционную среду (130 мМ NaCl, 20 мМ KCl, 3 мМ MgCl₂, 30 мМ имидазол, pH 7,5). Для измерения активности других АТФ-зависимых ферментов использовали насыщенный раствор убаина в реакционном буфере. Реакцию запускали добавлением 3 мМ АТФ и инкубировали реакционную смесь в течение 15 мин при 37°C . Реакцию останавливали добавлением 0,1 мл охлаждённого 3 М ацетатного буфера pH 4,3, содержащего 3,7% формальдегида. Для определения количества высвободившегося неорганического фосфата к образцу добавляли 0,02 мл 2% гептамолибдата аммония и 0,02 мл свежеприготовленного 0,3% раствора хлорида олова (II). Образцы тщательно перемешивали и инкубировали в течение 10 мин. Оптическую плотность раствора измеряли при 735 нм с помощью планшетного ридера «Synergy H1» («BioTek»). Активность Na, K-АТФазы рассчитывали по разнице между оптической плотностью в тестовом образце и образце, содержащем насыщенный раствор убаина.

Иммуноблоттинг

Образцы тканей лизировали в RIPA-буфере («Sigma») с добавлением ингибиторов протеаз и фосфатаз (1 : 1000, «Sigma»).

Полученный лизат центрифугировали при 14 000g в течение 20 мин при 4°C, затем отбирали супернатант, в котором измеряли концентрацию белка с помощью набора реактивов «DC Protein Assay Kit» («Bio-Rad»). Разделение белков осуществляли электрофорезом в полиакриламидном геле по Леммли, после чего белки переносили на PVDF-мембрану («Whatman») и инкубировали с антителами согласно рекомендациям производителей. Для анализа использовали первичные антитела к p-Akt (Ser473), Akt, p-ERK1/2 (Thr202/Tyr204), ERK1/2, Bak, Bax, Bcl-2, Bcl-xL («Cell Signaling Technology»), pJNK (Thr183/Tyr185), JNK, NR2B, GAPDH и β-актину («Santa Cruz Biotechnology»), NKA α1 a6F («DSHB»), NKA α3 («Thermo Scientific») и вторичные антикроличьи и антимишьиные антитела («Cell Signaling Technology»), конъюгированные с пероксидазой хрена. Мембраны проявляли при помощи хемилюминесцентного субстрата «SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate» («Thermo Scientific»), люминесценцию детектировали при помощи системы геледокументирования «ChemIDoc MP» («Bio-Rad»), интенсивность люминесценции рассчитывали с помощью программы «Image Lab 6.0.1» («Bio-Rad»). Активацию киназ оценивали по отношению интенсивности полос фосфорилированной формы киназы к интенсивности полос её общей формы (уровень фосфорилирования).

Статистический анализ

Статистическую обработку результатов осуществляли при помощи пакета статистических программ «GraphPad Prism 7». Данные представлены в виде среднего арифметического ± стандартная ошибка среднего (mean ± SEM). Анализ результатов экспериментов проводили с использованием *t*-теста и одностороннего (one-way ANOVA) или двустороннего анализа дисперсии (two-way ANOVA) с тестом множественного сравнения Тьюки с предварительной проверкой на нормальность по критерию Шапиро–Уилка. Достоверность отличий во всех опытах принимали при $p < 0,05$.

Результаты

Моторные нарушения и локомоторная активность мышей после введения уабаина

Исследование влияния ICV-введения 1,5 мкл 50 мкМ (75 пмоль, 43,8 нг) уабаина в латеральный желудочек мозга на неврологический статус и локомоторную активность животных проведено через 24 ч после 4-дневного введения уабаина. Для оценки неврологического статуса животных использовали тесты «удержание на планке» и «лесенка с перекладинами».

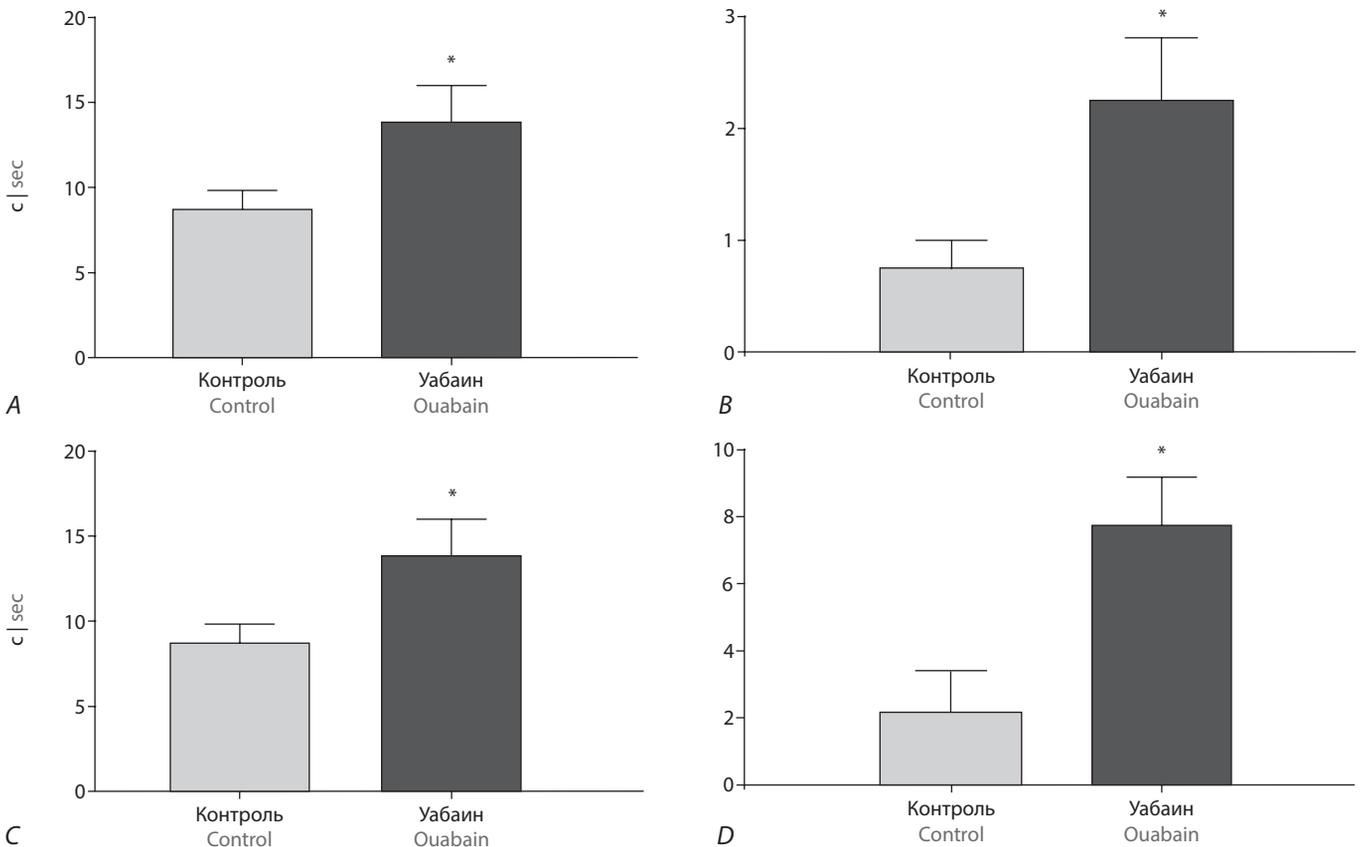


Рис. 1. Влияние 4-дневного ICV-введения уабаина в латеральный желудочек мозга мышей линии C57Bl/6 ($n = 5$) на время прохождения расстояния (A), количество ошибок в тесте «лесенка с перекладинами» (B), расстояние (C), количество ошибок в тесте «удержание на планке» (D). Данные представлены в виде mean ± SEM; * $p < 0,05$.

Fig. 1. The effect of 4-day ICV ouabain administration to C57Bl/6 mice ($n = 5$) on the traversal time (A), the number of errors in ladder rung walking test (B), distance (C), the number of errors in the beam balance test (D). The data are presented as mean ± SEM; * $p < 0.05$.

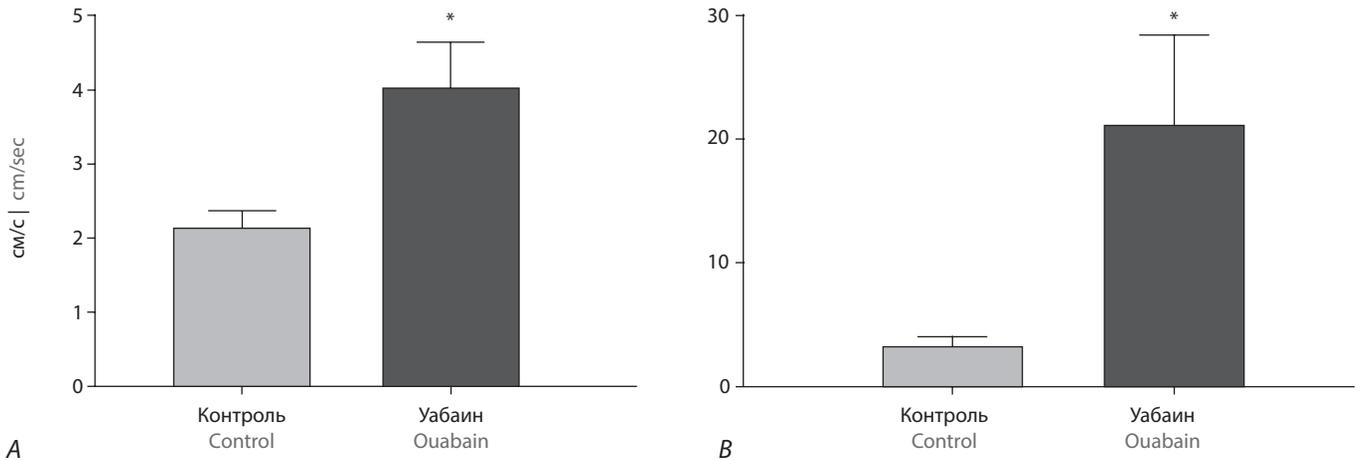


Рис. 2. Влияние 4-дневного ICSV-введения убаина в латеральный желудочек мозга мышей линии C57Bl/6 ($n = 5$) на двигательную активность (A) и IAlt (B) в 20-минутном тесте «открытое поле». Данные представлены в виде mean \pm SEM; * $p < 0,05$.

Fig. 2. The effect of 4-day ICSV uabain administration to C57Bl/6 mice ($n = 5$) on motor activity (A) and IAlt (B) values acquired from the 20-minute open field test.

The data are presented as mean \pm SEM; * $p < 0.05$.

Через 24 ч после 4-дневного ICSV-введения убаина животные, которым вводили убаин, проходили тест «лесенка с перекладинами» в 1,6 раза медленнее ($p = 0,045$), чем животные из контрольной группы, и делали в 3 раз больше ошибок ($p < 0,028$; рис. 1, A). Тест «удержание на планке» на 5-й день животные, которым вводили убаин, проходили в 2 раза медленнее ($p < 0,031$), чем животные из контрольной группы, и делали в 3,6 раза больше ошибок ($p < 0,02$). Из представленных результатов можно предположить, что многократное введение убаина мышам линии C57Bl/6 приводит к нарушению способности животных удерживать равновесие, а также производить точные движения конечностями.

Для оценки локомоторной активности животных через 24 ч после 4-дневного введения убаина был проведён 20-минутный тест «открытое поле» и определена двигательная активность животных, выраженная в средней скорости передвижения. Для оценки стереотипичности передвижений животных также был рассчитан IAlt.

Через 24 ч после 4-дневного ICSV-введения убаина двигательная активность животных, выраженная в средней скорости передвижения, увеличивалась в 1,9 раза ($p = 0,029$) по сравнению с контрольной группой (рис. 2, A). IAlt животных в тесте «открытое поле» через 24 ч после 4-дневного введения убаина был в 7 раз выше, чем у животных контрольной группы ($p = 0,036$; рис. 2, B), что говорит о выраженной стереотипичности передвижений у группы животных, которым вводили убаин. Из представленных данных можно сделать вывод о том, что при многократных введениях убаина увеличение двигательной активности и стереотипность передвижений животных сохраняется через 1 сут после последнего введения, а также что у животных развивается нарушение координации движений.

Влияние убаина на каталитическую активность Na^+, K^+ -АТФазы в мозге мышей

Для того, чтобы оценивать влияние убаина в ЦНС мышей линии C57Bl/6, необходимо выяснить, как используемая при ICSV-введении доза убаина влияет на ферментативную

активность Na^+, K^+ -АТФазы разных отделов мозга животных. Активность Na^+, K^+ -АТФазы была измерена в грубой синаптосомальной фракции стриатума, гиппокампа, ствола и мозжечка животных из контрольной группы и через 10, 30 мин после введения убаина.

Через 10 мин после введения убаина активность Na^+, K^+ -АТФазы синаптосомальной фракции стриатума животных увеличилась в 1,4 раза ($p < 0,05$), а через 30 мин достоверно не отличалась от активности фермента в контрольной группе (рис. 3, A). Устойчивая к ингибированию 5 мМ убаином активность составила 4,1 мкМ Pi/мг белка/мин.

Активность Na^+, K^+ -АТФазы синаптосомальной фракции гиппокампа животных через 10 и 30 мин после введения убаина достоверно не отличалась от активности фермента в контрольной группе (рис. 3, B). Устойчивая к ингибированию 5 мМ убаином активность составила 4,4 мкМ Pi/мг белка/мин.

В синаптосомальной фракции ствола мозга животных через 10 мин после введения убаина активность Na^+, K^+ -АТФазы достоверно не отличалась от активности фермента в контрольной группе, а через 30 мин после введения убаина уменьшилась в 1,8 раза (рис. 3, C; $p < 0,05$). Устойчивая к ингибированию 5 мМ убаином активность составила 5 мкМ Pi/мг белка/мин.

Исходя из полученных данных можно сказать, что ICSV-введение 1,5 мкл 50 мкМ убаина в латеральный желудочек мозга через 10 мин после введения приводит к непродолжительному увеличению активности Na^+, K^+ -АТФазы в стриатуме и уменьшению активности фермента в стволе мозга животных через 30 мин после введения.

Влияние убаина на активацию внутриклеточных сигнальных киназ и количество белков в стриатуме мышей

Ранее было показано, что однократное ICSV-введение 50 мкМ убаина вызывает активацию Akt и ERK1/2 [16]. На первичной культуре нейронов больших полушарий также

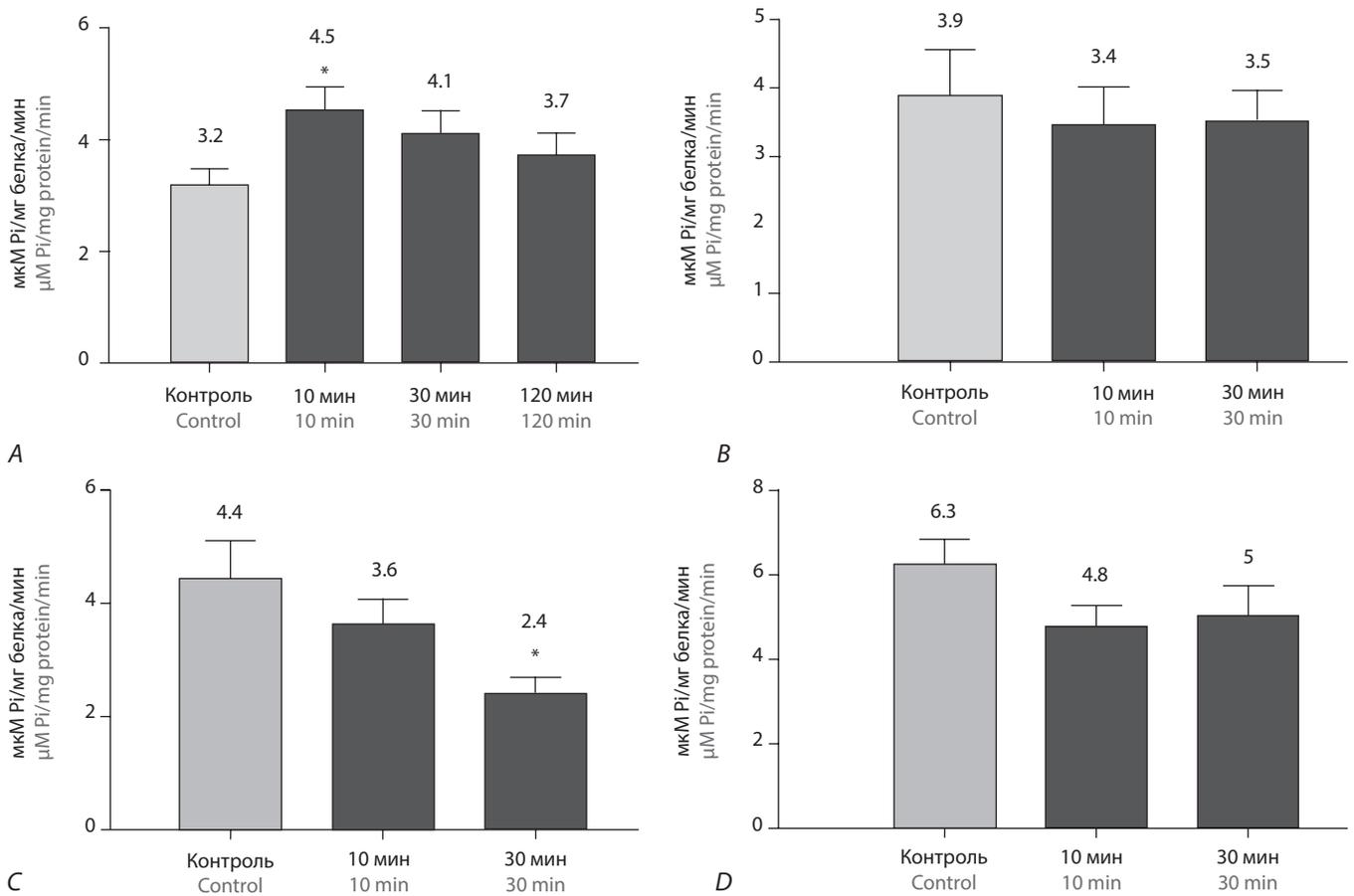


Рис. 3. Влияние 50 мкМ убаина на активность Na⁺, K⁺-АТФазы синапсомальной фракции стриатума (А), гиппокампа (В), ствола (С), мозжечка (D) мышей линии C57Bl/6 (n = 5) через 10 и 30 мин после ICV-введения 1,5 мкл в латеральный желудочек мозга.

Данные представлены в виде mean ± SEM; *p < 0,05.
Fig. 3. The ouabain effects on Na⁺/K⁺-ATPase activity in the synaptosomal fraction derived from the striatum (A), hippocampus (B), brainstem (C), and cerebellum (D) in C57Bl/6 mice (n = 5) at 10 and 30 minutes after the ICV injection into a lateral cerebral ventricle. The data are presented as mean ± SEM; *p < 0.05.

установлено, что продолжительное воздействие убаина (6–18 ч) вызывает инактивацию другой МАР-киназы — JNK [7]. Для того чтобы выяснить, как многократное ICV-введение 50 мкМ убаина влияет на активацию внутриклеточных сигнальных каскадов, связанных с дофаминовыми рецепторами и ранее исследованными эффектами убаина, проанализирована активация киназ Akt, ERK1/2 и JNK в стриатуме животных после 4-кратного ежедневного введения 50 мкМ убаина (на 5-е сутки через 24 ч после последнего введения). Анализ активации киназ проводили, сравнивая соотношение фосфорилированной формы киназы к количеству её общей формы у контрольных и получавших убаин животных при помощи иммуноблоттинга.

Четырёхкратное ежедневное введение 50 мкМ убаина вызывает уменьшение активации Akt на 62,2% (p < 0,05) в стриатуме животных через 24 ч после последнего введения по сравнению с контролем (рис. 4, А). В то же время активация ERK1/2 и JNK по сравнению с контролем не изменялась (рис. 4, В, С). Из полученных данных можно заключить, что долговременные эффекты убаина не включают изменения активации МАР-киназ ERK1/2 и JNK. При этом можно предположить, что происходит переключение

внутриклеточных сигнальных каскадов на «медленный» ответ на активацию дофаминовых рецепторов, который приводит к инактивации киназы Akt [34].

На первичной культуре нейронов крысы было показано, что убаин может вызывать уменьшение количества NR2B-субъединицы NMDA-рецептора [35]. Сделано предположение о том, что многократное введение убаина может приводить к изменению количества Na⁺, K⁺-АТФазы, а также взаимодействующего с ней NMDA-рецептора. Для проверки данного предположения была проведена оценка влияния ICV-введения убаина на количество α1- и α3-изоформ α-субъединицы Na⁺, K⁺-АТФазы и количество NR2B-субъединицы NMDA-рецептора в стриатуме мышей.

Многократное введение убаина не вызвало изменения количества α1- и α3-изоформ α-субъединицы Na⁺, K⁺-АТФазы (рис. 5, А, В). Количество NR2B-субъединицы NMDA-рецептора в стриатуме животных через 24 ч после последнего введения уменьшилось на 37,4% (p < 0,05) у животных, которым вводили убаин, по сравнению с контролем (рис. 5, С).

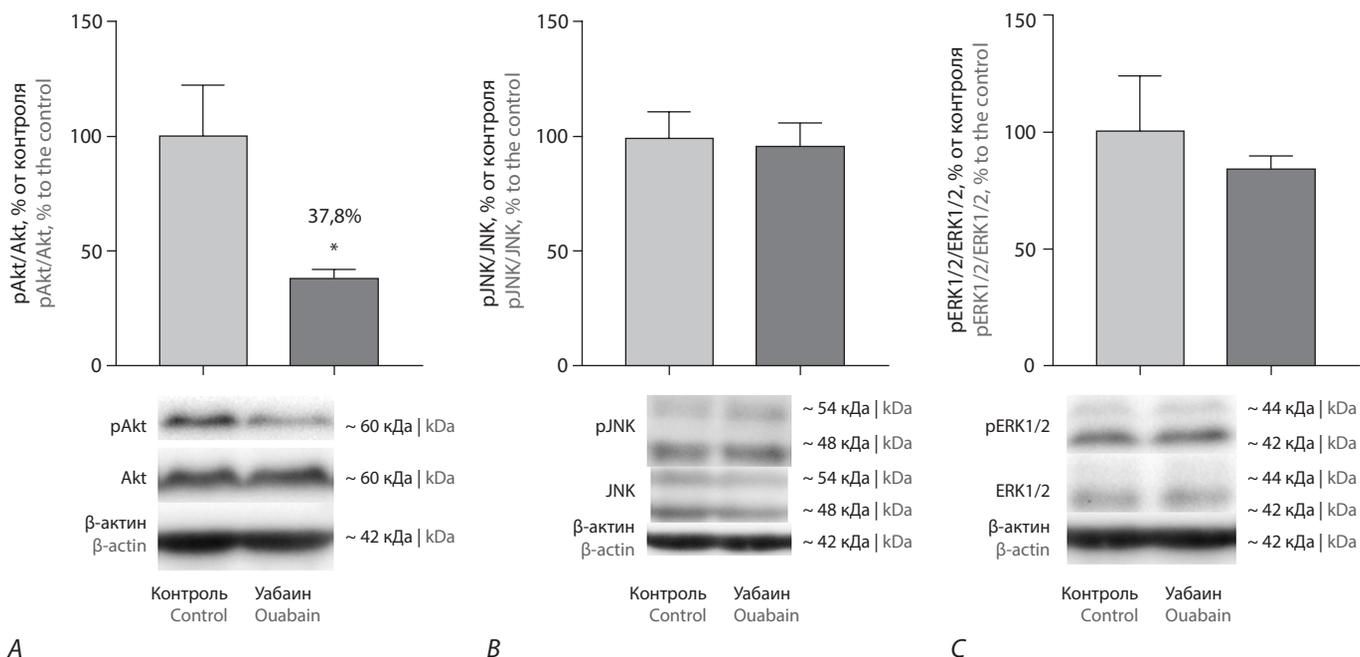


Рис. 4. Влияние 4-кратного ежедневного введения 50 мкМ уабаина на активацию Akt (A), ERK1/2 (B) и JNK (C) в стриатуме мышей линии C57Bl/6 через 24 ч после последнего введения. Данные представлены в виде mean ± SEM; **p* < 0,05. Под графиками приведены репрезентативные изображения иммунореактивных полос.
Fig. 4. The effects of once daily 4-day administration of 50 μM ouabain on Akt (A), ERK1/2 (B), and JNK (C) activation in the C57Bl/6 mice striatum measured 24 hours after the last injection. The data are presented as mean ± SEM; **p* < 0.05. Under the charts representative immunoreactive bands are presented.

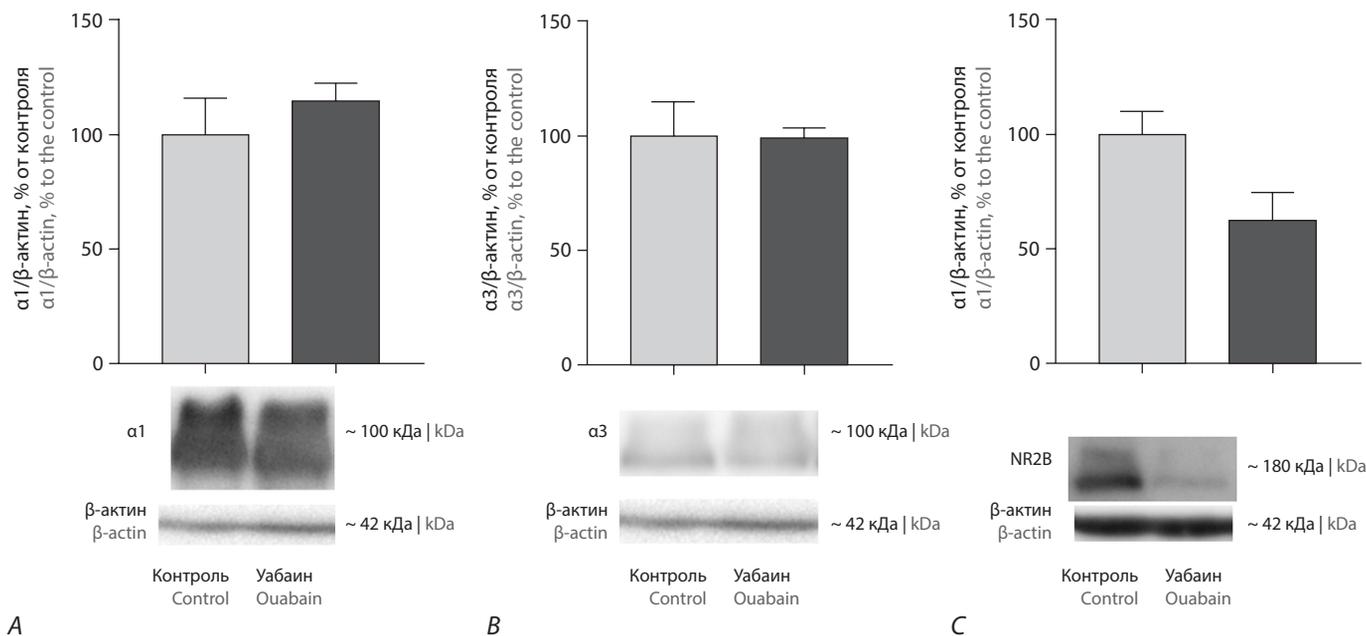


Рис. 5. Влияние 4-кратного ежедневного введения 50 мкМ уабаина на количество α1- (A) и α3- (B) изоформ α-субъединицы Na⁺/K⁺-АТФазы, а также количество NR2B-субъединицы NMDA-рецептора (C) в стриатуме мышей линии C57Bl/6 через 24 ч после последнего введения. Данные представлены в виде mean ± SEM; **p* < 0,05. Под графиками приведены репрезентативные изображения иммунореактивных полос.
Fig. 5. The effect of once daily 4-day administration of 50 μM ouabain on the levels of α1 (A) and α3 (B) isoforms in α subunit of Na⁺/K⁺-ATPase and the levels of NR2B subunits in NMDA-receptors (C) in the mice's striatum measured 24 hours after the last injection. The data are presented as mean ± SEM; **p* < 0.05. Under the charts representative immunoreactive bands are presented.

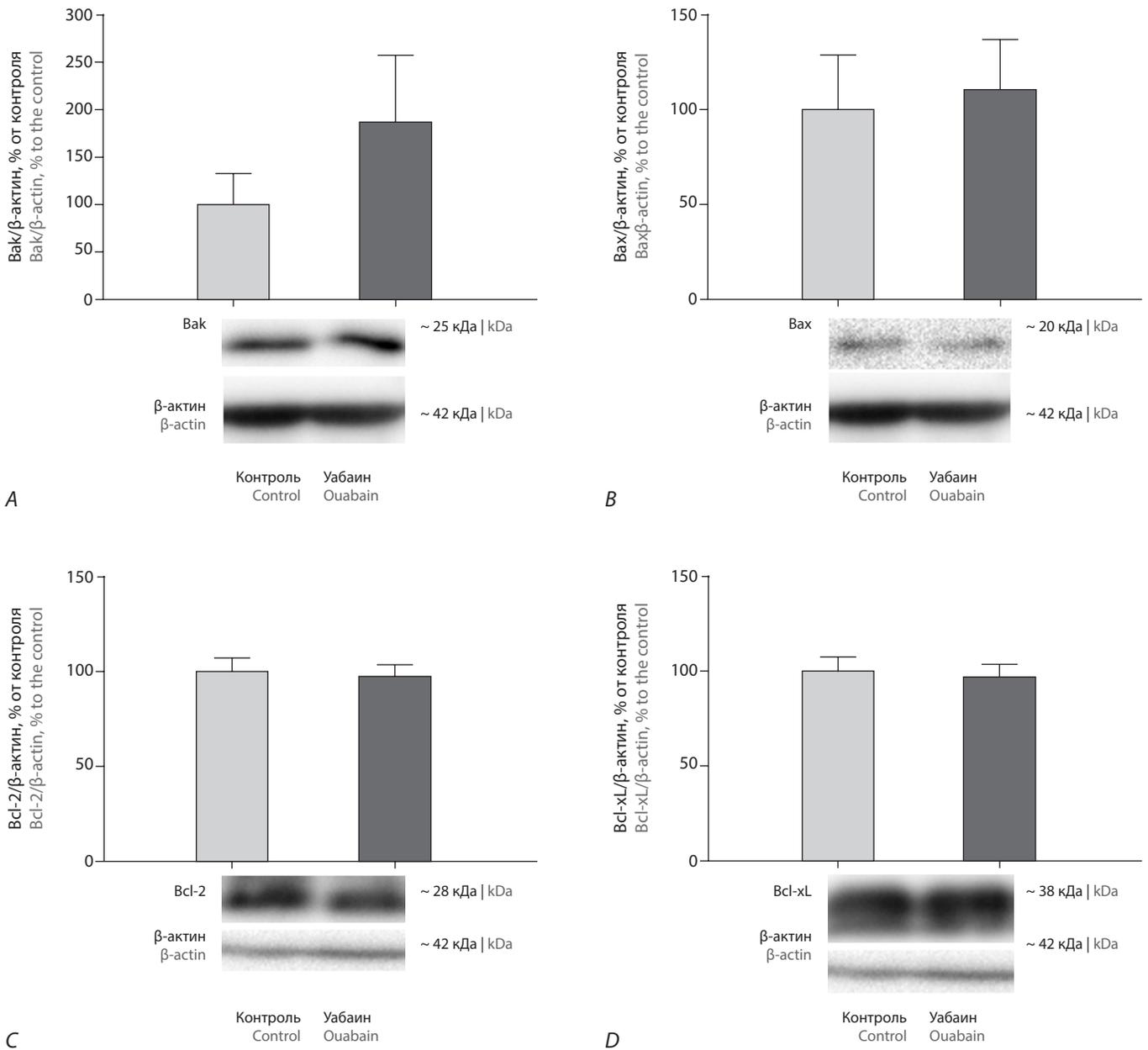


Рис. 6. Влияние четырехкратного ежедневного введения 50 мкМ уабаина на количество Bak (A), Bax (B), Bcl-2 (C), Bcl-xL (D) в стриатуме мышей линии C57Bl/6 через 24 ч после последнего введения. Данные представлены в виде mean ± SEM; **p* < 0,05. Под графиками приведены репрезентативные изображения иммуореактивных полос.
Fig. 6. The effects of once-daily 4-day administration of 50 μM ouabain on the levels of Bak (A), Bax (B), Bcl-2 (C), Bcl-xL (D) proteins in the C57Bl/6 mouse striatum measured 24 hours after the last injection. The data are presented as mean ± SEM; **p* < 0.05. Under the charts representative immunoreactive bands are presented.

Хотя, согласно ранее полученным данным, однократное ICV-введение 50 мкМ уабаина не вызывает гибели нейронов [16], было сделано предположение, что многократное воздействие 50 мкМ уабаина может вызывать нарушение гомеостаза белков — регуляторов митохондриального пути апоптоза. Для того чтобы проверить данное предположение, было исследовано влияние 4-кратного ежедневного ICV-введения 50 мкМ уабаина на количество проапоптотических и антиапоптотических белков семейства Bcl-2 в стриатуме животных через 24 ч после последнего введения.

Как видно из рис. 6, 4-кратное ежедневное введение 50 мкМ уабаина не вызывает изменения количества Bak, Bax, Bcl-2, Bcl-xL в стриатуме животных через 24 ч после последнего введения по сравнению с контролем. Исходя из этого можно заключить, что либо в данном дизайне эксперимента уабаин не оказывает нейротоксического действия в стриатуме животных, либо нейротоксичность уабаина не связана с изменением основных белков-регуляторов митохондриального пути апоптоза семейства Bcl-2.

Обсуждение

Для оценки равновесия и координации движений животных использовали два теста: «удержание на планке» и «лесенка с перекладинами». В обоих тестах животные, получавшие уабаин, совершили значительно большее количество ошибок, чем контрольные животные, и затратили большее количество времени на прохождение тестов. Наблюдаемые различия можно объяснить тем, что хроническое введение уабаина может вызывать нарушение способности держать равновесие и совершать точные движения. Данные тесты используются для оценки широкого спектра моторных нарушений, в том числе в моделях паркинсонизма [36, 37]. Ранее было показано, что однократное введение уабаина грызунам вызывает мание-подобное поведение [16]. Однако подобные нарушения не наблюдаются в моделях мании на животных [38], что свидетельствует о возникновении функциональных либо органических нарушений дофаминергической системы в ответ на многократное введение нетоксической дозы уабаина.

Поскольку однократное введение уабаина вызывало увеличение двигательной активности и стереотипичности передвижений животных, опосредованных активацией D2-зависимых внутриклеточных сигнальных каскадов [16], было проведено исследование воздействия 4-дневного ICV-введения уабаина на моторику и двигательную активность животных, а также активацию дофаминзависимых внутриклеточных сигнальных каскадов. Через 1 сут после 4-го введения уабаина двигательная активность, а также стереотипичность передвижений животных, получавших уабаин, в «открытом поле» была выше, чем соответствующие показатели животных контрольной группы, чего не наблюдалось при однократном введении [16].

Существует ряд исследований, свидетельствующих о том, что в низких концентрациях КТС способны приводить к повышению активности Na^+, K^+ -АТФазы [3, 4]. Было показано, что Na^+, K^+ -АТФаза присутствует на мембране в тетрамерных комплексах, и при связывании уабаина с одним из ферментов данные комплексы распадаются [4]. Распад комплекса приводит к высвобождению ферментов и их активации, таким образом увеличивая общую наблюдаемую активность Na^+, K^+ -АТФазы в клетке. Наблюдаемое повышение активности Na^+, K^+ -АТФазы в стриатуме через 10 мин после ICV-введения уабаина свидетельствует о том, что до стриатума доходят низкие концентрации уабаина, которые способны вызывать изменения в сигнальной функции Na^+, K^+ -АТФазы, однако при этом не вызывают снижения её активности. Наблюдаемое увеличение активности может также быть опосредовано другими механизмами, в том числе встраиванием в мембрану депонированного белка. Напротив, наблюдаемое снижение активности в стволе мозга через 30 мин после введения косвенно указывает на высокие концентрации уабаина в данной структуре. Однако без масс-спектрометрического определения количества КТС непосредственно в образцах мозга невозможно сделать вывод о том, какие концентрации КТС доходят до тех или иных структур. Можно предположить, что для достижения тех же эффектов в мозге человека потребовались бы значительно меньшие концентрации КТС,

чем в данном эксперименте, поскольку как $\alpha 1$ -, так и $\alpha 2$ -, $\alpha 3$ -изоформы Na^+, K^+ -АТФазы у человека на 1–2 порядка (по данным разных исследований) более чувствительны к уабаину, чем у мыши [39, 40].

На основе повышения активности Na^+, K^+ -АТФазы в стриатуме можно сделать предположение о том, что при ICV-введении в стриатуме уабаин находится в низких концентрациях и влияет на сигнальную функцию Na^+, K^+ -АТФазы. Известно, что мание-подобное поведение, наблюдаемое у мышей после однократного введения уабаина, сопровождается активацией киназ ERK 1/2 и Akt [16], а также что запуск данных каскадов осуществляется через активацию D2-дофаминовых рецепторов. Можно предположить, что снижение активности Akt с последующей активацией киназы GSK3 β происходит вследствие активации более медленного β -аррестинового пути [34].

Высокие концентрации КТС способны вызывать неспецифичную гибель клеток путём активации сигнальных каскадов, приводящих к апоптозу [41]. Для исключения данного процесса были оценены уровни содержания как антиапоптотических (Bcl-2, Bcl-xL), так и проапоптотических (Bax, Bak) белков в стриатуме экспериментальных животных. Отсутствие достоверных изменений в количестве белка свидетельствует о том, что концентрации КТС, используемые в данной работе, не вызывали запуска неспецифичного митохондриального пути апоптоза.

Снижение количества NR2B-субъединицы NMDA-рецептора в стриатуме после 4-дневного введения 50 мкМ уабаина мышам согласуется с ранее полученными данными на первичной культуре клеток мозжечка крысы [35]. Данный эффект может объяснять полученные ранее другими исследователями данные об ухудшении пространственной памяти у крыс при ICV-введении уабаина [15], поскольку NR2B-субъединица важна для процессов формирования памяти [42, 43]. Отсутствие влияния введения уабаина на количество $\alpha 1$ - и $\alpha 3$ -изоформ Na^+, K^+ -АТФазы свидетельствует о том, что долговременные физиологические эффекты введения уабаина не связаны с изменением общего количества Na^+, K^+ -АТФазы.

Заключение

Четырёхдневное ICV-введение 50 мкМ уабаина мышам линии C57Bl/6 вызывает гиперлокомоцию, сохраняющуюся на 5-й день эксперимента и сопровождающуюся нарушением координации движений. Наблюдаемые изменения в поведении обусловлены изменениями в дофаминергической передаче, предположительно с запуском медленного β -аррестинового пути, и снижением активности Na^+, K^+ -АТФазы в стволе мозга. В стриатуме, напротив, наблюдается повышение её активности.

Представленные в данном исследовании результаты показывают, что хроническое воздействие КТС на Na^+, K^+ -АТФазу ЦНС приводит к функциональным нарушениям работы дофаминергической системы, а также открывают перспективу фармакологического воздействия на функции Na^+, K^+ -АТФазы для коррекции данных нарушений.

Список источников / References

- Ogawa H., Shinoda T., Cornelius F., Toyoshima C. Crystal structure of the sodium-potassium pump (Na^+ , K^+ -ATPase) with bound potassium and ouabain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2009;106:13742–13747. DOI: 10.1073/pnas.0907054106
- Лопачев А.В., Лопачева О.М., Никифорова К.А. и др. Сравнительное действие кардиотонических стероидов на внутриклеточные процессы в корковых нейронах крыс. *Биохимия*. 2018;83:140–151. Lopachev A.V., Lopacheva O.M., Nikiforova K.A. et al. Comparative action of cardiotonic steroids on intracellular processes in rat cortical neurons. *Biochemistry*. 2018;83:140–151. DOI: 10.1134/S0006297918020062
- Тверской А.М., Сидоренко С.В., Климанова Е.А. и др. Влияние убаина на пролиферацию эндотелиальных клеток человека коррелирует с активностью Na^+ , K^+ -АТФазы и внутриклеточным соотношением Na^+ и K^+ . *Биохимия*. 2016;81:876–883. Tverskoi A.M., Sidorenko S.V., Klimanova E.A. et al. Effects of ouabain on proliferation of human endothelial cells correlate with Na^+ , K^+ -ATPase activity and intracellular ratio of Na^+ and K^+ . *Biochemistry*. 2016;81:876–883. DOI: 10.1134/S0006297916080083
- Song H., Karashima E., Hamlyn J.M., Blaustein M.P. Ouabain-digoxin antagonism in rat arteries and neurons. *J. Physiol.* 2014;592:941–969. DOI: 10.1113/jphysiol.2013.266866
- Lingrel J.B., Argüello J.M., Van Huysse J., Kuntzweiler T.A. Cation and cardiac glycoside binding sites of the Na , K -ATPase. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1997;834:194–206. DOI: 10.1111/j.1749-6632.1997.tb52251.x
- McGrail K.M., Phillips J.M., Swadner K.J. Immunofluorescent localization of three Na , K -ATPase isozymes in the rat central nervous system: both neurons and glia can express more than one Na , K -ATPase. *J. Neurosci.* 1991;11:381–391. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.11-02-00381.1991
- Лопачев А.В., Лопачева О.М., Осипова Е.А. и др. Индуцированные убаином изменения фосфорилирования MAP-киназы в первичной культуре клеток мозжечка крыс. *Биохимическая функция клетки*. 2016;34:367–377. Lopachev A.V., Lopacheva O.M., Osipova E.A. et al. Ouabain-induced changes in MAP kinase phosphorylation in primary culture of rat cerebellar cells. *Cell Biochem. Funct.* 2016;34: 367–377. DOI: 10.1002/cbf.3199
- Антонов С.М., Кривой И.И., Драбкина Т.М. и др. Нейропротекторный эффект экспрессии убаина и пептида Bcl-2 при гиперактивации NMDA-рецепторов в нейронах коры головного мозга крыс *in vitro*. *Доклады биологических наук*. 2009;426:207–209. Antonov S.M., Krivoi I.I., Drabkina T.M. et al. Neuroprotective effect of ouabain and Bcl-2 peptide expression during hyperactivation of NMDA receptors in rat brain cortical neurons *in vitro*. *Dokl. Biol. Sci.* 2009;426:207–209. DOI: 10.1134/s0012496609030041
- Sibarov D.A., Bolshakov A.E., Abushik P.A. et al. Na^+ , K^+ -ATPase functionally interacts with the plasma membrane Na^+ , Ca^{2+} exchanger to prevent Ca^{2+} overload and neuronal apoptosis in excitotoxic stress. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2012;343(3):596–607. DOI: 10.1124/jpet.112.198341
- Kapeliou C.J., Lund L.H., Benson L. et al. Digoxin use in contemporary heart failure with reduced ejection fraction: an analysis from the Swedish Heart Failure Registry. *Eur. Heart J. Cardiovasc. Pharmacother.* 2022;8:756–767. DOI: 10.1093/ehjcvp/pvab079
- Bagrov A.Y., Shapiro J.L., Fedorova O.V. Endogenous cardiotonic steroids: physiology, pharmacology, and novel therapeutic targets. *Pharmacol. Rev.* 2009;61:9–38. DOI: 10.1124/pr.108.000711
- el-Mallakh R.S., Hedges S., Casey D. Digoxin encephalopathy presenting as mood disturbance. *J. Clin. Psychopharmacol.* 1995;15:82–83. DOI: 10.1097/00004714-199502000-00013
- Piemonti L., Monti P., Allavena P. et al. Glucocorticoids affect human dendritic cell differentiation and maturation. *J. Immunol.* 1999;162:6473–6481.
- el-Mallakh R.S., Harrison L.T., Li R. et al. An animal model for mania: preliminary results. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry.* 1995;19:955–962. DOI: 10.1016/0278-5846(95)00123-d
- Valvassori S.S., Dal-Pont G.C., Resende W.R. et al. Validation of the animal model of bipolar disorder induced by Ouabain: face, construct and predictive perspectives. *Transl. Psychiatry.* 2019;9:158. DOI: 10.1038/s41398-019-0494-6
- Lopachev A., Volnova A., Evdokimenko A. et al. Intracerebroventricular injection of ouabain causes mania-like behavior in mice through D2 receptor activation. *Sci. Rep.* 2019;9:15627. DOI: 10.1038/s41598-019-52058-z
- Kurup R.K., Kurup P.A. Hypothalamic digoxin-mediated model for Parkinson's disease. *Int. J. Neurosci.* 2003;113:515–536. DOI: 10.1080/00207450390162263
- Sun Y., Dong Z., Khodabakhsh H. et al. Zebrafish chemical screening reveals the impairment of dopaminergic neuronal survival by cardiac glycosides. *PLoS One.* 2012;7:e35645. DOI: 10.1371/journal.pone.0035645
- Lichtstein D., Ilani A., Rosen H. et al. Na^+ , K^+ -ATPase signaling and bipolar disorder. *Int. J. Mol. Sci.* 2018;19(8):2314. DOI: 10.3390/ijms19082314
- Kulich S.M., Chu C.T. Sustained extracellular signal-regulated kinase activation by 6-hydroxydopamine: implications for Parkinson's disease. *J. Neurochem.* 2001;77(4):1058–1066. DOI: 10.1046/j.1471-4159.2001.00304.x
- Fu J.F., Klyuzhin I., McKenzie J. et al. Joint pattern analysis applied to PET DAT and VMAT2 imaging reveals new insights into Parkinson's disease induced presynaptic alterations. *Neuroimage Clin.* 2019;23:101856. DOI: 10.1016/j.nicl.2019.101856
- Gustafsson H., Nordström A., Nordström P. Depression and subsequent risk of Parkinson disease: A nationwide cohort study. *Neurology.* 2015;84:2422–2429. DOI: 10.1212/WNL.0000000000001684
- Huang M.H., Cheng C.M., Huang K.L. et al. Bipolar disorder and risk of Parkinson disease: A nationwide longitudinal study. *Neurology.* 2019;92:e2735–e2742. DOI: 10.1212/WNL.0000000000007649
- Faustino P.R., Duarte G.S., Chendo I. et al. Risk of developing Parkinson disease in bipolar disorder: a systematic review and meta-analysis. *JAMA Neurol.* 2020;77:192–198. DOI: 10.1001/jamaneurol.2019.3446
- Fan H.C., Chang Y.K., Tsai J.D. et al. The association between Parkinson's disease and attention-deficit hyperactivity disorder. *Cell Transplant.* 2020;29:963689720947416. DOI: 10.1177/0963689720947416
- Mulvihill K.G. Presynaptic regulation of dopamine release: role of the DAT and VMAT2 transporters. *Neurochem. Int.* 2019;122:94–105. DOI: 10.1016/j.neuint.2018.11.004
- Goldstein D.S., Sullivan P., Holmes C. et al. Determinants of buildup of the toxic dopamine metabolite DOPAL in Parkinson's disease. *J. Neurochem.* 2013;126:591–603. DOI: 10.1111/jnc.12345
- Sbodio J.I., Snyder S.H., Paul B.D. Redox mechanisms in neurodegeneration: from disease outcomes to therapeutic opportunities. *Antioxid. Redox Signal.* 2019;30:1450–1499. DOI: 10.1089/ars.2017.7321
- Ng J., Zhen J., Meyer E. et al. Dopamine transporter deficiency syndrome: phenotypic spectrum from infancy to adulthood. *Brain.* 2014;137:1107–1119. DOI: 10.1093/brain/awu022
- Jennings D., Siderowf A., Stern M. et al. Conversion to Parkinson disease in the PARS hypomic and dopamine transporter-deficient prodromal cohort. *JAMA Neurol.* 2017;74:933–940. DOI: 10.1001/jamaneurol.2017.0985
- Pregeljc D., Teodorescu-Perijoc D., Vianello R. et al. How important is the use of cocaine and amphetamines in the development of Parkinson disease? A computational study. *Neurotox. Res.* 2020;37:724–731. DOI: 10.1007/s12640-019-00149-0
- Ferreira C., Almeida C., Tenreiro S., Quintas A. Neuroprotection or neurotoxicity of illicit drugs on Parkinson's disease. *Life.* 2020;10(6):86. DOI: 10.3390/life10060086
- Kazanskaya R.B., Lopachev A.V., Fedorova T.N. et al. A low-cost and customizable alternative for commercial implantable cannula for intracerebral administration in mice. *HardwareX.* 2020;8:e00120. DOI: 10.1016/j.ohx.2020.e00120
- Beaulieu J.M., Gainetdinov R.R. The physiology, signaling, and pharmacology of dopamine receptors. *Pharmacol. Rev.* 2011;63:182–217. DOI: 10.1124/pr.110.02642
- Akkuratov E.E., Lopacheva O.M., Kruusmägi M. et al. Functional interaction between Na/K -ATPase and NMDA receptor in cerebellar neurons. *Mol. Neurobiol.* 2015;52:1726–1734. DOI: 10.1007/s12035-014-8975-3
- Metz G.A., Whishaw I.Q. The ladder rung walking task: a scoring system and its practical application. *J. Vis. Exp.* 2009;(28):1204. DOI: 10.3791/1204
- Prasad E.M., Hung S.Y. Behavioral tests in neurotoxin-induced animal models of Parkinson's disease. *Antioxid. Redox Signal.* 2020;9:1007. DOI: 10.3390/antiox9101007
- Young J.W., Henry B.L., Geyer M.A. Predictive animal models of mania: hits, misses and future directions. *Br. J. Pharmacol.* 2011;164:1263–1284. DOI: 10.1111/j.1476-5381.2011.01318.x
- Wang J., Velotta J.B., McDonough A.A., Farley R.A. All human Na^+ - K^+ -ATPase alpha-subunit isoforms have a similar affinity for cardiac glycosides. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2001;281:C1336–C1343. DOI: 10.1152/ajpcell.2001.281.4.C1336
- Gable M.E., Ellis L., Fedorova O.V. et al. Comparison of digitalis sensitivities of Na/K -ATPases from human and pig kidneys. *ACS Omega.* 2017;2(7):3610–3615. DOI: 10.1021/acsomega.7b00591
- Kulich S.M., Chu C.T. Sustained extracellular signal-regulated kinase activation by 6-hydroxydopamine: implications for Parkinson's disease. *J. Neurochem.* 2001;77:1058–1066. DOI: 10.1046/j.1471-4159.2001.00304.x
- Zhao M.G., Toyoda H., Lee Y.S. et al. Roles of NMDA NR2B subtype receptor in prefrontal long-term potentiation and contextual fear memory. *Neuron.* 2005;47:859–872. DOI: 10.1016/j.neuron.2005.08.014
- Monaco S.A., Gulchina Y., Gao W.J. NR2B subunit in the prefrontal cortex: a double-edged sword for working memory function and psychiatric disorders. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 2015;56:127–138. DOI: 10.1016/j.neubiorev.2015.06.022

Информация об авторах

Тимошина Юлия Анатольевна — аспирант, кафедра высшей нервной деятельности биологического факультета ФГБОУ ВО «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова», Москва, Россия; м.н.с. лаб. экспериментальной и трансляционной нейробиологии Института мозга ФГБНУ «Научный центр неврологии», Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-0546-8767>

Казанская Рогнеда Борисовна — аспирант биологического факультета ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет», Санкт-Петербург, Россия; лаборант-исследователь лаборатории экспериментальной и трансляционной нейробиологии Института мозга ФГБНУ «Научный центр неврологии», Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-2194-6749>

Завьялов Владислав Андреевич — аспирант, лаборант лаборатории нейробиологии и молекулярной фармакологии Института трансляционной биомедицины ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет», Санкт-Петербург, Россия, <https://orcid.org/0009-0000-6576-3373>

Вольнова Анна Борисовна — д.б.н., с.н.с. каф. общей физиологии биологического факультета ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет», Санкт-Петербург, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-0724-887X>

Латанов Александр Васильевич — д.б.н., проф., зав. каф. высшей нервной деятельности биологического факультета ФГБОУ ВО «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова», Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-2729-4013>

Федорова Татьяна Николаевна — д.б.н., г.н.с., зав. лаб. экспериментальной и трансляционной нейробиологии Института мозга ФГБНУ «Научный центр неврологии», Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-0483-1640>

Гайнетдинов Рауль Радикович — к.м.н., зав. лаб. нейробиологии и молекулярной фармакологии, научный руководитель Клиники высоких медицинских технологий им. Н.И. Пирогова, директор Института трансляционной биомедицины ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет», Санкт-Петербург, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-2951-6038>

Лопачев Александр Васильевич — к.б.н., н.с., лаб. экспериментальной и трансляционной нейробиологии Института мозга ФГБНУ «Научный центр неврологии», Москва, Россия; н.с. лаб. нейробиологии и молекулярной фармакологии, ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет», Санкт-Петербург, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-5688-3899>

Вклад авторов. Все авторы внесли существенный вклад в разработку концепции, проведение исследования и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию перед публикацией.

Information about the authors

Yulia A. Timoshina — postgraduate student, Department of higher nervous activity, Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia; junior researcher, Laboratory of experimental and translational neurochemistry, Brain Science Institute, Research Center of Neurology, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-0546-8767>

Rogneda B. Kazanskaya — postgraduate student, Faculty of biology, Saint Petersburg State University, St. Petersburg, Russia; research laboratory assistant, Laboratory of experimental and translational neurochemistry, Brain Science Institute, Research Center of Neurology, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-2194-6749>

Vladislav A. Zaviyalov — graduate student, laboratory assistant, Laboratory of neurobiology and molecular pharmacology, Institute of Translational Biomedicine, Saint Petersburg State University, St. Petersburg, Russia, <https://orcid.org/0009-0000-6576-3373>

Anna B. Volnova — D. Sci. (Biol.), senior researcher, Department of general physiology, Biological department, Saint Petersburg State University, St. Petersburg, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-0724-887X>

Alexander V. Latanov — D. Sci. (Biol.), Prof., Head, Department of higher nervous activity, Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-2729-4013>

Tatiana N. Fedorova — D. Sci. (Biol.), Head, Laboratory of experimental and translational neurochemistry, Brain Science Institute, Research Center of Neurology, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-0483-1640>

Raul R. Gainetdinov — Cand. Sci. (Med.), Head, Laboratory of neurobiology and molecular pharmacology, Scientific director, Clinic of high medical technologies named after N.I. Pirogov, Director, Institute of Translational Biomedicine, Saint Petersburg State University, St. Petersburg, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-2951-6038>

Alexander V. Lopachev — Cand. Sci. (Biol.), researcher, Laboratory of experimental and translational neurochemistry, Brain Science Institute, Research Center of Neurology, Moscow, Russia; researcher, Laboratory of neurobiology and molecular pharmacology, Saint Petersburg State University, St. Petersburg, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-5688-3899>

Author contribution. All authors made a substantial contribution to the conception of the work, acquisition, analysis, interpretation of data for the work, drafting and revising the work, final approval of the version to be published.