

Київський національний університет імені Тараса Шевченка  
Міністерство освіти і науки України  
Київський національний університет імені Тараса Шевченка  
Міністерство освіти і науки України

Кваліфікаційна наукова  
праця на правах рукопису

**СТЕЦЬКА ВІКТОРІЯ ОЛЕКСАНДРІВНА**

УДК 612.3;616.009;616-002;616-091;616-092

**ДИСЕРТАЦІЯ**  
**РОЛЬ TRPV4 ТА TRPM8 ІОННИХ КАНАЛІВ В ПОРУШЕННЯХ**  
**СЕКРЕТОМОТОРНОЇ ФУНКЦІЇ КИШЕЧНИКА ЗА**  
**ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ПАРКІНСОНІЗМУ**

Спеціальність – 091-Біологія

Галузь знань – 09-Біологія

Подається на здобуття наукового ступеня доктора філософії в галузі біології

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

\_\_\_\_\_ В.О. Стецька

Науковий керівник:

Толстонова Ганна Миколаївна, доктор біологічних наук, професор



Київ – 2022

## АНОТАЦІЯ

**Стецька В.О. «Роль TRPV4 та TRPM8 іонних каналів в порушеннях секретомоторної функції кишечника за експериментального паркінсонізму».**  
– Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю 091 «Біологія» (09 – Біологія) – Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, 2022.

Хвороба Паркінсона (ХП) — це нейродегенеративне захворювання, що характеризується втратою дофамінергічних (DA) нейронів в *substantia nigra pars compacta* (SNpc) та відкладенням інтранейрональних агрегатів  $\alpha$ -синуклеїну. Середньорічна захворюваність у світі становить 160 осіб на 100 000 населення. Однією з основних ознак захворювання є недостатність продукування дофаміну в базальних гангліях і розвиток ДОФА-дефіцитного нейромедіаторного дисбалансу. Одним із основних патологічних чинників ХП вважається оксидативний стрес, який призводить до дисфункції мітохондрій у мозку хворих з наступною активацією клітин нейроглії та лейкоцитарною інфільтрацією і, як наслідок, до агрегації  $\alpha$ -синуклеїну та дегенерації DA нейронів.

Розлади з боку шлунково-кишкового тракту (ШКТ), зокрема закрепи, порушення евакуаторної функції шлунку, складу мікробіоти кишечника та інтегративної цілісності кишкового бар'єру є одним із серйозних супутніх наслідків розвитку ХП і відносяться до так званих немоторних симптомів (НМС) ХП. Більшість НМС фіксуються в 65% хворих і можуть проявлятися ще за 20 років до початку класичних моторних симптомів ХП, що робить їх привабливими мішенями для розробки методів профілактики та/або сповільнення розвитку ХП. Лікування ХП в основному зосереджується на зменшенні моторних симптомів хвороби. Тому пошук нових терапевтичних засобів для полегшення НМС залишається актуальним.

Родина каналів транзитного рецепторного потенціалу (TRP) являє собою групу збуджувальних катіонних каналів, котрі діють як датчики (сенсори) хімічних,

термічних і механічних подразників. Близько 20 із 28 членів родини TRP іонних каналів, описаних у ссавців, експресуються нейронами та іншими клітинами ШКТ та відіграють важливу роль у регуляції моторики, транспорту іонів через епітелій кишечника, кровотоку та гомеостазі слизової оболонки, опосередковуючи підвищення внутрішньоклітинної концентрації  $[Ca^{2+}]_i$  у відповідь на різні стимули. В останні роки все більше з'являється інформації про взаємозв'язок нейродегенеративних хвороб (у тому числі і ХП) із функціонуванням TRP родини іонних каналів і це нашоє на думку про можливу участь окремих типів TRP іонних каналів у патогенезі НМС за ХП, зокрема розладів ШКТ.

Підродина TRPV присутня у м'єнтеральних та/або вісцеральних аферентних волокнах, а також в епітелії ШКТ. Встановлена їх роль у регуляції перистальтики та секреції кишечника. Зокрема, TRPV4 беруть участь у патогенезі запалення, гіперчутливості та порушенні бар'єрної функції ШКТ. Активація TRPV4 каналів пригнічує скоротливу активність товстої кишки та затримує дефекацію у мишей.

Особливу зацікавленість з точки зору патогенезу та способів лікування НМС при ХП викликає також підродина TRPM каналів. Зокрема, порушення функціонування TRPM8 пов'язане з розвитком запальних процесів в організмі, а також пригніченням скоротливої активності кишечника.

Наведені дані щодо ролі TRPV4 та TRPM8 іонних каналів свідчить на користь їх ролі, як потенційних молекулярних мішеней кишечних розладів за ХП.

Прогрес у розумінні патогенезу будь-якого захворювання більшою мірою залежить від наявності, максимально наближеної до клінічної, моделі захворювання. На сьогоднішній день існують як генетично-детермінові так і хімічно-індуковані моделі ХП, проте відомості щодо особливостей функціонування ШКТ, у тому числі в динаміці розвитку ХП, системно не досліджувалися.

Тому метою дисертаційного дослідження було встановлення релевантної моделі ХП для вивчення механізмів порушення моторно-евакуаторної і бар'єрної функції кишечника та ролі TRPV4 й TRPM8 іонних каналів у них.

Для виконання роботи використовували наступні методи дослідження: стереотаксичні операції для моделювання ХП, поведінкові тести (апоморфіновий тест, Open field, Pole тест), аналіз тканинного та субклітинного патернів експресії рецепторів (вестерн-блот, імуногістохімія), фізіологічні методи (секреторна та бар'єрна функція кишечника за допомогою камери Уссінга, скоротлива функція кишечника методом тензометрії, балонографії), визначення мікробіоти (метод бактеріологічних посівів), біохімічні методи, методи варіаційної статистики.

Ми вперше комплексно дослідили та співставили показники НМС (моторно-евакуаторну функцію ШКТ, харчову та питну поведінку, зміни просвітної мікробіоти) із ступенем нейродегенеративних порушень, поведінкових і локомоторних реакцій на широкозастосовуваних моделях експериментального паркінсонізму у щурів, викликаних одноразовим стереотаксичним введенням 6-ОНДА (6-гідроксидофамін, 12 мкг; координати: AP = -2,2; ML = 1,5; DV = 8,8.) та LPS (Lipopolysaccharides з *Escherichia coli* O111:B4, 10 мкг; координати: AP=-5,3; ML=±2,0; DV=-7,2) *in vivo*. У нашому дослідженні було показано, що щури з LPS-ХП мають менш виражену обертальну поведінку у відповідь на дію апоморфіну в порівнянні з 6-ОНДА моделю ХП. Зменшення обсягів споживання води та їжі у тварин з 6-ОНДА-індукованою хворобою асоціювався зі зниженням вмісту води у фекаліях. Навпаки у щурів з LPS-індукованою ХП вміст води у фекаліях був вищий за показники контрольної групи. Закреп є найпоширенішим шлунково-кишковим симптомом при ХП, який зустрічається у 80-90% випадків. У щурів з 6-ОНДА-індукованим паркінсонізмом швидкість проходження кишкового транзиту через травний канал становила  $624,3 \pm 51,51$  хв, що на 26 % повільніше ( $P < 0,05$ ) порівняно з контрольною групою ( $498,7 \pm 37,96$  хв). У тварин з LPS-ХП спостерігали навпаки прискорення транзиту на 15% ( $407,3 \pm 52,69$  хв.,  $P < 0,05$ ). Прискорена швидкість транзиту в щурів з LPS-ХП супроводжувалась вірогідним зниженням числа *Bifidobacterium sp.* та *Lactobacillus sp.* і збільшенням умовно-патогенних ентеробактерій у складі просвітної мікробіоти. У щурів з 6-ОНДА-ХП, на відміну від щурів з LPS-ХП, спостерігалось вірогідне зниження стимульованої-карбахоліном моторної функції товстої кишки.

Враховуючи той факт, що миші, є широко використовуваним видом тварин для генетичного моделювання та доклінічних досліджень нових фармпрепаратів, нами вперше досліджено моторно-евакуаторну функцію ШКТ, з використанням ротенонової моделі ХП у мишей лінії BALB-c (ротенон 2,5 мг/кг, 28 днів, *i.p.*). Встановлено, що з розвитком поведінкових і локомоторних симптомів ротенон-викликаної ХП у мишей, спостерігається вірогідне пригнічення моторно-евакуаторної функції травного каналу.

Таким чином, нами вперше показано, що за LPS- і 6-OHDA-модельованої ХП у щурів та ротенонової моделі ХП у мишей, спостерігаються функціональні розлади секретомоторної функції ШКТ, проте напрям розладів саме за 6-OHDA-моделі у щурів та ротенонової моделі ХП у мишей відповідає клінічному перебігу ХП.

ХП є хронічним захворюванням, тому для більш глибокої характеристики 6-OHDA-викликаної ХП у щурів, ми дослідили як будуть змінюватися поведінкові та локомоторні реакції, моторно-евакуаторна функція ШКТ, склад мікробіоти та бар'єрна функція товстої кишки щурів у двох точках, через 1 і 7 місяців після одноразового стереотаксичного введення 6-OHDA. Слід відзначити, що через 7 місяців після моделювання 6-OHDA-ХП показники поведінкових та локомоторних реакції в Open field тесті ставали менш виразними в порівнянні з показниками на 1-й місяць після введення 6-OHDA. Через 7 місяців у щурів збільшувалася маса тіла, причому щури з 6-OHDA-ХП набирали більше маси тіла, ніж відповідна група плацебо, що супроводжувалося споживанням більшої кількості їжі на день. Проте, щури з 6-OHDA-ХП вживали менший об'єм води, а також мали повільнішу швидкість кишкового транзиту в порівнянні з відповідною групою плацебо. Затримка кишкового транзиту у щурів із 6-OHDA-індукованим паркінсонізмом, з часом призводила до змін провітної мікробіоти ШКТ, зокрема збільшення кількості лактозопозитивної *E.coli* та зникнення лактозонегативної *E.coli*. У віддалені терміни після ініціювання 6-OHDA-індукованого паркінсонізму (через 7 місяців) спостерігалось порушення бар'єрної функції епітеліального шару кишечника, що проявлялося якісними змінами глікопротеїнів слизу. Отже, ми

вперше встановили, що за 6-OHDA-індукованої ХП у щурів, розлади з боку ШКТ відтворюються навіть у віддаленні терміни після моделювання захворювання, що стало підставою обрання даної моделі для дослідження ролі TRPV4 та TRPM8 іонних каналів в механізмах порушення функції ШКТ за ХП.

Наступним етапом роботи було вивчення молекулярних механізмів порушення функції ШКТ у віддаленні терміни 6-OHDA-індукованого паркінсонізму у щурів, а саме експресії тирозингідроксилази (ТН), а також експресії TRPV4 та TRPM8 іонних каналів у товстій кишці щурів.

Дослідження інтенсивності забарвлення протеїнів імуногістохімічним методом та їх рівня експресії вестерн-блот аналізом у товстій кишці щурів з 6-OHDA-індукованим паркінсонізмом показало 2-кратне зменшення рівня ТН, зникнення TRPM8 іонних каналів і 2-кратне збільшення TRPV4 іонних каналів у товстій кишці щурів. ТН-, TRPV4- та TRPM-позитивне забарвлення локалізувалося апікально на епітеліоцитах товстої кишки щурів. Причому у віддаленні терміни через 7 місяців після моделювання 6-OHDA-ХП ці показники не відновлювалися. Зниження рівня ферменту ТН, який є лімітуючим ферментом синтезу дофаміну одночасно в середньому мозку і в товстій кишці за 6-OHDA-індукованого паркінсонізму у щурів, свідчить на користь центральної природи шлунково-кишкових розладів у патогенезі ХП.

Далі ми дослідили роль TRPV4 та TRPM8 іонних каналів у скоротливій функції товстої кишки щурів з 6-OHDA-індукованим ХП. Для оптимально-ефективного використання фармакологічних речовин, нами був модифікований метод баланографії *in vivo* для дослідження скоротливої активності ізольованої ділянки товстої кишки *in vitro* та встановлена відповідність досліджуваних показників умовам *in vivo*.

Рухливість ШКТ є результатом скоординованих скорочень м'язової оболонки. GSK1016790A є селективним і потужним агоністом TRPV4, який широко використовується для вивчення фізіологічної функції TRPV4 *in vitro* та *in vivo*. У нашому дослідженні на 1 місяць експерименту максимальний пік скорочення після стимуляції 1 мкМ карбахоліном ізольованого відрізка товстої кишки плацебо-

оперованих щурів становив  $42,14 \pm 7,79$  см.вод.ст., що на 14% більше, ніж у щурів за 6-OHDA моделі ХП ( $36,13 \pm 8,63$  см.вод.ст.). Активація TRPV4 селективним агоністом GSK1016790A (0,3 мкМ) призводила до вірогідного зниження максимального піку скорочення та зменшення площі скорочення ізольованої ділянки товстої кишки.

Цей пригнічувальний ефект GSK1016790A був навіть більш виразним у щурів з 6-OHDA-ХП у порівнянні з контрольною групою. Для підтвердження даного ефекту ролі TRPV4 іонних каналів у регуляції моторної функції товстої кишки з 6-OHDA-ХП, ми застосували метод тензометричного визначення скоротливої активності ізольованих гладеньком'язових препаратів товстої кишки. Додавання GSK1016790A призводило до більш глибокого пригнічення КСІ-стимульованої скоротливої активності гладеньком'язових препаратів товстої кишки щурів з 6-OHDA-ХП у порівнянні з групою плацебо.

В експерименті на ізольованому відрізку товстої кишки плацебо-оперованих щурів, активація TRPM8 каналів ментолом (100 мкМ) на фоні дії карбахоліну не призводила до змін в максимальному піці скорочення, а також площі під кривою, що репрезентує індекс моторної активності. Аналогічний ефект спостерігався у щурів з 6-OHDA-ХП. Цікаво, що за реєстрації ізометричного скорочення смужок гладеньких м'язів товстої кишки методом тензометрії, коли в якості стимулятора скоротливої активності був використаний КСІ, а не агоніст холінорецепторів карбахолін, відбувалася тенденція до зниження амплітуди скорочень у щурів з 6-OHDA моделю за активації TRPM8 каналів ментолом, проте ці показники не досягали достовірної різниці.

Нами також було досліджено вплив активації TRPV4 та TRPM8 іонних каналів на транспорт іонів через епітелій товстої кишки щурів та трансепітеліальну проникність FITC-декстрану (4,0 кДа) у щурів з 6-OHDA-модельованим ХП з використанням препаратів епітелію товстої кишки в камері Усінга.

У щурів з 6-OHDA-ХП спостерігався нижчий рівень секреції іонів у відповідь на стимулювальний ефект карбахоліну (50 мкМ) в порівнянні з групою плацебо, а також тенденція до підвищення трансепітеліальної проникності. Активація TRPV4

каналів селективним агоністом GSK1016790A (0,3 мкМ) призводила до зниження базального струму короткого замикання, який зумовлений електрогенним транспортом іонів, переважно секрецією іонів Cl<sup>-</sup> та рівня відповіді на стимулюючу дію карбахоліну у плацебо-оперованих щурів. Проте у щурів з 6-ОНДА-ХП GSK1016790A (0,3 мкМ) не впливав на базальний електрогенний транспорт іонів, проте пригнічував стимулювальний ефект карбахоліну. Отримані дані свідчать про порушення TRPV4-опосередкованої регуляції транспорту іонів через епітелій товстої кишки щурів за 6-ОНДА-ХП. Цікаво, що активація TRPV4 іонних каналів збільшувала рівень трансепітеліальної проникності у щурів з 6-ОНДА-ХП.

На відміну від TRPV4 іонних каналів, введення агоністу TRPM8 іонних каналів ментолу (100 мкМ) не викликало змін у показниках базального струму короткого замикання в обох досліджуваних групах, плацебо-оперованих та 6-ОНДА-ХП, хоча, у щурів групи плацебо, попереднє введення ментолу, призводило до пригнічення стимулювального ефекту карбахоліну. У щурів з 6-ОНДА-ХП такого ефекту ми не спостерігали. Відсутність ефекту ментолу у щурів з 6-ОНДА-ХП може бути пояснена з одного боку суттєвим зниженням рівня TRPM8 протеїну в слизовій оболонці товстої кишки щурів, а з іншого порушенням TRPM8-опосередкованої регуляції в патогенезі 6-ОНДА-ХП.

Встановлені нами зміни у функціонуванні ШКТ за умов експериментального паркінсонізму свідчать на користь центрального механізму розвитку НМС при ХП. Оскільки однією з причин ХП є оксидативний стрес, який призводить до нейродегенерації DA нейронів, перспективними препаратами для лікування НМС при ХП можуть бути речовини, які одночасно володіють антиоксидантними властивостями і здатні впливати на скоротливу активність гладеньком'язових клітин. Одним із перспективних речовин, на нашу думку, є C<sub>60</sub> фулерени та їх похідні, які відомі в запобіганні перекисного окислення та руйнуванні мембран, викликаному вільними радикалами і за своєю силою не гірші за вітамін Е, який є природним антиоксидантом. Крім того, в дослідженнях на гладеньком'язових клітинах судин, показано, що C<sub>60</sub> фулерени представляють новий клас модуляторів

Ca<sup>2+</sup>-активованих-K<sup>+</sup> каналів з великою провідністю (BK<sub>Ca</sub>), що робить їх привабливими для комплексного лікування, а може й профілактики ХП.

У наших дослідженнях ми використали первинний водний розчин C<sub>60</sub> фулерену (C<sub>60</sub>FAS) з чистотою понад 99,96%, який вводили щурам *i.p.* впродовж 10 днів у дозі 0,65 мг/кг, контрольна група отримувала стерильний 0,9% фізіологічний розчин (SPS). Введення C<sub>60</sub>FAS: 1) попереджало 6-OHDA-зумовлене руйнування DA нейронів у середньому мозку, що відображалося у більшій інтенсивності забарвлення TH у середньому мозку щурів у порівнянні з групою 6-OHDA+SPS; 2) знижувало рівень тривожності у щурів з 6-OHDA-ХП; 3) покращувало харчову поведінку. Ці позитивні зміни щодо перебігу 6-OHDA-ХП, викликані введенням C<sub>60</sub>FAS, асоціювалися також із відновленням швидкості транзиту вздовж травного каналу та рівня стимульованої карбахоліном моторної активності товстої кишки щурів з 6-OHDA-ХП відносно групи 6-OHDA+SPS. Проте, тривале, впродовж 10 днів, введення C<sub>60</sub>FAS мало побічні наслідки, які були більш виразними у щурів з 6-OHDA-ХП у порівнянні з плацебо-оперованими, зокрема 1) накопичення C<sub>60</sub>FAS частинок у підшлунковій залозі; 2) підвищення фагоцитарної активності перитонеальних макрофагів; 3) легкий зсув у антиоксидантно-прооксидантній системі мозку із більш глибоким негативним впливом на систему глутатіону. Означене вище може свідчити про токсичну побічну дію C<sub>60</sub>FAS і повинно бути враховано при проведенні подальших досліджень щодо застосування C<sub>60</sub>FAS для лікування ХП.

Таким чином, у роботі було показано, що 6-OHDA, LPS та ротенонова моделі ХП супроводжуються розладами з боку ШКТ. 6-OHDA модель ХП у щурів є релевантною до клінічного перебігу ХП, а розлади з боку ШКТ відтворюються навіть у віддаленні терміни після моделювання; TRPV4 та TRPM8 іонні канали залучені в патогенезі секретомоторної функції кишечника за 6-OHDA моделі ХП у щурів, а опосередковані ними регуляторні шляхи порушені; водний розчин C<sub>60</sub>FAS є перспективним для комплексного відновлення центральних симптомів ХП та моторної функції ШКТ за ХП, проте проявляє токсичний побічний ефект на щурчій моделі 6-OHDA-ХП *in vivo*.

**Ключові слова:** хвороба Паркінсона, 6-OHDA, LPS, моторика, скорочення, іонні канали, гладенькі м'язи, оксидативний стрес, C<sub>60</sub> фулерени, наночастинки, запалення

## ABSTRACT

**Stetska V.O. "The role of TRPV4 and TRPM8 ion channels in disorders of the secretomotor function of the intestine in experimental parkinsonism".** – Qualification scientific work on the rights of the manuscript.

Dissertation for the degree of Doctor of Philosophy in the field of 09-Biology in the speciality 091–Biology. – Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, 2022.

Parkinson's disease (PD) is a neurodegenerative disease characterized by the loss of dopaminergic (DA) neurons in the *substantia nigra pars compacta* (SNpc) and the deposition of intraneuronal  $\alpha$ -synuclein aggregates. The average annual incidence in the world is 160 people per 100,000 population. One of the main symptoms of the disease is insufficient production of dopamine in the basal ganglia and the development of DOPA-deficient neurotransmitter imbalance. One of the main pathological factors of PD is considered to be oxidative stress, which leads to mitochondrial dysfunction in the brain of patients with the subsequent activation of neuroglia cells and leukocyte infiltration and, as a result, to the aggregation of  $\alpha$ -synuclein and degeneration of DA neurons.

Gastrointestinal tract disorders, in particular constipation, disruption of the evacuatory function of the stomach, the composition of the intestinal microbiota and the integrative integrity of the intestinal barrier, are one of the serious side effects of the development of PD and belong to the so-called non-motor symptoms (NMS) of PD. The majority of NMS are recorded in 65% of patients and can appear 20 years before the onset of classic motor symptoms of PD, which makes them attractive targets for the development of methods to prevent and/or slow down the development of PD. Treatment of PD mainly focuses on reducing the motor symptoms of the disease. Therefore, the search for new therapeutic agents to alleviate NMS remains relevant.

The family of transient receptor potential (TRP) channels is a group of excitatory cation channels that act as sensors of chemical, thermal, and mechanical stimuli. About 20 of the 28 members of the TRP family of ion channels described in mammals are expressed by neurons and other cells of the GI tract and play important roles in the regulation of motility, ion transport across the intestinal epithelium, blood flow, and mucosal homeostasis, mediating increases in intracellular  $[Ca^{2+}]_i$  in response to different stimuli. In recent years, more and more information has appeared about the relationship between neurodegenerative diseases (including PD) and the functioning of the TRP family of ion channels, and this suggests the possible involvement of certain types of TRP ion channels in the pathogenesis of NMS due to PD, in particular gastrointestinal disorders.

The TRPV subfamily is present in myenteric and/or visceral afferent fibers, as well as in the gastrointestinal epithelium. Their role in the regulation of peristalsis and intestinal secretion has been established. In particular, TRPV4 is involved in the pathogenesis of inflammation, hypersensitivity and disruption of the barrier function of the gastrointestinal tract. Activation of TRPV4 channels suppresses the contractile activity of the colon and delays defecation in mice.

The subfamily of TRPM channels is also of particular interest from the point of view of pathogenesis and methods of treatment of NMS in PD. In particular, TRPM8 dysfunction is associated with the development of inflammatory processes in the body, as well as inhibition of intestinal contractile activity.

The given data on the role of TRPV4 and TRPM8 ion channels are a well-founded reason for considering them as potential molecular targets of intestinal disorders in PD.

Progress in understanding the pathogenesis of any disease largely depends on the availability of a model of the disease that is as close as possible to the clinical one. To date, there are both genetically deterministic and chemically induced models of PD, but information on the peculiarities of the gastrointestinal tract functioning, including the dynamics of the development of PD, has not been systematically studied.

Therefore, the aim of the dissertation research was to establish a relevant model of PD for studying the mechanisms of impaired motor-evacuatory and barrier function of the intestine and the role of TRPV4 and TRPM8 ion channels in them.

The following research methods were used to perform the work: stereotaxic operations for PD modeling, behavioral tests (apomorphine test, Open field, Pole test), analysis of tissue and subcellular patterns of receptor expression (western blot, immunohistochemistry), physiological methods (secretory and barrier intestinal function using the Ussing chamber, contractile intestinal function by the method of tensometry, balloonography), determination of microbiota (method of bacteriological cultures), biochemical methods, methods of variational statistics.

For the first time, we comprehensively investigated and compared indicators of NMS (motor-evacuatory function of the gastrointestinal tract, eating and drinking behavior, changes in the luminal microbiota) with the degree of neurodegenerative disorders, behavioral and locomotor reactions in widely used models of experimental parkinsonism in rats caused by a single stereotaxic injection of 6-OHDA (6-hydroxydopamine, 12  $\mu$ g; coordinates: AP=-2.2; ML=1.5; DV=8.8.) and LPS (Lipopolysaccharides from *Escherichia coli* O111:B4, 10  $\mu$ g; coordinates: AP=-5.3; ML= $\pm$ 2.0; DV=-7.2) *in vivo*. In our study, it was shown that rats with LPS-PD have a less pronounced rotational behavior in response to the action of apomorphine compared to the 6-OHDA-model of PD. Decreased food and water intake in animals with 6-OHDA-induced disease was associated with decreased water content in faeces. On the contrary, in rats with LPS-induced PD, the water content in faeces was higher than that of the control group. Constipation is the most common gastrointestinal symptom in PD, occurring in 80-90% of cases. In rats with 6-OHDA-induced parkinsonism, the rate of intestinal transit through the alimentary canal was  $624.3 \pm 51.51$  min, which is 26% slower ( $P < 0.05$ ) compared to the control group ( $498.7 \pm 37.96$  min). On the contrary, transit acceleration by 15% was observed in animals with LPS-PD ( $407.3 \pm 52.69$  min,  $P < 0.05$ ). The accelerated rate of transit in rats with LPS-PD was accompanied by a probable decrease in the number of *Bifidobacterium sp.* and *Lactobacillus sp.* and an increase in opportunistic enterobacteria in the luminal microbiota. In rats with 6-OHDA-PD, in

contrast to rats with LPS-PD, a probable decrease in carbacholin-stimulated motor function of the colon was observed.

Considering the fact that mice are a widely used animal species for genetic modeling and preclinical studies of new pharmaceuticals, we first investigated the motor-evacuatory function of the gastrointestinal tract using the rotenone model of PD in BALB-c mice (rotenone 2.5 mg/kg, 28 days, *i.p.*). It was established that with the development of behavioral and locomotor symptoms of rotenone-induced PD in mice, there is a probable suppression of the motor-evacuatory function of the digestive tract.

Thus, we have shown for the first time that LPS- and 6-OHDA-modeled PD in rats and the rotenone model of PD in mice show functional disorders of the secretory-motor function of the gastrointestinal tract, but the direction of disorders is specific to the 6-OHDA model in rats and the rotenone model model of PD in mice corresponds to the clinical course of PD.

PD is a chronic disease, therefore, for a more in-depth characterization of 6-OHDA-induced PD in rats, we investigated how behavioral and locomotor reactions, motor-evacuatory function of the gastrointestinal tract, composition of microbiota and barrier function of the colon of rats will change at two points, after 1 and 7 months after a single stereotaxic injection of 6-OHDA. It should be noted that 7 months after modeling 6-OHDA-PD, the indicators of behavioral and locomotor reactions in the Open field test became less pronounced compared to the indicators on the 1<sup>st</sup> month after the introduction of 6-OHDA. After 7 months, the rats gained body weight, with the 6-OHDA-PD rats gaining more body weight than the corresponding placebo group, which was accompanied by a higher food intake per day. However, rats with 6-OHDA-PD consumed a smaller volume of water and also had a slower rate of intestinal transit compared to the corresponding placebo group. Intestinal transit delay in rats with 6-OHDA-induced parkinsonism over time led to changes in the luminal microbiota of the gastrointestinal tract, in particular, an increase in the number of lactose-positive *E.coli* and the disappearance of lactose-negative *E.coli*. In the long term after the initiation of 6-OHDA-induced parkinsonism (after 7 months), a violation of the barrier function of the intestinal epithelial layer was observed, which was manifested by qualitative changes in mucus

glycoproteins. Therefore, we established for the first time that during 6-OHDA-induced PD in rats, disorders of the gastrointestinal tract are reproduced even in distant terms after modeling the disease, which became the basis for choosing this model to study the role of TRPV4 and TRPM8 ion channels in the mechanisms of gastrointestinal tract dysfunction of PD.

The next stage of the work was the study of the molecular mechanisms of gastrointestinal tract dysfunction in the long term of 6-OHDA-induced parkinsonism in rats, namely the expression of tyrosine hydroxylase (TH), as well as the expression of TRPV4 and TRPM8 ion channels in the colon of rats.

The study of the intensity of staining by immunohistochemical method and the level of protein expression by western blot analysis in the colon of rats with 6-OHDA-induced parkinsonism showed a 2-fold decrease in TH, the disappearance of TRPM8 ion channels and a 2-fold increase in TRPV4 ion channels in the colon of rats. TH-, TRPV4- and TRPM8-positive staining was localized apically on rat colonic epitheliocytes, mainly goblet cells. Moreover, in the long term, 7 months after modeling 6-OHDA-PD, these indicators were not restored. The decrease in the level of TH enzyme, which is the limiting enzyme of dopamine synthesis simultaneously in the midbrain and in the colon during 6-OHDA-induced parkinsonism in rats, points to the central nature of gastrointestinal disorders in the pathogenesis of PD.

Next, we investigated the role of TRPV4 and TRPM8 ion channels in the contractile function of the colon of rats with 6-OHDA-induced PD. For the optimal and effective use of pharmacological substances, we modified the method of balloonography *in vivo* to study the contractile activity of an isolated section of the large intestine *in vitro* and established the correspondence of the studied indicators to the conditions *in vivo*.

The motility of the gastrointestinal tract is the result of coordinated contractions of the musculature. GSK1016790A is a selective and potent TRPV4 agonist that has been widely used to study the physiological function of TRPV4 *in vitro* and *in vivo*. In our 1-month experiment, the maximum peak contraction after stimulation with 1  $\mu$ M carbacholin per isolated colon section in placebo-operated rats was  $42.14 \pm 7.79$  cm H<sub>2</sub>O, which is 14% more than in rats under 6-OHDA-models of PD ( $36.13 \pm 8.63$  cm H<sub>2</sub>O).

Activation of TRPV4 by the selective agonist GSK1016790A (0.3  $\mu$ M) resulted in a significant decrease in the maximal peak contraction and a decrease in the contraction area of the isolated colon region. This inhibitory effect of GSK1016790A was even more pronounced in 6-OHDA-PD rats compared with the control group. To confirm this effect of the role of TRPV4 ion channels in the regulation of the motor function of the colon in rats with 6-OHDA-PD, we used the method of tensometric determination of the contractile activity of isolated smooth muscle preparations of the colon. Addition of GSK1016790A resulted in a more profound inhibition of KCl-stimulated contractile activity of colonic smooth muscle preparations of rats with 6-OHDA-PD compared to the placebo group.

In an experiment on an isolated section of the colon of placebo-operated rats, activation of TRPM8 channels by menthol (100  $\mu$ M) against the background of carbacholin action did not lead to changes in the maximum peak of the contraction, as well as the area under the curve, which represents the index of motor activity. A similar effect was observed in rats with 6-OHDA-PD. It is interesting that when recording the isometric contraction of colonic smooth muscle strips by the tensometry method, when KCl was used as a stimulator of contractile activity, and not the cholinergic receptor agonist carbacholin, there was a tendency to decrease the amplitude of contractions in rats with the 6-OHDA model under the activation of TRPM8 channels with menthol, but these indicators did not reach a significant difference.

We also investigated the effect of activation of TRPV4 and TRPM8 ion channels on ion transport across rat colonic epithelium and transepithelial permeability of FITC-dextran (4.0 kDa) in rats with 6-OHDA-induced PD using preparations of colonic epithelium in the Using chamber.

In rats with 6-OHDA-PD, a lower level of ion secretion in response to the stimulatory effect of carbacholin (50  $\mu$ M) was observed compared to the placebo group, as well as a trend towards increased transepithelial permeability. Activation of TRPV4 channels by the selective agonist GSK1016790A (0.3  $\mu$ M) led to a decrease in the basal short-circuit current, which is caused by electrogenic ion transport, mainly by the secretion of Cl<sup>-</sup> ions, and the level of response to the stimulating effect of carbacholin in

placebo-operated rats. However, in rats with 6-OHDA-PD, GSK1016790A (0.3  $\mu$ M) did not affect the basal electrogenic transport of ions, but inhibited the stimulating effect of carbacholin. The obtained data indicate a violation of TRPV4-mediated regulation of ion transport through the epithelium of the large intestine of rats under 6-OHDA-PD. Interestingly, the activation of TRPV4 ion channels increased the level of transepithelial permeability in rats with 6-OHDA-PD.

In contrast to TRPV4 ion channels, administration of TRPM8 ion channel agonist menthol (100  $\mu$ M) did not cause changes in the parameters of basal short-circuit current in both studied groups, placebo-operated and 6-OHDA-PD. Although, in rats of the placebo group, the previous administration of menthol led to inhibition of the stimulating effect of carbacholin. We did not observe such an effect in rats with 6-OHDA-PD. The lack of effect of menthol in rats with 6-OHDA-PD can be explained, on the one hand, by a significant decrease in the level of TRPM8 protein in the mucous membrane of the large intestine of rats, and on the other hand, by a violation of TRPM8-mediated regulation in the pathogenesis of 6-OHDA-PD.

We established the changes in the functioning of the gastrointestinal tract under the conditions of experimental parkinsonism testify in favor of the central mechanism of the development of NMS in PD. Since one of the causes of PD is oxidative stress, which leads to neurodegeneration of DA neurons, promising drugs for the treatment of NMS in PD may be substances that simultaneously possess anti-oxidant properties and are able to affect the contractile activity of smooth muscle cells. One of the promising substances, in our opinion, are C<sub>60</sub> fullerenes and their derivatives, which are known to prevent peroxidation and membrane damage caused by free radicals and are no worse than vitamin E, which is a natural antioxidant. In addition, in studies on vascular smooth muscle, it has been shown that C<sub>60</sub> fullerenes represent a new class of modulators of the large-conductance voltage- and Ca<sup>2+</sup>-activated- K<sup>+</sup> channels (BK<sub>Ca</sub>), which makes them attractive for complex treatment, and perhaps prevention of PD.

In our research, we used a primary water solution of C<sub>60</sub> fullerene (C<sub>60</sub>FAS) with a purity of more than 99.96%, which was administered to rats *i.p.* for 10 days at a dose of 0.65 mg/kg, the control group received sterile 0.9% saline (SPS). Administration of

C<sub>60</sub>FAS 1) prevented 6-OHDA-induced destruction of DA neurons in the midbrain, which was reflected in a higher level of TH compared to the 6-OHDA+SPS group; 2) reduced the level of anxiety in rats with 6-OHDA-PD; 3) improved eating behavior. These positive changes in the course of 6-OHDA-PD induced by C<sub>60</sub>FAS administration were also associated with the restoration of transit speed along the alimentary canal and the level of carbacholin-stimulated colonic motor activity of 6-OHDA-PD rats relative to the 6-OHDA+SPS group. However, long-term administration of C<sub>60</sub>FAS for 10 days had side effects that were more pronounced in 6-OHDA-PD rats than in placebo-operated rats, including 1) accumulation of particles in the pancreas; 2) increase in phagocytic activity of peritoneal macrophages; 3) a slight shift in the antioxidant-prooxidant system of the brain with a more profound negative effect on the glutathione system. The above may indicate a toxic side effect of C<sub>60</sub>FAS and should be taken into account in further studies on the use of C<sub>60</sub>FAS in the treatment of PD.

Thus, the paper showed that 6-OHDA-, LPS- and rotenone models of PD are accompanied by disorders from the gastrointestinal tract. The 6-OHDA model of PD in rats is relevant to the clinical course of PD, and disorders from the gastrointestinal tract are reproduced even in distant terms after modeling; TRPV4 and TRPM8 ion channels are involved in the pathogenesis of intestinal secretomotor function in the 6-OHDA model of PD in rats, and the regulatory pathways mediated by them are impaired; the aqueous solution of C<sub>60</sub>FAS is promising for the complex recovery of central symptoms of PD and the motor function of the gastrointestinal tract in PD, but it shows a toxic side effect in the rat model of 6-OHDA- PD *in vivo*.

**Keywords:** Parkinson's disease, 6-OHDA, LPS, motility, contraction, ion channels, smooth muscles, oxidative stress, C<sub>60</sub> fullerenes, nanoparticles, inflammation

## Список публікацій здобувача

### Праці, в яких опубліковані основні наукові результати дисертації:

1. **Стецька В.**, Шуставецька Н., Сергійчук Т., Довбинчук Т., Толстанова Г. Кількісний та якісний склад мікробіоти дистального відділу товстої кишки щурів у різні терміни експериментального 6-OHDA-викликаного паркінсонізму (пілотні дослідження). Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченка. Біологія. 2018; №2 (76): 26-29. *(особистий внесок здобувача - інформаційний пошук, експериментальні дослідження, статистичне опрацювання результатів, а також графічна підготовка результатів до опублікування і написання першої версії статі).*

2. **Stetska V.O.**, Moroz O.F., Dovbynchuk T.V., Tolstanova G.M., Zholos A.V. The role of TRPV4 cation channels in smooth muscle contractile activity in rats. Український журнал медицини, біології та спорту. 2020; №5 (6): 370–377. *(особистий внесок здобувача - інформаційний пошук, експериментальні дослідження, статистичне опрацювання результатів, а також графічна підготовка результатів до опублікування і написання першої версії статі).*

3. **Stetska V.O.**, Dovbynchuk T.V., Makedon Y.S., Dziubenko N.V. The effect of water-soluble pristine C60 fullerene on 6-OHDA-induced Parkinson's disease in rats. Regulatory Mechanisms in Biosystems. 2021; 12 (4): 599-607. *(особистий внесок здобувача - інформаційний пошук, експериментальні дослідження, статистичне опрацювання результатів, а також графічна підготовка результатів до опублікування і написання першої версії статі).*

4. **Stetska V.O.**, Dovbynchuk T.V., Dziubenko N.V., Zholos A.V., Tolstanova G.M. Time-dependent changes in the expression of TRPV4 and TRPM8 channels in the colon of rats with 6-OHDA-induced Parkinson's disease. Ukrainian Biochemical Journal. 2022; 94 (2): 57-65. *(особистий внесок здобувача - інформаційний пошук, експериментальні дослідження, статистичне опрацювання результатів, а*

також графічна підготовка результатів до опублікування і написання першої версії статі).

### Опубліковані праці апробаційного характеру:

1. **Стецька В.О.**, Македон Є.С., Довбинчук Т.В., Сергійчук Т.М., Толстанова Г.М. Порівняльна характеристика 6-OHDA та LPS моделей паркінсонізму. *V Всеукраїнська науково-практична конференція студентів, аспірантів та молодих вчених «Об'єднані наукою: перспективи міждисциплінарних досліджень»* 8-9 листопада, Київ, 2018. - С. 102-104.

2. **Stetska V.**, Makhotkina A., Makedon Ye., Gonchar S., Dziubenko N., Dovbynychuk T., Serhiychuk T., Tolstanova G. The early non-motor symptoms in rats with LPS-model of Parkinson's disease. *5<sup>th</sup> International Conference of Cell Biology* May 1-12, Kraków, Poland, 2019. - P. 187.

3. **Stetska V.**, Makhotkina A., Dovbynychuk T., Dziubenko N., Mahmoudi Dehcheshmeh Z., Tolstanova G. The comparative study of the earlier non-motor GI symptoms in rats with LPS- and 6-OHDA-Parkinson's disease. *EMBO Young Scientists Forum* June 27-28, Prague, Czech Republic, 2019. - P. 86.

4. Македон Є.С., **Стецька В.О.**, Довбинчук Т.В., Дзюбенко Н.В., Толстанова Г.М. Порівняльна характеристика стану кишечника щурів при 6-OHDA та LPS-модельованому паркінсонізмі. *Матеріали Міжнародної науково-практичної конференції студентів і молодих вчених «Biomed Talks - 2019»* 15-17 жовтня, Київ. - С. 82-83.

5. Makedon Ye., **Stetska V.**, Dovbynychuk T., Dziubenko N., Prylutskyu Yu., Tolstanova G. The effect of pristine C<sub>60</sub> fullerene on colonic motility in rats with 6-OHDA-induced Parkinson's disease. *63<sup>rd</sup> International conference for students of physics and natural sciences: Open Readings* March 17-20, Vilnius, Lithuania, 2020. – P. 101.

6. Tsymbaluk A., **Stetska V.**, Dovbynychuk T., Makedon Ye., Dziubenko N., Prylutsky Yu., Tolstanova G. The effect of pristine C<sub>60</sub> fullerene on cognitive dysfunctions in 6-OHDA-induced model of Parkinson's disease in rats. *63<sup>rd</sup> International conference for students of physics and natural sciences: Open Readings* March 17-20, Vilnius, Lithuania, 2020. – P. 550.

7. **Стецька В.О.**, Довбинчук Т.В., Македон Є. А., Дзюбенко Н.В., Мотузюк О.П., Гарманчук Л.В., Прилуцький Ю.І., Толстанова Г.М. Ефект С<sub>60</sub> фулерену на 6-ОНДА-індуковану хворобу Паркінсона у щурів. *VII Всеукраїнська науково-практична конференція студентів, аспірантів та молодих вчених «Об'єднати наукою: перспективи міждисциплінарних досліджень»* 12-13 листопада, Київ, 2020. - С. 156-158.

8. Tsymbaliuk A., **Stetska V.**, Dovbynychuk T., Gorbach O., Tolstanova G., Zholos A. The role of TRPV4 cation channels in smooth muscle contractile activity in rats with Parkinson's disease. *64<sup>th</sup> International conference for students of physics and natural sciences: Open Readings* March 16-19, Vilnius, Lithuania, 2021. – P. 497.

### **List of publication of the Ph.D candidate**

#### **Publication that contain the main scientific results of the dissertation:**

1. **Stetska V.**, Shustavetska N., Serhiychuk T., Dovbynychuk T., Tolstanova G. Quantitative and qualitative compOSition of the microbiota of the distal colon of rats at different times of experimental 6-OHDA-induced parkinsonism (pilot studies). *Bulletin of Taras Shevchenko Kyiv National University. Biology.* 2018; No. 2(76): 26-29. *(the applicant's personal contribution - information search, experimental research, statistical processing of the results, graphic preparation of the results for publication and writing of the first version of the article).*

2. **Stetska V.O.**, Moroz O.F., Dovbynychuk T.V., Tolstanova G.M., Zholos A.V. The role of TRPV4 cation channels in smooth muscle contractile activity in rats. *Ukrainian Journal of Medicine, Biology and Sport*. 2020; №5 (6): 370–377. *(the applicant's personal contribution - information search, experimental research, statistical processing of the results, graphic preparation of the results for publication and writing of the first version of the article)*.

3. **Stetska V.O.**, Dovbynychuk T.V., Makedon Y.S., Dziubenko N.V. The effect of water-soluble pristine C60 fullerene on 6-OHDA-induced Parkinson's disease in rats. *Regulatory Mechanisms in Biosystems*. 2021; 12 (4): 599-607. *(the applicant's personal contribution - information search, experimental research, statistical processing of the results, graphic preparation of the results for publication and writing of the first version of the article)*.

4. **Stetska V.O.**, Dovbynychuk T.V., Dziubenko N.V., Zholos A.V., Tolstanova G.M. Time-dependent changes in the expression of TRPV4 and TRPM8 channels in the colon of rats with 6-OHDA-induced Parkinson's disease. *Ukrainian Biochemical Journal*. 2022; 94 (2): 57-65. *(the applicant's personal contribution - information search, experimental research, statistical processing of the results, graphic preparation of the results for publication and writing of the first version of the article)*.

#### **Published conference papers:**

1. **Stetska V.O.**, Makedon E.S., Dovbynychuk T.V., Serhiychuk T.M., Tolstanova G.M. Comparative characteristics of 6-OHDA and LPS models of parkinsonism. *V All-Ukrainian scientific and practical conference of students, postgraduates and young scientists "United by science: perspectives of interdisciplinary research* November 8-9, Kyiv, 2018. - P. 102-104.

2. **Stetska V.**, Makhotkina A., Makedon Ye., Gonchar S., Dziubenko N., Dovbynychuk T., Serhiychuk T., Tolstanova G. The early non-motor symptoms in rats

with LPS-model of Parkinson's disease. *5<sup>th</sup> International Conference of Cell Biology* May 1-12, Kraków, Poland, 2019. - P. 187.

3. **Stetska V.**, Makhotkina A., Dovbynychuk T., Dziubenko N., Mahmoudi Dehcheshmeh Z., Tolstanova G. The comparative study of the earlier non-motor GI symptoms in rats with LPS- and 6-OHDA-Parkinson's disease. *EMBO Young Scientists Forum* June 27-28, Prague, Czech Republic, 2019. - P. 86.

4. Makedon Ye.S., **Stetska V.O.**, Dovbynychuk T.V., Dzyubenko N.V., Tolstanova G.M. Comparative characteristics of the state of the intestines of rats with 6-OHDA and LPS-simulated parkinsonism. International Scientific and Practical Conference of Students and Young Scientists "Biomed Talks - 2019" October 15-17, Kyiv, 2019. - P. 82-83.

5. Makedon Ye., **Stetska V.**, Dovbynychuk T., Dziubenko N., Prylutskyi Yu., Tolstanova G. The effect of pristine C<sub>60</sub> fullerene on colonic motility in rats with 6-OHDA-induced Parkinson's disease. *63<sup>rd</sup> International conference for students of physics and natural sciences: Open Readings* March 17-20, Vilnius, Lithuania, 2020. – P. 101.

6. Tsymbaluk A., **Stetska V.**, Dovbynychuk T., Makedon Ye., Dziubenko N., Prylutskyi Yu., Tolstanova G. The effect of pristine C<sub>60</sub> fullerene on cognitive dysfunctions in 6-OHDA-induced model of Parkinson's disease in rats. *63<sup>rd</sup> International conference for students of physics and natural sciences: Open Readings* March 17-20, Vilnius, Lithuania, 2020. – P. 550.

7. **Stetska V.O.**, Dovbynychuk T.V., Makedon E.A., Dzyubenko N.V., Motuzyuk O.P., Harmanchuk L.V., Prylutskyi Y.I., Tolstanova G.M. Effect of C<sub>60</sub> fullerene on 6-OHDA-induced Parkinson's disease in rats. *VII All-Ukrainian scientific and practical conference of students, postgraduates and young scientists "United by science: perspectives of interdisciplinary research"* November 12-13, Kyiv, 2020. - P. 156-158.

8. Tsymbaliuk A., **Stetska V.**, Dovbynychuk T., Gorbach O., Tolstanova G., Zholos A. The role of TRPV4 cation channels in smooth muscle contractile activity in rats with Parkinson's disease. *64<sup>th</sup> International conference for students of physics and natural sciences: Open Readings* March 16-19, Vilnius, Lithuania, 2021. – P. 497.

## ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ .....	29
ВСТУП .....	31
<b>РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ .....</b>	<b>37</b>
1.1. Патогенетичні зміни в організмі за розвитку хвороби Паркінсона ..	37
1.1.1. Етіологія хвороби Паркінсона .....	37
1.1.2. Оксидативний стрес як чинник розвитку хвороби Паркінсона .....	39
1.1.3. Роль імунних компонентів у патогенезі хвороби Паркінсона .....	41
1.1.4. Розлади з боку шлунково-кишкового тракту в патогенезі хвороби Паркінсона .....	43
1.2. TRP іонні канали та їх функціонування у шлунково-кишковому тракті .....	45
1.2.1. Будова, функції та локалізація TRP іонних каналів в організмі .....	46
1.2.2. Загальна характеристика TRPV4 каналів .....	47
1.2.3. Загальна характеристика TRPM8 каналів .....	49
1.2.4. Роль TRPV4 та TRPM8 іонних каналів у порушенні скоротливої функцій кишечника .....	50
1.2.5. Роль TRP іонних каналів у проникності епітеліального та ендотеліального бар'єрів кишечника .....	51
1.3. Вуглецеві наночастинки типу C <sub>60</sub> фулерени, як потенційні коректори розладів моторної функції ШКТ у терапії хвороби Паркінсона	53
<b>РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ .....</b>	<b>57</b>
2.1. Реактиви та матеріали .....	57
2.2. Експериментальні тварини .....	58
2.3. Схема експерименту .....	58
2.4. Моделювання хвороби Паркінсона на тваринних моделях .....	61
2.4.1. Моделювання 6-OHDA-індукованого паркінсонізму .....	61
2.4.2. Моделювання LPS-індукованого паркінсонізму .....	62

2.4.3. Моделювання ротенон-індукованого паркінсонізму .....	62
2.5. Поведінкові тести .....	63
2.5.1. Визначення ротаційної поведінки щурів за допомогою апоморфінового тесту .....	63
2.5.2. Визначення поведінкових реакцій за допомогою Open field тесту у щурів .....	63
2.5.3. Визначення поведінкових реакцій за допомогою Pole тесту у мишей	64
2.6. Визначення маси тіла дослідних тварин .....	65
2.7. Моніторинг харчової та питної поведінки .....	65
2.8. Визначення вмісту води у фекаліях .....	65
2.9. Вимірювання моторно-евакуаторної функції шлунково-кишкового тракту .....	66
2.9.1. Визначення кишкового транзиту водного розчину кармінового червоного у щурів .....	66
2.9.2. Визначення кишкового транзиту активованого вугілля (Charcoal) у мишей .....	66
2.9.3. Дослідження моторної активності дистального відділу товстої кишки за допомогою методу балонографії <i>in vivo</i> .....	67
2.9.4. Дослідження скоротливої активності ізольованої ділянки товстої кишки за допомогою методу балонографії <i>in vitro</i> .....	68
2.9.5. Дослідження моторної активності гладеньких м'язів товстої кишки за допомогою методу тензометрії <i>in vitro</i> .....	70
2.10. Реєстрація трансмембранної різниці потенціалів за допомогою камери Уссінга .....	71
2.11. Бактеріологічний аналіз просвітної мікробіоти щурів .....	74
2.12. Визначення показників окисно-антиоксидантного балансу .....	75
2.12.1. Визначення каталазної активності .....	76
2.12.2. Визначення вмісту ТБК-активних сполук .....	76
2.12.3. Визначення вмісту білкових тіолових груп .....	77

2.12.4. Визначення відновленого глутатіону .....	77
2.12.5. Визначення глутатіон-пероксидази .....	78
2.12.6. Визначення глутатіон-S-трансфери . . . . .	78
2.13. Визначення складу поверхневого слизу кишечника щурів .....	79
2.13.1. Визначення концентрації загальних глікопротеїнів слизу .....	79
2.13.2. Визначення концентрації гексоз слизу орциновим методом .....	79
2.13.3. Визначення концентрації фукози слизу за методом Діше-Шеттлз	80
2.13.4. Визначення концентрації гексозамінів слизу .....	80
2.13.5. Визначення концентрації сіалових кислот слизу методом Гесса ....	81
2.14. Визначення мієлопероксидази .....	81
2.15. Визначення оксигензалежної біоцидності перитонеальних макрофагів за допомогою НСТ-тесту .....	82
2.16. Вестерн-блот аналіз .....	83
2.17. Імуногістохімічні дослідження .....	84
2.18. Статистична обробка результатів .....	85
<b>РОЗДІЛ 3. ПОРІВНЯЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА СТАНУ МОТОРНО-ЕВАКУАТОРНОЇ ФУНКЦІЇ ШКТ ТА АСОЦІЙОВАНИХ З НИМИ РОЗЛАДІВ ЗА РІЗНИХ МОДЕЛЕЙ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНО-ІНДУКОВАНОГО ПАРКІНСОНІЗМУ У ЩУРІВ ТА МИШЕЙ .....</b>	<b>86</b>
3.1. Характеристика 6-OHDA та LPS-індукованого паркінсонізму у щурів	86
3.1.1. Ступінь руйнування дофамінергічних нейронів середнього мозку у щурів з індукованим паркінсонізмом .....	87
3.1.2. Зміни поведінкових та локомоторних реакцій щурів з індукованим паркінсонізмом .....	89
3.1.3. Зміни маси тіла, вмісту води у фекаліях, питної та харчової поведінки у щурів з індукованим паркінсонізмом .....	90
3.1.4. Зміни просвітної мікробіоти дистального відділу товстої кишки щурів з індукованим паркінсонізмом .....	92

3.1.5. Зміни індексу маси лімфоїдних органів у щурів з індукованим паркінсонізмом .....	94
3.1.6. Зміни часу кишкового транзиту та моторної активності товстої кишки у щурів з індукованим паркінсонізмом .....	95
3.2. Характеристика перебігу ротенон-індукованої моделі хвороби Паркінсона у мишей .....	98
3.2.1. Дослідження поведінкових та локомоторних реакцій мишей з ротенон-індукованим паркінсонізмом .....	99
3.2.3. Зміни часу кишкового транзиту у мишей з ротенон-індукованим паркінсонізмом .....	101
3.3. Дослідження основних показників перебігу 6-ОНДА-індукованого паркінсонізму у щурів через 1 та 7 місяців після моделювання хвороби Паркінсона .....	102
3.3.1. Порівняння показників поведінкових та локомоторних реакцій у щурів з 6-ОНДА-індукованим паркінсонізмом у Open field тесті .....	103
3.3.2. Порівняння показників маси тіла та функціонування шлунково-кишкового тракту у щурів з 6-ОНДА-індукованим паркінсонізмом .....	104
3.3.3. Просвітна мікробіота товстої кишки щурів у різні терміни 6-ОНДА-індукованого паркінсонізму .....	107
3.3.4. Вуглеводний склад поверхневого слизу кишечника у щурів з 6-ОНДА-індукованим паркінсонізмом .....	110
<b>РОЗДІЛ 4. РОЛЬ TRPV4 ТА TRPM8 ІОННИХ КАНАЛІВ У КИШЕЧНИКУ ЩУРІВ З 6-ОНДА-ІНДУКОВАНИМ ПАРКІНСОНІЗМОМ .....</b>	<b>114</b>
4.1. Локалізація та рівень тирозингідроксилази у товстій кишці щурів з 6-ОНДА-індукованим паркінсонізмом .....	114
4.2. Роль TRPV4 іонних каналів у регуляції моторної, секреторної та бар'єрної функції товстої кишки щурів з 6-ОНДА-індукованим паркінсонізмом .....	116

4.2.1. Експресія та локалізація TRPV4 іонних каналів у товстій кишці щурів з 6-ОНДА-індукованим паркінсонізмом .....	116
4.2.2. Роль TRPV4 іонних каналів на електрофізіологічні показники епітелію товстої кишки щурів з 6-ОНДА-індукованим паркінсонізмом	119
4.2.3. Вплив лігандів TRPV4 іонних каналів на кишкову секрецію, цілісність щільних контактів та трансепітеліальну проникність епітелію товстої кишки щурів з 6-ОНДА-індукованим паркінсонізмом .....	122
4.3. Роль TRPV8 іонних каналів у регуляції моторної, секреторної та бар'єрної функції товстої кишки щурів з 6-ОНДА-індукованим паркінсонізмом .....	124
4.3.1. Експресія та локалізація TRPV8 іонних каналів у товстій кишці щурів з 6-ОНДА-індукованим паркінсонізмом .....	124
4.3.2. Роль TRPV8 іонних каналів на електрофізіологічні показники епітелію товстої кишки щурів з 6-ОНДА-індукованим паркінсонізмом	126
4.3.3. Вплив лігандів TRPV8 іонних каналів на кишкову секрецію, цілісність щільних контактів та трансепітеліальну проникність епітелію товстої кишки щурів з 6-ОНДА-індукованим паркінсонізмом .....	129
<b>РОЗДІЛ 5. ВПЛИВ ПЕРВИННОГО ВОДНОГО РОЗЧИНУ C<sub>60</sub> ФУЛЕРЕНУ НА ЩУРІВ З 6-ОНДА-ІНДУКОВАНИМ ПАРКІНСОНІЗМОМ .....</b>	<b>132</b>
5.1. Ступінь руйнування дофамінергічних нейронів середнього мозку у щурів з 6-ОНДА-індукованим паркінсонізмом за дії C <sub>60</sub> фулерену .....	133
5.2. Зміни поведінкових та локомоторних реакцій щурів з 6-ОНДА-індукованим паркінсонізмом за дії C <sub>60</sub> фулерену .....	134
5.3. Зміни маси тіла, вмісту води у фекаліях, питної та харчової поведінки щурів з 6-ОНДА-індукованим паркінсонізмом за дії C <sub>60</sub> фулерену .....	136
5.4. Зміни часу кишкового транзиту та моторної активності товстої кишки щурів з 6-ОНДА-індукованим паркінсонізмом за дії C <sub>60</sub> фулерену	138

5.5. Зміни фагоцитарної активності перитонеальних макрофагів щурів з 6-OHDA-індукованим паркінсонізмом за дії C <sub>60</sub> фулерену .....	140
5.6. Дослідження оксидантно-антиоксидантної системи в мозку щурів з 6-OHDA-індукованим паркінсонізмом за дії C <sub>60</sub> фулерену .....	141
УЗАГАЛЬНЕННЯ .....	144
ВИСНОВКИ .....	161
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ .....	164
Додаток 1. Перелік опублікованих праць та відомості про апробацію досліджень .....	186

**ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ**

АФК	-	активні форми кисню
ГМ	-	гладенькі м'язи
ГМК	-	гладеньком'язові клітин
ЗЗК	-	запальні захворювання кишечника
ІАА	-	індекс амплітудної активності
ІМА	-	індекс моторної активності
МК-І	-	мітохондріальний комплекс І
НМС	-	немоторні симптоми
ПНС	-	периферична нервова система
ТІ	-	тонічний індекс
ФІ	-	фазний індекс
ХП	-	хвороба Паркінсона
ЦНС	-	центральна нервова система
ШКТ	-	шлунково-кишковий тракт
DA	-	дофамінергічні (нейрони)
C <sub>60</sub> FAS	-	первинний водний розчин C <sub>60</sub> фулерену
ENS	-	enteric nervous system (ентеральна нервова система)
L-DOPA	-	L-3,4-dihydroxyphenylalanine (L-3,4-дигідроксифенілаланін)
LPS	-	lipopolysaccharide (ліпополісахарид)

MMs	-	<i>muscularis macrophages</i> (макрофаги м'язової оболонки ШКТ);
MPTP	-	1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (1-метил-4-феніл-1,2,3,6-тетрагідропіринідин)
NO	-	nitric oxide (оксид азоту)
OS	-	oxidative stress (оксидативний стрес)
SN	-	<i>substantia nigra</i> (чорна субстанція)
SNpc	-	<i>substantia nigra pars compacta</i> (компактна частина чорної субстанції)
SPS	-	sterile physiological solution (стерильний фізіологічний розчин)
TH	-	tyrosine hydroxylase (тирозингідроксилаза)
TRP	-	transient receptor potential channels (канали транз'єнтного рецепторного потенціалу)
TRPM8	-	transient receptor potential cation channel melastatin subfamily member 4 (катіонний канал транз'єнтного рецепторного потенціалу меластинового типу 8);
TRPV4	-	transient receptor potential cation channel vanilloid subfamily member 4 (катіонний канал транз'єнтного рецепторного потенціалу ванілоїдного типу 4);
6-OHDA	-	6-hydroxydopamine (6-гідроксидофамін)

## ВСТУП

**Актуальність.** Хвороба Паркінсона (ХП) – це повільно прогресуюче нейродегенеративне захворювання, для якого характерна загибель дофамінергічних (DA) нейронів в *substantia nigra pars compacta* (SNpc), з накопиченням у них білка  $\alpha$ -синуклеїну та утворенням внутрішньоклітинних включень (тілець Леві) [1]. Однією з основних ознак захворювання є недостатність продукування дофаміну в базальних гангліях і розвиток дофамін-дефіцитного нейромедіаторного дисбалансу. Перші симптоми хвороби проявляються, коли чисельність нейронів SNpc знижується на 50% і більше, а вміст DA в смугастому тілі на 80% [2].

Основними клінічними ознаками хвороби є тремор, гіпокінезія, м'язова ригідність, постуральна нестійкість, які належать до так званих моторних симптомів [3]. В останні роки увага дослідників прикута до розуміння патогенезу і відповідно нових молекулярних мішеней і протоколів лікування немоторних симптомів (НМС) ХП, зокрема порушення нюху, закрепи, депресій, розладів поведінки уві сні. НМС можуть проявлятися ще за 20 років до початку класичних моторних симптомів (проморна стадія) і мають не менший негативний вплив на якість життя хворого [4,5].

Найбільше незручностей, серед НМС проявів, викликають дисфункції шлунково-кишкового тракту (ШКТ) – це порушення моторики кишечника, закрепи, здуття, нудота та ін. Відчуття переповнення шлунку (гастропаземи) та закрепи фіксуються у 100% хворих, і це відбувається, як на початкових, так і на пізніх стадіях захворювання, з серйозними порушеннями якості життя пацієнтів [6,7]. Негативним результатом порушень ШКТ є зниження біодоступності ліків, адже більшість антипаркінсонічних препаратів вводяться саме перорально, а отже і швидкість їх абсорбції в ШКТ є дуже важливою для досягнення необхідного ефекту. Важливим фактором, що впливає на швидкість абсорбції препарату з ШКТ є швидкість випорожнення кишечника. Таким чином, знижена перистальтика ШКТ може затримувати і знижувати пікову концентрацію

препарату в плазмі і зменшувати клінічну ефективність лікування леводопою (L-DOPA) [8]. Крім того, у пацієнтів з ХП спостерігається порушення інтегративної цілісності кишечника, зокрема товстої кишки, що далі призводить до погіршення перебігу ХП [9].

В останні роки все більше з'являється інформації про взаємозв'язок нейродегенеративних хвороб (у тому числі і ХП) та змін у діяльності TRP родини іонних каналів [10–12] і це наштовхує на думку про можливу участь каналів у патогенезі НМС за ХП, зокрема розладів ШКТ.

Родина TRPV іонних каналів присутня в м'єнтеральних та/або вісцеральних аферентних нервових волокнах або епітелії травного тракту. Встановлена їх роль у регуляції перистальтики та секреції кишечника [13]. Зокрема, TRPV4 беруть участь у патогенезі запалення, гіперчутливості і порушення бар'єрної функції ШКТ [14]. Активація TRPV4 каналів пригнічує скоротливу активність товстої кишки та затримує дефекацію у мишей [15,16].

Також було показано, що родина TRPM каналів бере участь у регуляції запальних процесів [17]. TRPM8 пригнічує скорочення кишечника та може брати участь у процесах дефекації [17,18].

Наведені дані щодо ролі TRPV4 та TRPM8 іонних каналів, є достатньо обґрунтованою підставою для їх розгляду, як потенційних молекулярних мішеней кишечних розладів за ХП.

**Мета і завдання.** Метою дисертаційного дослідження було встановлення релевантної моделі паркінсонізму для вивчення механізмів порушення моторно-евакуаторної і бар'єрної функції кишечника та ролі TRPV4 й TRPM8 іонних каналів у них.

Відповідно до зазначеної мети було поставлено наступні **завдання**:

1. Дослідити моторно-евакуаторну функцію шлунково-кишкового тракту щурів та мишей за різних моделей експериментально-індукованого паркінсонізму.

2. Порівняти локомоторні та поведінкові ознаки хвороби Паркінсона, моторно-евакуаторну і бар'єрну функції кишечника у щурів через 1 та 7 місяців після моделювання 6-OHDA-індукованої хвороби Паркінсона.

3. Охарактеризувати експресію та локалізацію TRPV4 та TRPM8 іонних каналів у кишечнику за умов експериментального паркінсонізму.

4. Встановити роль TRPV4 та TRPM8 іонних каналів у механізмах секретомоторної функції товстої кишки за умов експериментального паркінсонізму.

5. Дослідити ефективність первинного водного розчину  $C_{60}$  фулерену для корегування розладів моторно-евакуаторної функції кишечника щурів з 6-OHDA-індукованим паркінсонізмом.

**Об'єкт дослідження:** секретомоторна та бар'єрна функції товстої кишки щурів за умов експериментального паркінсонізму.

**Предмет дослідження:** роль TRPV4 й TRPM8 іонних каналів у секретомоторній та бар'єрній функціях товстої кишки за умов експериментального паркінсонізму.

**Методи дослідження:** стереотаксичні операції для моделювання паркінсонізму, поведінкові тести (апоморфіновий тест, Open field, Pole тест), аналіз тканинного та субклітинного патернів експресії рецепторів (вестерн-блот, імуногістохімія), фізіологічні методи (секреторна та бар'єрна функція кишечника за допомогою камери Уссінга; скоротлива функція кишечника методом тензометрії, балонографії), визначення мікробіоти (метод бактеріологічних посівів), біохімічні методи, методи варіаційної статистики.

**Наукова новизна результатів.** У результаті даного дослідження: 1) нами вперше показано, що за LPS- і 6-OHDA-модельованої ХП у щурів та ротенонової моделі ХП у мишей, спостерігаються функціональні розлади секретомоторної функції ШКТ, проте напрям розладів саме за 6-OHDA моделі у щурів та ротенонової моделі ХП у мишей відповідає клінічному перебігу ХП; 2) експериментально доведено, що ступінь розладів секретомоторної функції ШКТ напряму взаємопов'язаний із ступенем порушень у ЦНС за умов 6-OHDA-ХП у

щурів; 3) вперше показано 2-кратне збільшення експресії TRPV4 іонних каналів у товстій кишці щурів з 6-OHDA-ХП, як на 1-й місяць експерименту так і через 7 місяців після моделювання ХП, що опосередковує виражений негативний вплив на стимульовану моторику, карбахолін-стимульовану секрецію іонів та підвищення транспепітеліальної проникності через епітелій товстої кишки щурів з 6-OHDA-ХП; 4) вперше встановлено повне зникнення TRPM8 іонних каналів у товстій кишці щурів з 6-OHDA-ХП, як на 1-й місяць експерименту так і через 7 місяців після моделювання ХП, що супроводжується порушенням TRPM8-опосередкованих механізмів регуляції карбахолін-стимульованої моторики та секреції іонів через епітелій товстої кишки щурів з 6-OHDA-ХП.

**Практичне значення.** У роботі експериментально доведено, що 6-OHDA-модель ХП у щурів та ротенонова модель ХП на мишах є релевантними та легко-відтворюваними моделями для дослідження молекулярних механізмів шлунково-кишкових розладів та тестування потенційних лікувальних чи профілактичних засобів. Адаптовано застосування балонографічного методу для визначення скоротливої активності ізольованої ділянки товстої кишки в умовах *in vitro* та встановлена відповідність досліджуваних показників умовам *in vivo*, що є важливим для зменшення використання фармакологічних речовин в експерименті. Вперше встановлено дві потенційні фармакологічні мішені TRPV4 та TRPM8 іонні канали для корегування супутніх секретомоторних розладів ШКТ у пацієнтів з ХП. Це сприятиме розробці нових стратегій лікування даного захворювання, арсенал терапевтичних засобів для лікування яких є надзвичайно обмеженим. Встановлено, що C<sub>60</sub>FAS є перспективним для комплексного відновлення центральних симптомів ХП та моторної функції ШКТ за 6-OHDA-ХП у щурів *in vivo*, проте виявлено токсичний побічний ефект, який має бути врахований при проведенні подальших досліджень щодо застосування C<sub>60</sub>FAS для лікування ХП.

Матеріали дисертації впроваджені в навчальний процес Навчально-наукового центру «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка на кафедрі біофізики та медичної

біоінформатики при викладанні навчальних дисциплін: «Біофізика», «Принципи молекулярного моделювання», «Електробіофізика та біофізика іонних каналів», «Молекулярна біофізика», «Біоінформатика», «Основи фармакопеї».

**Особистий внесок здобувача.** Дисертантом самостійно проведено інформаційний пошук, експериментальні дослідження, аналіз і статистичне опрацювання результатів, а також графічна підготовка результатів до опублікування і написання першої версії всіх статей. Формування ідеї роботи, планування схеми експерименту та розробка методичних підходів до виконання комплексу лабораторних досліджень, обговорення отриманих результатів, формулювання висновків проведено за участю наукового керівника.

Консультаційну допомогу та супровід у проведенні досліджень надавали: н.с., к.б.н. Довбинчук Т.В. (моделювання ХП та дослідження секреторної функції кишечника), асистент, к.б.н. Дзюбенко Н.В. (імуногістохімічні дослідження); доц., к.б.н. Сергійчук Т.М. (мікробіологічні дослідження), проф, д.б.н. Гарманчук Л.В. (дослідження перитонеальних макрофагів), проф, д.б.н. Жолос (аналіз іонних каналів). Первинний водний розчин  $C_{60}$  фулеренів був наданий проф. Ю.І. Прилуцьким (ННЦ «Інститут біології на медицини»), проф. У. Ріттер та проф. П. Шарф (Технічний університет Ільменау, Німеччина). Дана співпраця відображається у спільних публікаціях. В обговоренні результатів приймали участь співавтори публікацій.

**Апробація результатів дисертації.** Основні результати дисертаційного дослідження доповідалися на V та VII Всеукраїнській науково-практичній конференції студентів, аспірантів та молодих вчених «Об'єднані наукою: перспективи міждисциплінарних досліджень» (2018, 2020, Київ); 5<sup>th</sup> International Conference of Cell Biology (May 1-12, 2019, Kraków, Poland); EMBO Young Scientists Forum. (June 27-28, 2019, Prague, Czech Republic); Міжнародній науково-практичній конференції студентів і молодих вчених «Biomed Talks - 2019» (15-17 жовтня 2019, Київ); 63<sup>rd</sup>, 64<sup>th</sup> International conference for students of physics and natural sciences (2020, 2021, Vilnius, Lithuania).

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

Дисертаційна робота виконана в рамках тематики наукових досліджень ННЦ «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка та за кошти: 1) держбюджетних НДР, що фінансуються МОН України: 19БФ036-01 «Молекулярні та клітинні механізми TRP каналопатій» (№ д/р 0119U100307, 2019-2021); 22БФ036-01 «Транспорт іонів та оксалатів як ключовий фактор хронічної хвороби нирок та асоційованих з нею патологій» (№ д/р 0122U001535, 2022-2024); 2) спецфонду «Наука»: НДР 18ДП036-10 «The effect of  $^{64}\text{Zn}$ -asp and  $^{64}\text{Zn}$ -asp containing 50%  $\text{Э}2+85\text{Rb}$  on local and systemic immune reactivity, behavioural and motor functions in rats with LPS-induced experimental parkinsonism» (2018 р.).

Тема дисертаційної роботи затверджена на засіданні Вченої ради ННЦ «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка, протокол №5 від 12 листопада 2018 року.

Уточнення теми дисертаційної роботи затверджено на засіданні Вченої ради ННЦ «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка, протокол №12 від 30 червня 2022 року.

**Публікації.** За темою дисертаційного дослідження опубліковано 12 наукових праць, серед них 4 статті у фахових періодичних виданнях, затверджених переліком МОН України (серед них 2 публікації у періодичних наукових виданнях, проіндексованих у базах даних Web of Science Core Collection та Scopus), а також 8 тез доповідей у матеріалах наукових конференцій та з'їздів.

**Структура та обсяг дисертації.** Дисертаційна робота складається зі вступу, огляду літератури, матеріалів і методів досліджень, результатів власних досліджень з їх обговоренням, узагальнення, висновків, списку використаних літературних джерел (245 посилань). Дисертаційна робота викладена на 185 сторінках (з яких 163 сторінок основної частини) містить 41 рисунок та 4 таблиці.

## РОЗДІЛ 1

### ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

#### 1.1. Патогенетичні зміни в організмі за розвитку хвороби Паркінсона

##### 1.1.1. Етіологія хвороби Паркінсона

Хвороба Паркінсона (ХП) — це повільно прогресуюче нейродегенеративне захворювання із середньорічною захворюваністю у світі 160 осіб на 100 000 населення [1]. Вперше хворобу описав Джеймс Паркінсон у 1817 році. ХП є другим за поширеністю нейродегенеративним захворюванням після хвороби Альцгеймера [4], з поширеністю приблизно 0,5–1% в осіб віком 65–69 років, зростаючи до 1–3% серед осіб віком 80 років і старше [19,20]. Але у спадкових випадках ХП може починатися і у віці 30-40 років [21]. Основною ознакою патогенезу ХП є втрата дофамінергічних (DA) нейронів у *substantia nigra pars compacta* (SNpc) із відкладенням інтранейрональних агрегатів  $\alpha$ -синуклеїну (тільця Леві), але також спостерігаються зміни в інших структурах мозку, включаючи *locus coeruleus*, гіпокамп і коркові структури [22].

Патологія ХП характеризується не лише нейродегенерацією у SNpc, але включає також клітини, розташовані в інших нейронних мережах. Така широко поширена патологія робить ХП гетерогенним розладом, унаслідок чого надійна та швидка діагностика хвороби сильно ускладнюється. Лікування переважно спрямоване на полегшення симптомів за допомогою препаратів, спрямованих на відновлення рівня дофаміну в смугастому тілі, або дією на пост-стріатум синаптичних дофамінових рецепторів [23].

ХП є багатофакторним захворюванням, в якому відіграють роль як генетичні, так й екологічні фактори. Близько 10-15% населення мають спадковий характер захворювання на ХП [24]. Гени, що спричинюють ХП називаються «*PARK*», на сьогоднішній день нараховують 23 таких гена. Мутації у цих генах демонструють аутосомно-домінантне (наприклад, *SCNA*, *LRRK2* і *VPS32*) або

аутосомно-рецесивне успадкування (наприклад, *PRKN*, *PINK1* і *DJ-1*). Мутації в генах *PARK3/10/12/16/22* вважаються лише факторами ризику ХП, тоді як мутації у *PARK5/11/13/18/21/23* є вже патогенезом [25]. Одним з найважливіших генетичних факторів ризику є мутації в *GBA1* гені, що кодує  $\beta$ -глюкоцереброзидазу — лізосомальний фермент, відповідальний за гідроліз глюкоцереброзидів [26].

Крім спадкових факторів, існує чимало хімічних речовин, які сприяють розвитку ХП. У 1982 році Вільям Ленгстон описав 7 пацієнтів, які вживали «синтетичний героїн» наслідком чого проявлялися ознаки паркінсонізму. Причина заключалася в тому, що до складу наркотику входив 1-метил-4-феніл-1,2,3,6-тетрагідропіридин (МРТР), який є токсичним для DA нейронів SNpc. МРР+ (1-метил-4-фенілпіридин) – нейротоксин, який є інгібітором мітохондріального комплексу-I (МК-I), що вибірково пошкоджує DA клітини в SNpc [27]. Іншими речовинами, що викликають ХП є паракват (гербіцид, за хімічною структурою дуже схожий на МРР+) і ротенон (пестицид), які є селективними інгібіторами МК-I та індукують дегенерацію DA нейронів [23,28].

Також було виявлено, що аномальна агрегація  $\alpha$ -синуклеїну є токсичною для DA нейронів, що призводить до нейродегенерації нейронів при ХП. Оксидативний стрес (OS), мутації в *PARK* генах і їх надмірна експресія можуть впливати на конформаційні зміни  $\alpha$ -синуклеїну та його агрегацію. Деякі з видів  $\alpha$ -синуклеїну можуть активувати нейрозапалення, що передається від клітини до клітини [29].

На даний момент існує чимало доказів, які підтверджують, що ХП може спочатку виникати в периферичній нервовій системі (ПНС) та/або нюховій цибуліні, при цьому патологія потім поширюється через центральну нервову систему (ЦНС), вражаючи нижні структури стовбура мозку, перш ніж відбудеться нейродегенерація в SNpc [22]. Таким чином, вищесказане може пояснити наявність гіпосмії, закрепів та розладів сну, у пацієнтів з ХП ще задовго до появи моторних симптомів. Також було показано, що в переважній більшості випадків, пацієнти до розвитку характерних моторних симптомів і встановлення

діагнозу ХП, мали порушення рівноваги, депресію, страждали на закрепи, втому та дисфункцію сечовипускання. Наявність цих немоторних симптомів (НМС) ще за 10-20 років до встановлення діагнозу ХП є достатньо розповсюдженим випадком [30]. Відповідно, у дослідників зростає інтерес до цього продромального періоду розвитку ХП, адже він може бути ідеальним часом для терапевтичного втручання.

Крім того, з'являється все більше підтверджень про взаємозв'язок мікробіоти ШКТ з ЦНС та ПНС, як можливого чинника нейродегенеративних захворювань [27,28]. Науковці виділяють чотири основні шляхи обміну інформацією між кишечником і мозком: 1) прямий зв'язок між кишковими бактеріями і ЦНС через блукаючий нерв; 2) імунний зв'язок за допомогою вивільнення цитокінів у результаті активації імунних клітин; 3) ендокринний зв'язок, що здійснюється за допомогою гормонів ШКТ; 4) обмін сигнальними молекулами, що синтезуються мікробіотою та переносяться в системний кровотік. Четвертий шлях може вступати в складні взаємодії з першими трьома. Більш того, всі чотири шляхи комунікації осі "кишечник-мозок" тісно взаємодіють між собою [33]. Але точний механізм взаємозв'язку не відомий й досі.

### 1.1.2. Оксидативний стрес як чинник розвитку хвороби Паркінсона

Одним із ключових патологічних тригерів патогенезу ХП є OS, який індукує мітохондріальну дисфункцію з подальшою активацією клітин нейроглії, інфільтрацією Т-лімфоцитів з наступним хронічним запаленням та агрегацією  $\alpha$ -синуклеїну, що в кінцевому підсумку призводить до дегенерації DA нейронів [34].

OS виникає внаслідок порушення регуляції окисно-відновної реакції в клітинах, де виробництво активних форм кисню (АФК) переважає очищенню над ендогенними антиоксидантними ферментами та молекулярними

шаперонами. Таким чином, OS сам по собі не є патологією, а накопичення АФК після клітинного окисно-відновного дисбалансу опосередковує пошкодження нейронів. Хоча АФК є важливими сигнальними молекулами, що регулюють фізіологічну транскрипцію генів і взаємодію білків, накопичення АФК може призвести до окислювального пошкодження ліпідів, білків, ДНК і РНК залежно від субклітинного розташування виробництва АФК, порушуючи функцію нейронів і їх структурну цілісність [35].

Посмертні дослідження SNpc головного мозку пацієнтів з ХП показали, що у них наявний дефіцит МК-I, який бере участь у ланцюзі транспортування електронів [36]. Порушення в МК-I відіграє важливе значення при дегенерації DA нейронів через втрату енергії [37]. Крім того, в багатьох відомих генах, які викликають ХП, важливу роль відіграє в процесі мітохондріального гомеостазу [38]. Мутації в генах призводять до порушення функціонування мітохондрій і як наслідок виникає аутосомно-рецесивна ХП [7].

Також відомо, що  $\alpha$ -синуклеїн сам по собі перешкоджає функціонуванню мітохондрій шляхом взаємодії з плазматичною мембраною та накопиченням всередині органел клітини. Це також призводить до пошкодження МК-I, мітохондріальної дисфункції та посилення OS [39].

Однією з ключових тваринних моделей, яка викликає вибіркоче пошкодження DA нейронів, а також інших катехоламінергічних нейронів завдяки своїм високим окисним властивостям є 6-гідроксидофамінова (6-OHDA) модель [40]. Припускають, що 6-OHDA може викликати цитотоксичну дію трьома шляхами: 1) він може самоокислюватися, спричиняючи внутрішньо- та позаклітинне пошкодження; 2) 6-OHDA здатний до прямого інгібування комплексів дихального ланцюга; 3) 6-OHDA може індукувати утворення пероксиду водню за рахунок дії моноаміноксидази [41]. Результатом усіх цих процесів є виробництво АФК і OS, що призводить до загибелі клітин, локалізованих переважно в нігростріатальному шляху [42].

Ще одною речовиною, що спричиняє пошкодження мітохондрій, зниженню мітохондріального потенціалу з вивільненням цитохрому c,

активацією каспазного каскаду та кінцевою загибеллю клітин в експериментальних моделях ХП є ротенон. Ротенонова модель широко застосовується при моделюванні хвороби. Лабораторні дослідження ротенону неодноразово показували, що він індукує *in vivo* втрату DA клітин SNpc, що є характерною ознакою нейропатології ХП. Крім того, ротенон індукує *in vivo* агрегацію  $\alpha$ -синуклеїну, основного компонента тілець Леві та нейритів Леві, виявлених у мозку пацієнтів із ХП. Деякі моделі ротенону *in vivo* також відтворюють периферичні ознаки ХП, такі як знижена перистальтика кишечника та периферична агрегація  $\alpha$ -синуклеїну [43].

### 1.1.3. Роль імунних компонентів у патогенезі хвороби Паркінсона

У посмертних дослідженнях мозку хворих на ХП було показано, що у SNpc та смугастому тілі пацієнтів присутня мікрогліальна активація та активація комплементу, інфільтрація Т-лімфоцитів (CD4 та CD8) та підвищення концентрації прозапальних цитокінів [44]. Інші дослідження показали, що нейрозапалення є одним з патологічних процесів при ХП, у результаті чого відбувається збільшення концентрації прозапальних цитокінів у крові, спинномозковій рідині (лікворі) і навіть у мозку пацієнтів з ХП [45]. Також відбуваються зміни в клітинному імунітеті, зміни моноцитів крові, Т-клітин, включаючи співвідношення Treg/Teff і поява Т-клітин пам'яті з реактивністю до специфічних епітопів  $\alpha$ -синуклеїну [46].

Також було показано, що на ранніх стадіях ХП на томограмі мозку спостерігається підвищена активація мікроглії у стовбурі мозку, базальних гангліях і лобно-скроневій корі [47]. Раніше вважалося, що запалення є наслідком дегенерації DA нейронів, але на даний момент є підтвердження, що запальні реакції можуть самі по собі сприяти патогенезу захворювання. Крім того,  $\alpha$ -синуклеїн може безпосередньо викликати активацію мікроглії та ініціювати запальні процеси [48].

Williams-Gray та ін. [49] показали, що прогресування моторних симптомів та порушення когнітивних функцій корелює із збільшенням прозапального профілю імунних маркерів у сироватці.

Нейрозапалення спостерігається у тваринних моделях ХП, включаючи моделі на основі нейротоксинів (таких як 6-ОНДА та МРТР) і різноманітні моделі на основі  $\alpha$ -синуклеїну, включаючи трансгенних тварин, моделі на основі вірусної доставки  $\alpha$ -синуклеїну, і моделі, індуковані введенням неправильно згорнутих  $\alpha$ -синуклеїнових фібрил [50].

Важливим питанням залишається чи нейрозапалення у пацієнтів з ХП та в експериментальних моделях відрізняються між собою. І відповідь однозначно так, адже хвороба виникає внаслідок різного характеру імунної відповіді у різних видів організмів. Відмінності наявні також внаслідок фундаментальних біологічних відмінностей між видами і середовищем, в якому вони знаходяться [51].

Carvey та ін. [52] показали, що пренатальна експозиція бактеріологічним токсином ліпополісахаридом (LPS) призводить до тривалої втрати DA нейронів у потомства. LPS - це ендотоксин, який міститься в клітинних стінках багатьох видів бактерій, таких як *E.coli*, *Salmonella*, *Pseudomonas*, *Vibrio* та *Rhizobium*. Він викликає різні ефекти у ссавців, починаючи від гострої запальної реакції до септичного шоку [53]. На відміну від 6-ОНДА, LPS не може безпосередньо індукувати загибель DA нейронів. Дослідження показують, що нейротоксичність LPS залежить від активності мікрогліальних клітин. Було підтверджено, що активація мікроглії під впливом LPS спричиняє вивільнення різних прозапальних і цитотоксичних факторів, таких як NO, TNF- $\alpha$  та IL1 $\beta$ , що, у свою чергу, призводить до втрати DA нейронів [54]. Інше дослідження показало, що LPS також може впливати на активацію НАДФН-оксидази – ферменту, відповідального за виробництво АФК [55]. Причина, чому мікроглія відіграє таку важливу роль у нейротоксичності LPS, полягає в тому, що цей ендотоксин може специфічно зв'язуватися з рецепторами TLR4, які в основному

експресуються мікрогліальними клітинами ЦНС [56]. Також таке пошкодження нейронів не обмежується лише DA клітинами.

#### 1.1.4. Розлади з боку шлунково-кишкового тракту в патогенезі хвороби Паркінсона

Діагноз ХП ставиться з появою моторних симптомів, таких як брадикінезія, м'язова ригідність, тремор у стані спокою, а також порушення постави та ходи. Незважаючи на те, що ХП широко визнана як соматична моторна дисфункція, що характеризується втратою DA нейронів у SNpc, більшість пацієнтів із ХП сильно страждають від НМС, таких як порушення травлення, втрата ваги, проблеми з моторикою ШКТ, закрепи та інші шлунково-кишкові дисфункції [3]. Численні НМС передують моторним за 20 років або більше років до появи хвороби (Рис. 1.1.) [29].

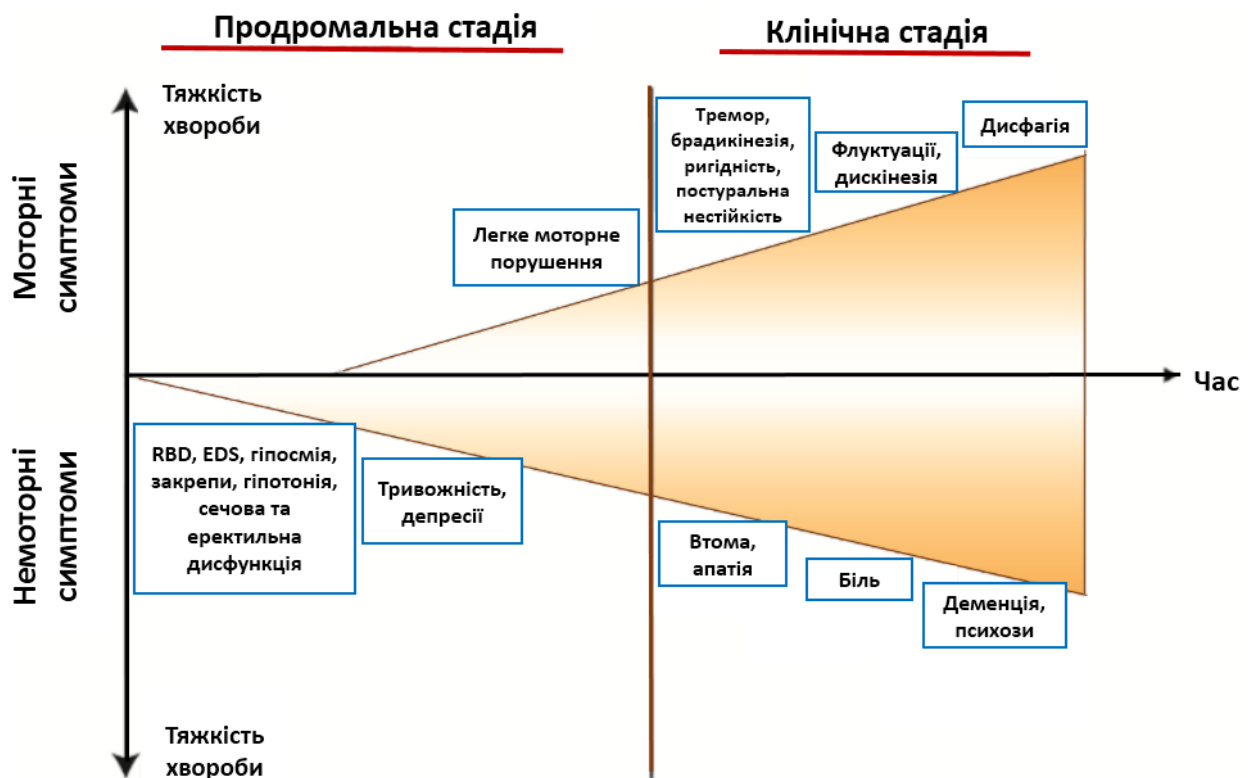


Рис. 1.1. Перебіг ХП від продромальної фази до клінічної фази [29].

DA нейрони також поширені у верхніх відділах ШКТ і становлять від 15% до 20% від загальної кількості ентеральних нейронів, але у товстій кишці їх частка зменшується до 2-4% [57]. Дефіцит дофаміну в SNpc сприяє шлунково-кишковим розладам у пацієнтів із ХП [58]. Було зазначено, що поява тілець Леві у клітинах ентеральної нервової системи (ENS) шлунку та кишечника знаменує початок розвитку ХП [59]. Дорсальне моторне ядро блукаючого нерва (DMV), яке забезпечує парасимпатичну іннервацію ШКТ, також залучене на ранніх стадіях ХП. Зміни у функціонуванні ядра викликають порушення моторики, інтоксикацію та закрепи [60].

Закреп і дисфункція моторики є найпоширенішими НМС у пацієнтів з ХП, які характеризуються кишковими та аноректальними симптомами. Вони спостерігаються приблизно у 66% усіх пацієнтів із ХП, що призводить до психологічного та соціального стресу та, як наслідок, до зниження якості життя [61,62]. Патомеханізм затримки проходження вмісту кишечника через товсту кишку при ХП пов'язаний із розладом ЦНС, а також з втратою збуджувальних холінергічних нейронів у товстій кишці та порушенням холінергічної функції [63,64]. Тому лікування симптомів ХП є доволі складним процесом [65].

Дисфункція ШКТ у хворих на паркінсонізм може бути пов'язана з накопиченням  $\alpha$ -синуклеїну у підслизовому сплетінні Мейснера з поширенням на слизову оболонку шлунка [59]. У пацієнтів з ХП також спостерігається гастропарез - сповільнена евакуація шлункового вмісту, яка призводить до затримки їжі та розтягування стінок шлунка, дискомфорту в животі, ранньому насиченні, нудоті та втраті ваги. Дисфункція евакуаторної функції шлунка призводить до зниження всмоктування леводопи та інших антипаркінсонічних ліків, затримки їх дії або взагалі повного незасвоєння необхідної дози [66,67]. Втрата ваги була виявлена у 52% осіб із ХП на початку захворювання. Обсяг втрати ваги зазвичай помірний, хоча може перевищувати 12,8 кг у 22% пацієнтів з ХП. Можливими причинами є: 1) зменшення споживання/витрат енергії; 2) порушення нюху та відчуття смаку; 3) дисфагія; 4) поєднання змін у DA системі

внаслідок прогресування ХП та змін, які спричиняють антипаркінсонічні препарати [67].

Хворі на паркінсонізм також демонструють значно більшу проникність кишечника, ніж умовно-здорові люди. Крім того, кишкова гіперпроникність суттєво корелює зі збільшенням кількості грамнегативних бактерій, нітротирозину та  $\alpha$ -синуклеїну, а також рівнем LPS-зв'язувальних білків у сироватці крові хворих. Одним з наслідків підвищеної кишкової проникності є транслокація бактерій (наприклад, *E. coli*) та їх метаболітів (наприклад, LPS), які створюють прозапальне середовище та збільшують рівень OS в тканинах кишечника [68].

Ще одним периферичним фактором розвитку ХП вважають зміну кишкової мікробіоти. Вісь «кишечник-мозок» має двосторонній зв'язок, так як мозок діє на мікробіоту, так само і мікробіота може впливати на мозок. Кишкова мікробіота безпосередньо взаємодіє з кишковою ENS. ENS включає в себе щонайменше 0,5 млн. нейронів і допоміжних клітин, таких як астроглія, яка захищає дифузійний бар'єр між капілярами кишечника та гангліями ENS [69]. Бактерії можуть впливати на нервові волокна ENS і аферентні волокна ПНС за допомогою різних хімічно-активних сигнальних молекул. Мікробіота може також безпосередньо впливати на нейрони головного мозку за допомогою метаболітів, які потрапляють у системний кровотік і проходять через гематоенцефалічний бар'єр [32].

На даний час, науковці розглядають два способи покращити перебіг нейродегенеративних захворювань, шляхом впливу на кишкову мікробіоту: 1) фекальна трансплантація (пересадка фекального мікробіому від здорового донора пацієнтам); 2) застосування про-, пре- чи постбіотичних препаратів [70].

1.2. TRP іонні канали та їх функціонування у шлунково-кишковому тракті

### 1.2.1. Будова, функції та локалізація TRP-іонних каналів в організмі

Канали транзиторного рецепторного потенціалу (TRP) належать до суперродини катіонних каналів, які змінюють мембранний потенціал або внутрішньоклітинну концентрацію кальцію ( $[Ca^{2+}]_i$ ) і можуть брати участь у різних патологічних механізмах, механочутливості [14], трансдукції болю [71], регуляції моторики ШКТ та ін. [72,73]. Перший ген *trp* був клонований із *Drosophila melanogaster*, де він кодує іонний канал фототрансдукції, який деполаризує сітківку у відповідь на світло.

Існує близько 28 TRP каналів, які подібні між собою за будовою. На даний момент розділяють 7 підродин TRP каналів (Рис. 1.2.) [74]: TRPV (*Vanilloid*, ванілоїдні), TRPM (*Melastatin*, меластатинові), TRPC (*Canonical*, канонічні), TRPA (*Ankyrin*, анкіринові), TRPML (*Mucolipin*, муколіпінові), TRPN (NOMP – NO *mechanopotential*, механочутливі), TRPP (*Polycystin*, поліцистинові)) [10].

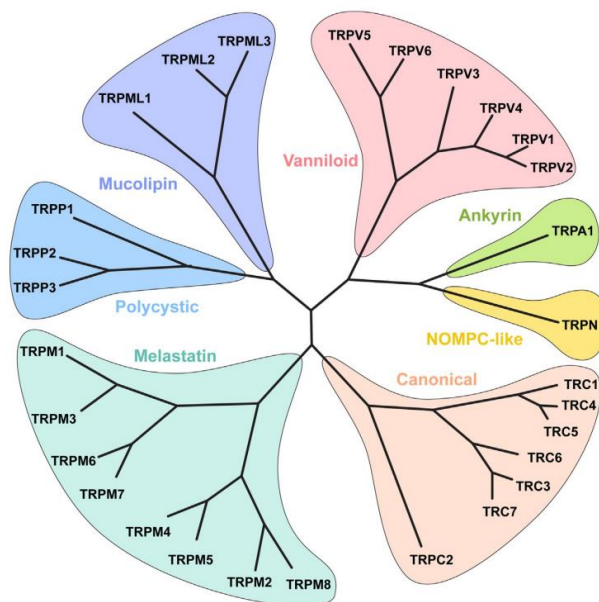


Рис. 1.2. Генеалогічне дерево TRP іонних каналів у ссавців [74].

Загальна структура трансмембранного домену TRP каналів схожа на структуру опосередкованих напругою калієвих каналів ( $K_v$ ): гомо- або гетеротетрамери з 4-ма субодиницями, які оточують центральний шлях проникнення іонів. Кожна субодиниця каналу має 6 трансмембранних спіралей

(S1-S6), де S1-S4 спіралі утворюють voltage-sensing like domain (VSLD), S5-S6 і порова спіраль (PH) - утворюють поровий домен (PD), також у TRP каналах наявні внутрішньоклітинні N- і С-кінці [11].

Як і  $K_v$  канали, шлях проникнення іонів через TRP канали має дві точки звуження: верхній фільтр іонної селективності (SF), вистелений PH і поровою петлею, і нижні ворота, утворені С-кінцем S6 [11].

Локалізація TRP каналів зосереджена по всьому організму: мозок, серце, нирки, ЦНС, легені, простата, судини, гладенькі м'язи (ГМ), ШКТ та ін. TRP канали діють як центри зв'язку на плазматичній мембрані, які об'єднують і підсилюють сигнальні шляхи. TRP пов'язані з різноманітними типами захворювань, такими як серцево-судинні, респіраторні, неврологічні та метаболічні. Їх тісний зв'язок із захворюваннями та чутливість до різноманітних модуляторів разом роблять TRP канали привабливою мішенню для фармакологічного втручання для лікування захворювань [11].

Останні дослідження вказують на те, що дисфункції в ШКТ та нейродегенеративні хвороби, у тому числі і ХП, виникають внаслідок мутацій або змін у діяльності TRP каналів [10]. Залучення TRP до безлічі фундаментальних функцій клітин вимагає вивчення їх ролі в патогенезі захворювань. Ці канали також розглядаються, як важливі мішені для розробки нових ліків. Безумовно, дослідження, які пов'язують функції TRP патогенезом, стануть важливим пріоритетом у біомедичних науках [12].

### 1.2.2. Загальна характеристика TRPV4 каналів

Назва підродини TRPV походить від класу речовин рослинного походження - «ванілоїдів» (*vanilloids*), у структурі цих каналів наявна ванілілова група (*vanillyl group*). Підродина транзитного рецепторного потенціалу ванілоїдного типу (TRPV) іонних каналів містить шість підтипів (TRPV1-6), які є  $Ca^{2+}$ -проникними катіонними каналами. Перший представник цієї підродини, що був

охарактеризований – це TRPV1 канали. Вони чутливі до капсаїцину (гостра складова перцю чилі). Локалізовані дані канали у вісцеральних та ГМ судин [75].

Серед різних TRPV каналів, ролі TRPV4 приділяють все більше уваги, завдяки широкому розповсюдженню у тканинах ссавців, включаючи легені, печінку, серце, нирки, ЦНС, шкіру, слинні й потові залози, епітеліальні клітини, ендотелій судин, ГМ, хондроцити і нейрони [72,76]. TRPV4 - це неселективні катіонні канали з більшою провідністю для іонів  $\text{Ca}^{2+}$  та  $\text{Mg}^{2+}$ , ніж для  $\text{Na}^+$ , який при активації спричинює вхід  $\text{Ca}^{2+}$  в клітину. TRPV4-канали активуються при температурі вище ніж  $25^{\circ}\text{C}$ , механічними стимулами, ендогенними речовинами (арахідоноювою кислотою) [77,78]. Крім того, TRPV4 беруть участь у патофізіології запалення, гіперчутливості і бар'єрній функції ШКТ [14].

Ін'єкція агоніста TRPV4 GSK1016790A викликає загибель нейронів гіпокампу [79]. Агоніст TRPV4 підвищує внутрішньоклітинний рівень  $\text{Ca}^{2+}$  і продукцію супероксиду в макрофагах легень [80]. TRPV4 канали беруть участь у розвитку механічної гіпералгезії при запаленнях та ушкодженнях тканин, підсилюють чутливість судин до хронічної гіпоксичної легеневої гіпертензії [77].

TRPV4 на ГМ активуються метаболітами арахідової кислоти, які виділені з ендотелію 11, 12-епоксіейкозатрієноювою кислотою (11,12-EET). Збільшення іонів  $\text{Ca}^{2+}$  через TRPV4 канали стимулює ріанодиновий рецептор (RYR) у саркоплазматичному ретикулумі. Вивільнення  $\text{Ca}^{2+}$  призводить до відкриття сусідніх  $\text{Ca}^{2+}$ -активованих- $\text{K}^+$  каналів з великою провідністю ( $\text{BK}_{\text{Ca}}$ ) каналів, що призводить до гіперполяризації мембрани та вазодилатації [15]. TRPV4 можуть утворювати  $\text{Ca}^{2+}$  сигналізацію комплексу з RYR і  $\text{BK}_{\text{Ca}}$ , щоб індукувати гіперполяризацію та розширення судин. TRPV4 канали також беруть участь у контролі судинного тонуусу в периферичних опорних артеріях, який важливий також для регуляції артеріального тиску [18].

Хоча гени TRP родини широко експресуються в кишечнику та можуть контролювати моторику ШКТ, конкретна роль TRPV4 у даному процесі за ХП залишається невідомою.

### 1.2.3. Загальна характеристика TRPM8 каналів

Транзиторний рецепторний потенціал меластинового типу (TRPM) є однією з найбільш різноманітних підродин TRP іонних каналів. Підродина TRPM представлена 4 групами на основі гомології: 1) TRPM1 і TRPM3, 2) TRPM4 і TRPM5, 3) TRPM2, TRPM6 і TRPM7 і 4) TRPM8 [10].

TRPM канали були виділені з ракових тканин, таким чином вони задіяні в онкогенезі, проліферації та диференціації ракових клітин [81]. Представники цієї підродини також беруть участь у відчуттях температури, гомеостазі  $Mg^{2+}$  і смаку [82]. Також є дані про роль цих каналів у регуляції запальних процесів [17].

TRPM у своїй структурі має 6 мембранних областей, цитоплазматичних С- і N-кінцевих доменів і С-кінцевого мотиву TRP. Кожен член цієї підродини містить N-кінцевий «регіон гомології TRPM», який бере участь у побудові каналу та передачі іонів через нього, що не спостерігається в інших TRP каналах. Однією з особливостей цієї підродини є відсутність N-кінцевих анкеринових повторів, які зазвичай спостерігаються в інших підродинах [10,81].

Найбільш вивченим каналом серед підродини TRPM каналів є TRPM8 - це неселективний,  $Ca^{2+}$  проникний, випрямляючий назовні катіонний канал [83]. Він найбільш селективний щодо іонів  $Ca^{2+}$  із коефіцієнтом селективності ( $P_{Ca}/P_{Na}$ ) - 3,3 [84]. Ці канали беруть участь у відчуттях болю, терморегуляції, функції сечового міхура та раку. Активуються при температурах  $<28^{\circ}C$ , хімічними речовинами - ментолом, евкалиптолом, іціліном. Температурний поріг можна регулювати за рахунок змін мембранного потенціалу, арахідонової кислоти, лізофосфоліпідів і  $PIP_2$  [83].

Локалізація TRPM8 зосереджена у клітинній мембрані, ендоплазматичному ретикулумі, головному та спинному мозках, гангліях і периферичних нервах, у легенях, шкірі, печінці, нирках, сечовому міхурі та статевій системі чоловіків, шлунку, товстій кишці і судинах. Повідомлялося про експресію TRPM8 в аферентних нейронах, мієнтеріальному сплетенні та епітеліальних клітинах

дистального відділу товстої кишки миші [85,86], а також у ГМ шлунку та товстої кишки щурів [87].

#### 1.2.4. Роль TRPV4 та TRPM8 іонних каналів у порушенні скоротливої функції кишечника

Іони  $\text{Ca}^{2+}$  є важливим компонентом в організмі, який контролює скорочення ГМ, скелетних м'язів, ріст нейронів і вивільнення медіаторів [88]. Концентрація  $\text{Ca}^{2+}$  регулюється іонними каналами, помпами та обмінниками. Важливу роль у цьому процесі відіграють потенціалзалежні  $\text{Ca}^{2+}$  канали та рецепторкеровані неселективні катіонні канали, в тому числі і TRP канали [77].

Крім регуляції скоротливої функції ГМ, дані канали задіяні в міграції, проліферації, продукції цитокінів, хемокінів, позаклітинних матричних білків, факторів росту, молекул адгезії клітинної поверхні і навіть антиген презентації [89]. Скорочення ГМ залежить від підвищення внутрішньоклітинної концентрації  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , де залучаються різні  $\text{Ca}^{2+}$  канали плазмалеми ( $\text{Ca}^{2+}$  канали L- і T-типу та незалежні від напруги  $\text{Ca}^{2+}$  канали) [90]. Більшість  $\text{Ca}^{2+}$ -проникних TRP каналів низькоселективні для  $\text{Ca}^{2+}$  з проникністю співвідношення відносно  $\text{Na}^+$  ( $P_{\text{Ca}}/P_{\text{Na}}$ ) у діапазоні від 0,3 до 10 [84].

Скорочення ГМ ШКТ регулюється завдяки парасимпатичній сигналізації через мускаринові рецептори. M2- та M3-мускаринові рецептори індукують неспецифічний мускариновий катіонний струм ( $mI_{\text{CAT}}$ ), який активує керовані напругою  $\text{Ca}^{2+}$  канали та запускає скорочення ГМ [91].

Внутрішньоклітинний  $\text{Ca}^{2+}$  має вирішальне значення для розвитку скоротливої реакції та регуляції ГМ [92]. Моторика ШКТ залежить від скорочувальної активності ГМ кишечника [93]. Крім того, порушення гомеостазу  $\text{Ca}^{2+}$  у нейрональних клітинах призводить до зниження нейрональних функцій і нейродегенеративних захворювань, таких як ХП [94–96].

Агоніст TRPV4 GSK1016790A пригнічує скоротливу активність товстої кишки та збільшує гальмівну нейротрансмісію. *In vivo* активація TRPV4 пригнічує моторику кишечника та затримує дефекацію у мишей. Недавнє дослідження продемонструвало експресію TRPV4 у нейронах ENS та їх роль у регуляції моторики кишечника мишей. Активація TRPV4 пригнічує моторику ШКТ, зменшуючи NO-залежне вивільнення  $Ca^{2+}$  в ентэральних нейронах [16].

Луо та ін. [72] показали, що експресія TRPV4 іонних каналів опосередковує скорочення кишечника шляхом впливу на гладеньком'язові клітини (ГМК) товстої кишки незалежно від ENS. Вони також показали, що TRPV4 іонні канали, впливаючи на функцію кишкових *muscularis macrophages* (макрофаги м'язової оболонки ШКТ, MMs), сприяють моториці ШКТ безпосередньо взаємодіючи з ГМК. MMs-специфічні TRPV4 критично необхідні як для нормального функціонування кишечника, так і за патологічних станів скоротливої функції кишечника.

TRPM8 активується при низьких температурах ( $<28^{\circ}C$ ), а капсазепін (антагоніст TRPM8 рецепторів) пригнічує скорочення, викликане охолодженням. Також TRPM8 може брати участь у змінах випорожнення шлунка після вживання холодної їжі. Активація TRPM8 ментолом бере участь у розслабленні товстої кишки миші і людини, в індукованому охолодженням скороченні шлунка щура і клубової кишки морської свинки [18]. TRPM8 канали експресуються в дистальному відділі товстої кишки людини. Ліганд-залежна активація TRPM8 каналів здатна зменшувати спонтанну рухливість товстої кишки шляхом відкриття  $Ca^{2+}$ -залежних- $K^{+}$  каналів з великою провідністю [17].

Проте, чи залучені TRPV4 чи TRPM8 іонні канали в патогенетичні зміни моторної функції кишечника при ХП, ще належить дослідити.

1.2.5. Роль TRP іонних каналів у проникності епітеліального та ендотеліального бар'єрів кишечника

Більшість досліджень ролі TRP каналів у проникності судин проводилися *in vitro*, TRP канали опосередковують підвищення внутрішньоклітинної концентрації  $[Ca^{2+}]_i$  у відповідь на різні стимули. Зміни концентрації іонів  $Ca^{2+}$  в ендотеліальних клітинах необхідні для змін цитоскелетної та клітинної адгезії молекул, залучених до сприяння проникності судин. Збільшення концентрації  $[Ca^{2+}]_i$  збільшує проникність судин або знижує трансендотеліальний електричний опір (TEER). Відомо, що TRP канали формують ендотеліальний бар'єр у легенях, і саме це стосується TRPC каналів в ендотеліальних клітинах легень. TRPC іонні канали є найбільш вивченими каналами TRP в ендотеліальних клітинах [97].

Незважаючи на сотні досліджень TRP каналів у різних епітеліальних та ендотеліальних тканинах, дослідження, спрямовані спеціально на бар'єрну функцію епітелію, крім шкіри, є рідкісними. Деякі з найбільш механістичних досліджень ролі TRP каналів у епітеліальній проникності були проведені в епітеліальних клітинах слинних залоз. У цих клітинах парацелюлярна проникність була збільшена через опосередковану капсаїцином стимуляцію TRPV1, що супроводжувалося ультраструктурними змінами в тісних з'єднаннях і перебудовами f-актину [98].

Експресія ендотеліального TRPV4 збільшується в слизовій та підслизовій оболонках товстої кишки, а епітеліального TRPV4 - зменшується за DSS-індукованого коліту (dextran sulphate sodium colitis). Експресія TRPV4 у ендотеліальних клітинах кровоносних судин сприяє прогресуванню запалення товстої кишки за рахунок підвищення проникності судин [99]. Показано, що фармакологічна блокада TRPV4 знижує рівень прозапальних цитокінів та підтримує ендотеліальну функцію за LPS-індукованої септичної моделі у мишей. За умов запалення агоністи TRPV4 стимулюють аферентні нейрони товстої кишки і підсилюють її механочутливі реакції [78]. Було припущено, що активація TRPV4 може впливати на вроджений імунітет, спрямовуючи кишкові епітеліальні клітини до прозапального фенотипу, таким чином викликаючи або підсилюючи дисфункцію кишечника та підтримання запального стану. Рівні

метаболітів жирних кислот, які безпосередньо активують іонний канал TRPV4 (епоксиейкозатрієнова кислота, EET) також збільшуються в товстій кишці пацієнтів із запальними захворюваннями кишечника (ЗЗК) [100].

Yamawaki та ін. [101] показали, що TRPV4 іонні канали можуть регулювати трансепітеліальний транспорт речовин у ШКТ. Активація TRPV4 каналів призводить до зниження трансепітеліальної резистентності (TER) у культурі клітин IEC-6 (*Intestinal Epithelial Cells*) і, як наслідок, викликає їх гіперпроникність. Капсаїцин пригнічує кишкову секрецію Cl<sup>-</sup> і сприяє абсорбції Na<sup>+</sup> шляхом блокування каналів TRPV4 у здорових мишей і мишей із колітом [102].

Вважається, що TRPM8 іонний канал відіграє важливу роль у гальмуванні вісцеральних больових сигналів та зменшенні запальних станів при синдромі подразненого кишечника, оскільки активація TRPM8 зменшує запалення товстої кишки, як у тваринних моделей [103], так і у людей [104]. Крім того, було доведено, що G-білки беруть участь у регуляції TRPM8, зокрема Gαq бере участь в опосередкованому інгібуванні запалення TRPM8 каналами [83].

### 1.3. Вуглецеві наночастинки типу C<sub>60</sub> фулерени, як потенційні коректори розладів моторної функції ШКТ у терапії хвороби Паркінсона

Wang та ін. [105] повідомили, що C<sub>60</sub> фулерени та деякі його похідні можуть ефективно запобігати перекисному окисленню та руйнуванню мембран, викликаному вільними радикалами, а також є більш ефективними в інгібуванні перекисного окислення ліпідів, ніж вітамін E, який є природним антиоксидантом. Крім того, вони можуть послабити певні запальні процеси (наприклад, артрит і гостре запалення у щурів) і, можливо, полегшити відновлення пошкодженої тканини [106,107].

Незважаючи на те, що C<sub>60</sub> фулерен широко досліджувався для низки біомедичних застосувань з використанням моделей *in vivo* [108–111], але дані

присвячені вуглецевим наноматеріалам у патологіях ЦНС, наприклад ХП, обмежені [112]. Zha та ін. [113] виявили, що лише при низьких концентраціях водорозчинні похідні  $C_{60}$  фулерену виявляють нейропротекторний ефект і підвищують життєздатність нейронів гіпокампу. Антиоксиданти на основі  $C_{60}$  фулерену демонструють нейропротекторні властивості проти ексайтотоксичних, апоптотичних і метаболічних порушень у культурах кортикальних клітин [114].

Взаємозв'язок  $C_{60}$  фулеренів з TRPV4 та TRPM8 каналами ще не виявлено. Було показано, що два підвиди TRP каналів - TRPC4 та TRPC6, які експресуються в ШКТ, є мішенями для головного парасимпатичного нейромедіатора ацетилхоліну та подальшої передачі сигналів через G-білки, що лежить в основі холінергічної деполяризації ГМК і подальшої активації потенціалзалежних  $Ca^{2+}$  каналів, надходження  $Ca^{2+}$  у клітини та скорочення ГМ. У процесі збудження скорочення  $mI_{CAT}$  активується через M2/Gi/o та M3/Gq/11/PLC/IP3 системи. Таким чином, TRPC4 як основний компонент  $mI_{CAT}$  [115] є однією з фармакологічних мішеней для лікування розладів вісцеральної моторики ГМ [116,117].

Дринь та ін. [117] показали, що застосування первинного водного розчину  $C_{60}$  фулерену ( $C_{60}FAS$ ) пригнічує потік мускаринових катіонів у міоцитах клубової кишки, що узгоджується з інгібуванням G-білків. Інгібуючий ефект  $C_{60}FAS$  на  $mI_{CAT}$  був незалежним від напруги, він розвивався повільно та незворотно. Також було показано, що  $C_{60}FAS$  не впливають на керовані напругою канали  $K_V$ , що експресуються в тому ж типі клітин, і це може говорити про перспективну селективність  $C_{60}FAS$  як нового класу терапевтичних засобів для лікування гіперактивності вісцеральних ГМ [117].

Попередні дослідження показали, що вуглецеві наноструктури мають здатність взаємодіяти з різними білками, такими як іонні канали і рецептори, зокрема з  $K^+$  каналами. Відомо, що  $K^+$  канали також відіграють важливу роль у скорочувальній активності ГМ. Після їх активації, яка сприяє відтоку  $K^+$ , відбувається гіперполяризація мембрани, зниження припливу  $Ca^{2+}$  через напругозалежні канали  $Ca^{2+}$  L-типу та релаксація ГМ. Мельник та ін. [118]

показали, що  $C_{60}FAS$  можуть зв'язуватися з  $VK_{Ca}$  каналами у їх відкритій конформації та спеціально блокують канал, експресований у міоцитах ГМ, таким чином протидіючи ендотелій-залежній вазорелаксації. Автори зробили висновок, що  $C_{60}FAS$  представляють новий клас модуляторів  $VK_{Ca}$  каналів у васкулатурі, які в майбутньому можуть бути перспективними терапевтичними засобами для лікування дисфункції скорочень ГМ.

Вплив  $C_{60}FAS$  на ранні НМС (скоротливу функцію кишечника, нейродегенерацію) ХП досі не вивчений, але виходячи з вищесказаного  $C_{60}FAS$  можуть бути перспективними препаратами при лікуванні ХП.

### Узагальнення до розділу

Хвороба Паркінсона (ХП) — це нейродегенеративне захворювання, що характеризується втратою DA нейронів в SNpc та відкладенням інтранейрональних агрегатів  $\alpha$ -синуклеїну [1].

Крім моторних симптомів хвороби існують НМС, які навіть більше ускладнюють життя хворих. Більшість НМС, таких як порушення нюху, закрепи, депресія, розлади поведінки уві сні можуть проявлятися ще за 20 років до початку класичних моторних симптомів [4]. Негативним результатом порушень ШКТ є зниження біодоступності ліків, адже більшість антипаркінсонічних препаратів вводяться саме перорально, а отже і швидкість їх абсорбції в ШКТ є дуже важливою для досягнення необхідного ефекту.

Базуючись на цих спостереженнях, була запропонована гіпотеза, про периферичне походження ХП. Згідно неї, накопичення  $\alpha$ -синуклеїну спочатку відбувається у підслизових/мієнтеральних нейронах ENS, яке потім поширюється через блукаючий нерв до довгастого мозку. Звідси, можливі патологічні зміни рухаються рострально, у результаті чого виникають клінічні симптоми ХП [68,119].

В останні роки все більше з'являється інформації про взаємозв'язок нейродегенеративних хвороб (у тому числі і ХП) та змін в діяльності TRP каналів [10–12]. Вони широко розповсюджені у тканинах ссавців, включаючи легені, печінку, серце, нирки, ЦНС, шкіру, слинні й потові залози, епітеліальні клітини, ендотелій судин, ГМ, хондроцити і нейрони [72,76]. Родина TRPV4 та TRPM8 каналів присутня в м'якотермальних та/або вісцеральних аферентних волокнах або епітелії травного тракту, і задіяна в безлічі шлунково-кишкових патологічних станах, включаючи ЗЗК. TRPV4 беруть участь у патофізіології запалення, гіперчутливості, скоротливій і бар'єрній функціях кишечника [14]. TRPM8 пригнічують скорочення кишечника та можуть брати участь у процесах дефекації після вживання холодної їжі [18].

Хоча роль TRP каналів в організмі активно вивчається, але конкретна роль TRPV4 та TRPM8 іонних каналів у ШКТ при ХП взагалі не досліджена.

Крім того, лікування ХП зосереджується лише на зменшенні симптомів хвороби. Одним із ключових патологічних тригерів патогенезу ХП є OS, який індукує мітохондріальну дисфункцію з подальшою активацією клітин нейроглії, інфільтрацією Т-лімфоцитів з наступним хронічним запаленням та агрегацією  $\alpha$ -синуклеїну, що в кінцевому підсумку призводить до дегенерації DA нейронів [34].  $C_{60}$  фулерен та деякі його похідні можуть ефективно запобігати перекисному окисленню та руйнуванню мембран, викликаному вільними радикалами, а також є більш ефективними в інгібуванні перекисного окислення ліпідів, ніж вітамін Е, який є природним антиоксидантом. Але вплив  $C_{60}$ FAS на ранні НМС (скоротливу функцію кишечника, нейродегенерацію) ХП досі не вивчений, тому виходячи з вищесказаного  $C_{60}$ FAS можуть бути перспективними препаратами при лікуванні ХП.

## РОЗДІЛ 2

### МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

#### 2.1. Реактиви та матеріали

У роботі були використані наступні реактиви:

- виробництва «Sigma-Aldrich», США: lipopolisaccharide (LPS) (*Escherichia coli* O111:B4, cat. L2630), 6-гідроксидофамін (6-OHDA), ротенон, кетамін (каліпсол), дезипрамін, паргілін, апоморфін гідрохлорид, карбахолін, GSK1016790A, ментол, молібдат амонію, ФІТС-декстран, тріс(гідроксиметил)амінометан, етилендіамінтетраоцтова кислота (ЕДТА), додецилсульфат натрію (ДСН).

- виробництва «Merck», Німеччина: трихлороцтова кислота, гідроксид натрію, дітіонітробензойна кислота (реактив Елмана), тіобарбітурова кислота, азид натрію, трет-бутилгідропероксид, глутатіон відновлений, 2,4-динітрохлорбензол;

- різне: ксилазин («Alfasan International B.V», Нідерланди), NaCl (ЗАО «Інфузія», Україна), силіконове масло (ООО «СТЕП-ЕЛЕКТРОНІКА», Україна), аскорбінова кислота (Лекхім-Харків ПРАТ), водний розчин 3% карміну червоного (ЭКО РЕСУРС, Україна), тіопентал натрію («ARTERIUM», Україна), діамінобензидин (DAko, EnVision Flex, США), реагент блокування пероксидази (peroxidase blocking reagent, DAko, EnVision Flex, США), target retrieval solution (Dako, Envision Flex, США), промивний буфер (Artisan), диференційно-діагностичні середовища (HiMedia Laboratories Pvt. Ltd., Індія);

- антитіла: первинні антитіла до тирозингідроксилази (TH) (Millipore, AB152, США), первинні поліклональні антитіла до TRPM8 (Invitrogen, OSR00077W), первинні поліклональні антитіла до TRPV4 (Abcam, ab39260), вторинні біотинізовані антитіла (мишачі анти-кролячі sc-2357, Santa Cruz Biotechnology);

- C<sub>60</sub>FAS - чистота 99,96% був наданий проф. Ю.І. Прилуцьким (ННЦ «Інститут біології та медицини»), проф. У. Ріттер та проф. П. Шарф (Технічний університет Ільменау, Німеччина).

Інші реактиви кваліфікації х.ч. або ч.д.а. («Хімлаборреактив», Україна).

## 2.2. Експериментальні тварини

Досліди були проведені на 123 дорослих щурах-самцях лінії Wistar масою 200-250 г та на 30 білих лабораторних мишах (лінія BALB/c) масою 30 г, яких утримували в акредитованому віварії ННЦ «Інститут біології та медицини» Київського національного університету ім. Т. Шевченка за стандартних умов: температурний режим - 21-23<sup>0</sup> С, цикл освітлення-темрява - 12/24 год, вологість - 30-35% та раціону харчування (комбікорм для лабораторних тварин (миші, щури) Рецепт ПК 120-1). Проведення експериментів здійснювали згідно вимог біоетичної комісії Київського національного університету імені Тараса Шевченка (протокол №4 від 3 жовтня 2019 р.; №1 від 1 липня 2022 р.) та відповідно до «Європейської конвенції про захист хребетних тварин для експериментальних та інших наукових цілей» (Страсбург, 1986). Початком експерименту вважався 1-й день введення діючої або контрольної речовини.

## 2.3. Схема експерименту

Для дослідження порівняльної характеристики двох моделей паркінсонізму щури були випадковим чином розподілені на 4 групи згідно з протоколом (Рис. 2.1.): I група (n=15) – плацебо-оперовані щури, у мозок щура вводили 4 мкл 0,9% стерильного фізіологічного розчину (SPS); II група (n= 15) – щури з 6-OHDA-ХП, у мозок вводили 12 мкг 6-OHDA в 4 мкл SPS; III група (n=13) –плацебо-оперовані щури, у мозок вводили 2 мкл 0,9% SPS; IV група (n=10) – щури LPS-

ХП, у мозок вводили 10 мкг LPS в 2 мкл SPS. Усі речовини вводили за допомогою стереотаксичної установки. Аутопсію проводили через 4 тижні після операції.



Рис. 2.1. Схема дослідження при дослідженні порівняльної характеристики 6-OHDA та LPS моделей ХП та віддалених наслідків 6-OHDA моделі ХП.

Для дослідження віддалених наслідків ХП щурів випадковим чином розподіляли на 4 групи (Рис. 2.1): I група (n=5) – плацебо-оперовані щури, у мозок щура вводили 4 мкл 0,9% SPS; аутопсія через 1 місяць після операції; II група (n=5) – щури з 6-OHDA-ХП, у мозок вводили 12 мкг 6-OHDA в 4 мкл SPS, аутопсія через 1 місяць після операції (n=5); III група (n=4) – плацебо-оперовані щури, у мозок щура вводили 4 мкл 0,9% SPS, аутопсія через 7 місяців після операції; IV група (n=5) - щури з 6-OHDA-ХП, у мозок вводили 12 мкг 6-OHDA в 4 мкл SPS, аутопсія через 7 місяців після операції. Усі речовини вводили за допомогою стереотаксичної установки.

Для дослідження змін у ШКТ за ротенонової моделі ХП на мишах, тварин було поділено на 2 групи (Рис. 2.2.): I група (n=15) – плацебо, мишам вводили соняшникову олію, у дозі 1 мл/кг, *i.p.*; II група (n=15) – ротенонова модель паркінсонізму, мишам вводили 2,5 мг/кг ротенону розведеного у соняшниковій олії в дозі 1 мл/кг, *i.p.*, щоденно впродовж 28 днів. Аутопсія проводилася на 50-й день експерименту.

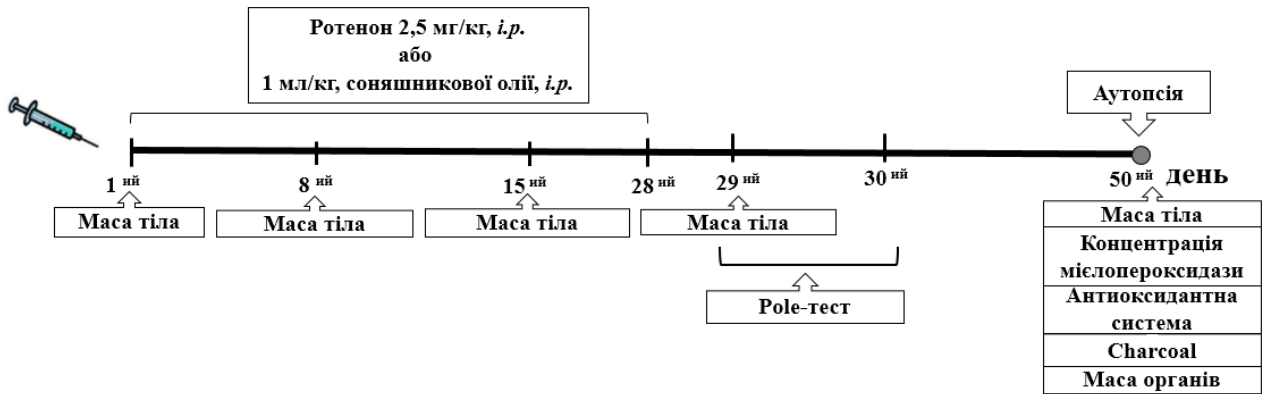


Рис. 2.2. Схема дослідження при ротеноновій моделі ХП у мишей.

Для дослідження ефекту  $C_{60}$ FAS за 6-OHDA-ХП щури були випадковим чином розподілені на 4 групи відповідно до протоколу (Рис. 2.3.): I група (n=13) – плацебо-оперовані щури, щодня вводили 0,1 мл SPS (*i.p.*, 10 днів); II група (n=16) – щури з 6-OHDA-ХП, щодня отримували 0,1 мл SPS (*i.p.*, 10 діб); III група (n=5) – плацебо-оперовані щури, щоденно вводили 1 мл (0,15 мг/мл)  $C_{60}$ FAS у дозі 0,65 мг/кг (*i.p.*, 10 діб); IV група (n=16) – 6-OHDA-ХП, щодня отримували 1 мл (0,15 мг/мл)  $C_{60}$ FAS у дозі 0,65 мг/кг (*i.p.*, 10 днів). Усі сполуки вводили з 2-го по 11-й день дослідження. Аутопсія проводилася на 21-й день експерименту.

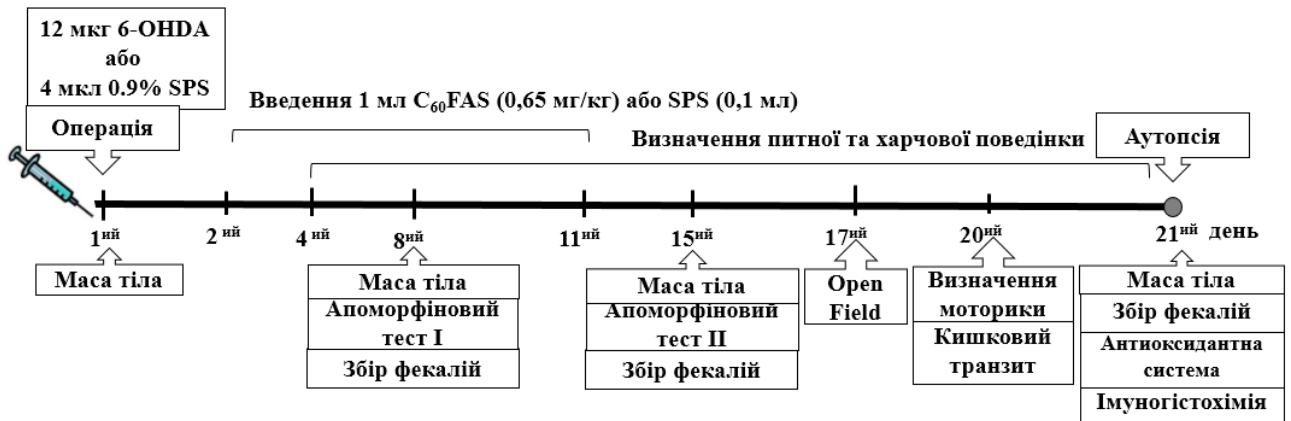


Рис. 2.3. Схема дослідження при дослідженні ефекту  $C_{60}$ FAS за 6-OHDA моделі ХП.

$C_{60}$ FAS отримано та охарактеризовано з чистотою понад 99,96% [120]. Метод заснований на перенесенні  $C_{60}$  фулеренів з органічного розчину у водну фазу шляхом ультразвукової обробки. Концентрація  $C_{60}$  фулеренів у воді

становила 0,15 мг/мл. Приготовлений C<sub>60</sub>FAS стабільний протягом 12 місяців при температурі +4 °С. Важливо зазначити, що відповідно до попереднього дослідження [121] максимальна переносима доза C<sub>60</sub>FAS становить 721 мг/кг для *i.p.* введення мишам.

Апоморфіновий тест, масу тіла, харчову та питну поведінки, вміст води у фекаліях, моторику товстої кишки, кишковий транзит, склад мікробіоти, вуглеводний склад слизу, Open Field тест, Pole тест, вестерн-блот аналіз, стан антиоксидантної системи, імуногістохімічні дослідження проводили в дослідних точках згідно з протоколами, наведеними на Рис. 2.1.-2.3.

Щурів та мишей евтаназували шляхом інгаляції CO<sub>2</sub> з подальшою дислокацією шийних хребців. Усі експерименти повторювали двічі, дані обох експериментів об'єднували та усереднювали.

## 2.4. Моделювання хвороби Паркінсона на тваринних моделях

### 2.4.1. Моделювання 6-OHDA-індукованого паркінсонізму

Руйнування DA нейронів правої півкулі мозку проводили шляхом одностороннього стереотаксичного введення мікроін'єктором 12 мкг селективного нейротоксину 6-OHDA (Sigma, США) в *medial forebrain bundle* [122]. 6-OHDA розчиняли в 4,0 мкл SPS (0,9% NaCl, ВАТ «Інфузія», Україна) з додаванням 0,1% аскорбінової кислоти (як стабілізатора, що пригнічує окислення 6-OHDA). Розчин готували в день операції. Плацебо-оперованій групі щурів (контрольній групі) вводили 4 мкл SPS.

Щурів наркотизували сумішшю кетаміну (75 мг/кг, «Sigma», США) розведеного у SPS та 2% ксилазину (100 мкл/щур, «Alfasan International B.V», Нідерланди), який вводили *i.p.* загальним обсягом 1 мл. Щурів поміщали у стереотакс (СЄЖ-4), модифікований для щурів. Тварин скальпували та трепанували, використовуючи наступні координати (мм) від брегми: AP = -2,2;

ML = 1,5; DV = 8,8. Після цього тваринам вводили паргілін (40 мг/кг, *i.p.*, Sigma, США) для інгібування метаболічної конверсії 6-OHDA моноамінооксидазою та дезипраміном (25 мг/кг, *i.p.*, Sigma, США) для блокування захоплення нейротоксину норадренергічними нейронами. Через 30 хвилин у мозок вводили 6-OHDA або 0,9% SPS вглибину на відстані 8,8 мм від брегми. Усі мікроінфузії відбувалися зі швидкістю 1 мкл/15 с. Після цього мікроін'єктор залишався в мозку ще 5 хв. Далі мікроін'єктор витягували, а тварині накладали шви на м'які тканини голови.

#### 2.4.2. Моделювання LPS-індукованого паркінсонізму

Хронічний дефіцит дофаміну лівої півкулі моделювали шляхом одностороннього руйнування DA нейронів SNpc, яке викликали шляхом стереотаксичних мікроін'єкцій 10 мкг ендотоксину LPS (Lipopolysaccharides з *Escherichia coli* O111:B4, cat. L2630 Sigma) в 2,0 мкл SPS. Розчин готували в день операції. Всі етапи операції та анестезія ідентична до 6-OHDA моделі (див. пп. 2.4.1.). Ендотоксин безпосередньо вводили в SNpc за наступними координатами: AP=-5,3; ML=±2,0; DV=-7,2 [123]. Контрольній групі тварин замість LPS вводили 2 мкл SPS (плацебо-оперовані).

#### 2.4.3. Моделювання ротенон-індукованого паркінсонізму

Моделювання ХП у мишей (лінії BALB/c) виконували шляхом *i.p.* введення ротенону (Sigma, США) у дозі 2,5 мг/кг [124]. Ротенон розводили у соняшниковій олії (2,5 мг/мл) (щодня готували новий розчин). Групі плацебо *i.p.* вводили соняшкову олію в дозі 1мл/кг, *i.p.* Речовини вводили в один і той же проміжок часу доби щоденно, впродовж 28 днів.

## 2.5. Поведінкові тести

### 2.5.1. Визначення ротаційної поведінки щурів за допомогою апоморфінового тесту у щурів

Інтенсивність циркуляторних рухів у щурів у бік, контралатеральний відносно півкулі, в яку вводили токсин, реєстрували впродовж 30 хвилин за дії агоніста дофамінових рецепторів - апоморфіну (0,5 мг/кг, *i.p.* Sigma, США) на 8-й (1-й тиждень експерименту) та 15-й (2-й тиждень експерименту) дні після операції. Дані виражені у вигляді повних обертів навколо своєї осі за 30 хв. Інтенсивність обертання позитивно корелює з відсотком зруйнованих DA нейронів в одній півкулі. Кількість обертів, яка менше 180 обертів/30 хв відображає приблизно 70% або менше зруйнованих DA нейронів; більше 180 обертів/30 хв – відповідає 90-100% руйнування [122].

### 2.5.2. Визначення поведінкових реакцій за допомогою Open field тесту у щурів

Поведінковий Open field тест проводили в камері - 80 см (довжина) x 80 см (ширина) x 40 см (висота), дно поділене на 36 квадратів (відкрите поле). Під час експерименту кожну тварину окремо поміщали в центр відкритого поля та реєстрували їхню активність за допомогою цифрової камери («Casio® EX-Z850», Китай) протягом 3 хв. Цифрова камера знаходилася над центром поля на висоті 1 м. Реєстрували наступні поведінкові параметри: рівень тривожності за латентним періодом виходу з центру поля та кількістю відвідувань центру поля з периферії, рухова активність за загальним числом пересічених квадратів (горизонтальна активність), кількістю вставань на задні лапи, час стояння на задніх лапах, грумінг (тривалість вмивань твариною) протягом тестового періоду

(вертикальна активність). Після кожної тварини камеру промивали і давали висохнути [125].

### 2.5.3. Визначення поведінкових реакцій за допомогою Pole тесту у мишей

Оцінка рухових розладів у мишей, яка пов'язана із базальними гангліями досліджувалась за допомогою Pole тесту [125] на 29-й день (тренування) та 30-й день (дослід) експерименту, тобто на 1-й та 2-й день після відміни введення ротенону або контрольної речовини. Дослідження проводились на дерев'яній жердині діаметром 1 см та висотою 50 см, яка була прикріплена до пінопластової основи. Додатково жердина обмотувалася прозорим скотчем для кращого зчеплення мишей з поверхнею. Конструкцію поміщали у клітку з тирсою, в якій жили миші увесь час (звичні умови існування). Тварину поміщали на верхівку жердини головою доверху. Початок експерименту ( $T_0$ ) вважали, коли тварина починала рух.  $T_{\text{turn}}$  – час, який тварина витратила на оберт головою донизу на 180 градусів та здійснила обхват верхніми та нижніми кінцівками жердини повністю.  $T_{\text{total}}$  – час, який тварина витратила на поворот на спуск до основи та всіма кінцівками доторкнулася до пінопластової основи. Граничний час вважали: для повороту - 30 с, загальний час - 60 с. Якщо тварина зупинялася під час спускання по жердині – дослід повторювали. Якщо тварина не поверталася головою донизу, а спускалася увесь час боком по жердині, тоді загальний час  $T_{\text{total}}$  записували як  $T_{\text{turn}}$ . Якщо в тварини були пошкоджені кінцівки і це могло вплинути на результати тесту, то таку тварину виключали з експерименту. Коли тварина одразу падала із жердини у клітку, то призначалися максимальні бали  $T_{\text{turn}}$  - 10 с,  $T_{\text{total}}$  - 15 с. Pole-тест для кожної тварини проводили 5 разів, дані усереднювали по кожній тварині, а потім по групі. Поверхня жердини між тестуванням кожної тварини очищалися безворсими вологими серветками для видалення запахів.

## 2.6. Визначення маси тіла дослідних тварин

Вимірювання маси тіла у щурів проводили на 1-й день експерименту (до операції), на 8-й, 15-й, 21-й, 28-й дні та 7 місяць експерименту. Вимірювання маси тіла мишей проводили на 1-й день (до початку введення речовин), а також на 8-й, 15-й, 21-й, 29-й та 50-й дні експерименту. Початкову масу тіла (1-й день) тварин вважали за 100% і перераховували подальшу масу у відсотках по відношенню до 1-го дня експерименту.

## 2.7. Моніторинг харчової та питної поведінки

Для визначення кількості спожитої води та їжі кожен тварину відсаджували в окрему клітку на 3 дні з вільним доступом до води та їжі (період адаптації до нових умов). Через 24 год (на 4-й день) вимірювали об'єм води та кількість їжі з 14-го до 21-го дня експерименту (впродовж 7 днів), а також у віддалені терміни паркінсонізму на 7 місяць експерименту (впродовж 7 днів); за дії  $C_{60}FAS$  показники визначали з 4-го по 11-й день (період введення  $C_{60}FAS$ ) та з 12-го по 21-й день експерименту (період після відміни  $C_{60}FAS$ ).

Кількість спожитої води та їжі усереднювали по кожній тварині за 7 днів експерименту, а потім усереднювали по групі.

## 2.8. Визначення вмісту води у фекаліях

Для визначення вмісту води у фекаліях збирали свіжі фекалії щурів та зважували на 8-й, 15-й та 21-й дні експерименту ( $m_w$  – волога маса). Висушували в термостаті при  $T=60^{\circ}C$  впродовж 24 год ( $m_d$  – суха маса). Розрахунок вмісту води ( $W$ , %) проводили за наступною формулою:  $W = 100 - (m_d * 100\% / m_w)$  [72].

## 2.9. Вимірювання моторно-евакуаторної функції шлунково-кишкового тракту

### 2.9.1. Визначення кишкого транзиту водного розчину кармінового червоного у щурів

Вимірювання моторно-евакуаторної функції ШКТ визначали за часом транзиту по ШКТ щура 0,5 мл 3% водного розчину кармінового червоного (ЕСО Resource, Україна) після його перорального введення. Після введення тварину поміщали в чисту клітку без підстилки. Щури мали вільний доступ до води та їжі. Час, коли вводили карміновий червоний, записували як  $T_0$ . Через 120 хвилин після введення речовини, кожні 10 хвилин відбувався контроль на наявність червоного барвника у фекальних гранулах. Загальний час проходження ШКТ розглядався як інтервал між  $T_0$  і часом першого виявлення кармінового червоного в калі [126].

### 2.9.2. Визначення кишкого транзиту активованого вугілля (Charcoal) у мишей

Мишей утримували 24 години без їжі з вільним доступом до води. Активоване вугілля (Charcoal) готували у вигляді суспензії в 0,5 % (w/v) карбоксиметилцелюлозі та вводили *per os* через зонд у об'ємі 0,25 мл на мишу.  $T_0$  – введення 0,25 мкл активованого вугілля та давання корму тваринам. Через 40 хв мишей умертвляли для дослідження кишкового транзиту [127].

Після лапаротомії шлунок і тонку кишку обережно видаляли з кардії до ілеоцекального з'єднання. Шлунок, у т.ч. його вміст зважували (у грамах), а потім розрізали і промивали фізіологічним розчином. Надлишок вологи видаляли і зважували порожній шлунок. Тонку кишку обережно розтягували і вимірювали загальну довжину (у см). Визначали відстань, яку подолала їжа з

активованим вугіллям від пілоричного сфінктера до з'єднання клубово-сліпої кишки і виражали у відсотках від загальної довжини кишки.

Кишковий транзит визначається, як положення вугілля, виражене у відсотках від загальної довжини тонкої кишки, що розраховується наступним чином:

$$\text{Відстань кишкового транзиту (\%)} = \frac{\text{відстань, яку пододало вугілля (см)}}{\text{довжина тонкої кишки (см)}} \times 100$$

Індекс випорожнення шлунку розраховували таким чином:

Індекс спорожнення шлунка (г) = маса повного шлунка (г) – маса порожнього шлунка (г).

### 2.9.3. Дослідження моторної активності дистального відділу товстої кишки за допомогою методу балонографії *in vivo*

Для визначення моторної активності дистального відділу товстої кишки методом балонографія *in vivo* [128] тварин знеболювали тіопенталом (50 мг/кг, *i.p.*, ПП «Дарниця», Україна) та проводили трахеотомію. Латексний балончик вводили в товсту кишку на відстані 7 см від анального отвору. Балончик наповнювали 0,7 мл води ( $T_{\text{room}}$ ) до рівня, необхідного для індукування внутрішньокишкового тиску 10 см.вод.ст. і балончик приєднували до автоматизованого комплексу “МНХ-01”. Після 20 хв адаптаційного періоду впродовж 60 хв реєстрували спонтанну рухову активність товстої кишки. Після цього вводили карбахолін (AlfaAesar, США) у дозі 10 мкг/кг *i.p.* для реєстрації стимульованої моторики протягом наступних 60 хв. Для характеристики моторної функції товстої кишки визначали наступні параметри (Рис. 2.4.): індекс моторної активності (ІМА), індекс амплітудної активності (ІАА), фазний індекс (ФІ) та тонічний індекс (ТІ). Всі дані обраховувалися автоматично програмою P-metr та виражені у см.вод.ст. Після експерименту щурів умертвляли шляхом інгаляції  $\text{CO}_2$  з подальшою цервікальною дислокацією.

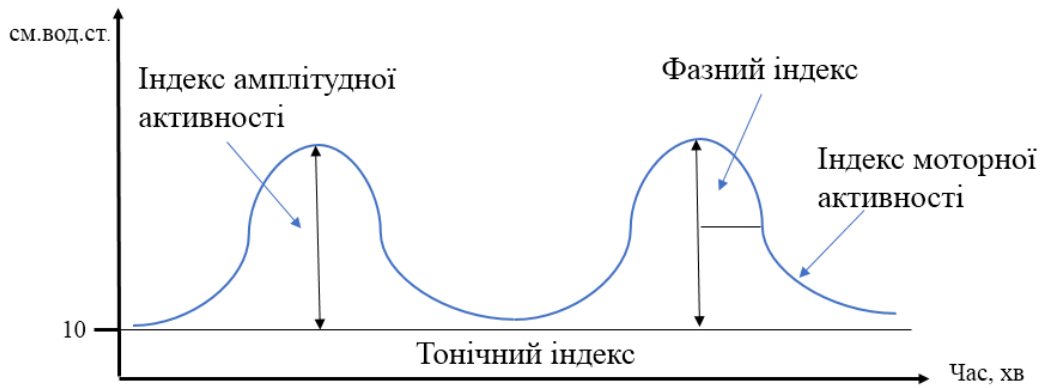


Рис. 2.4. Схема вимірюваних індексів, за якими визначали моторну активність дистального відділу товстої кишки щурів методом балонографії *in vivo*.

#### 2.9.4. Дослідження скоротливої активності ізольованої ділянки товстої кишки за допомогою методу балонографії *in vitro*

Нами було модифіковано балонографічний метод визначення скоротливої активності товстої кишки *in vivo* для дослідження скоротливої активності ізольованої ділянки товстої кишки *in vitro*. Для дослідження дії агоністів на скоротливу активність ізольованої ділянки товстої кишки тварин умертвляли шляхом інгаляції  $\text{CO}_2$  з подальшою цервікальною дислокацією. Після проведення аутопсії видаляли дистальний відділ товстої кишки на відстані 2 см від анального отвору, загальною довжиною 10 см та розрізали на 2 частини по 5 см у поперековому напрямку. Ізольовану кишку промивали розчином Кребса (мМ): 133 NaCl, 16,3  $\text{NaHCO}_3$ , 4,7 KCl, 2,73 CaCl, 1,05  $\text{MgCl}_2$ , 11,5 глюкози, 10 HEPES (pH=7,4). З проксимального кінця вставляли латексний балончик, який приєднували до автоматизованого комплексу “МНХ-01”, накладали лігатуру лише зі сторони балончика, поміщали у ванночку з розчином Кребса, підігрітим до  $37^\circ\text{C}$ , запускали в балончик 100 мкл дистильованої води. Відбувалася постійна циркуляція розчину Кребса за допомогою 4-канального

перистальтичного насоса IPS ISM 930 “Ismatec” (Німеччина) зі сталою швидкістю 5 мл/хв. Стабілізація тканини проводилася - 40 хв.

Для визначення ролі TRPV4 каналів у скоротливій активності дистального відділу товстої кишки проводили експеримент за протоколом, який проілюстрований на Рис. 2.5. Після стабілізації товстої кишки додавали карбахолін (1 мкМ, Sigma), а через 3 хв на фоні дії карбахоліну додавали агоніст TRPV4 каналів GSK1016790A (0,3 мкМ), запис скорочень проводили ще 15 хв.

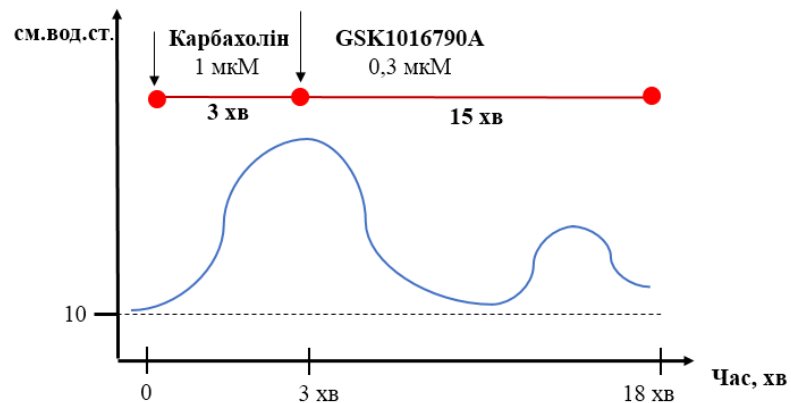


Рис. 2.5. Схематичне зображення протоколу експерименту для дослідження ролі TRPV4 іонних каналів у скоротливій функції товстої кишки за допомогою методу балонографії *in vitro*.

Для визначення ролі TRPM8 каналів у скоротливій функції товстої кишки після стабілізації тканини додавали карбахолін (1 мкМ, Sigma), а через 3 хв на фоні дії карбахоліну додавали етанол 96% (кінцева концентрація 0,02 %, контроль, розчинник ментолу) або агоніст TRPM8 каналів - ментол (100 мкМ, Sigma), запис скорочень проводили ще 15 хв (Рис. 2.6.).

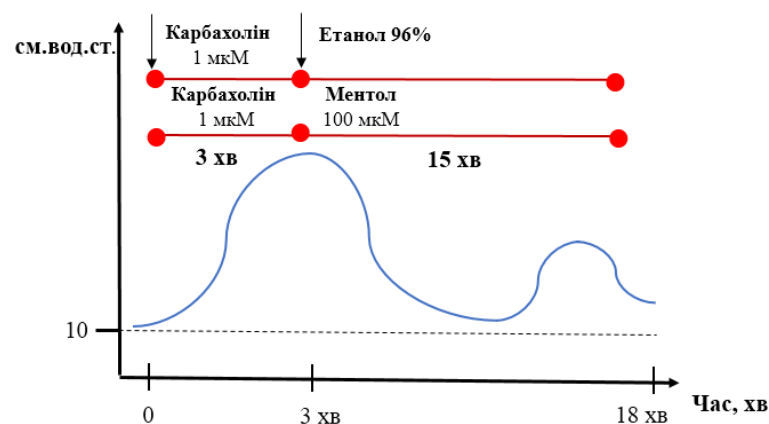


Рис. 2.6. Схематичне зображення протоколу експерименту для дослідження ролі TRPM8 іонних каналів у скоротливій функції товстої кишки за допомогою методу балонграфії *in vitro*.

Обрахунки проводили у програмі Clampfit 10.7. та реєстрували максимальний пік скорочення та площу під скороченням. Максимальний пік скорочень за дії карбахоліну виражали як 100%, а відповідь на дію агоністів перераховували у відсотковому співвідношенні по відношенню до відповіді на карбахолін.

2.9.5. Дослідження моторної активності гладеньких м'язів товстої кишки за допомогою методу тензометрії *in vitro*

Скоротливу активність ГМ дистального відділу товстої кишки досліджували в ізометричному режимі з використанням методу тензометричної реєстрації [72] за допомогою емнісних датчиків сили та комп'ютерної програми IRIS-USB. Використовували модифікований розчин Кребса (мМ): 133 NaCl, 16,3 NaHCO<sub>3</sub>, 4,7 KCl, 2,73 CaCl, 1,05 MgCl<sub>2</sub>, 11,5 глюкози, 10 HEPES (pH=7,4). Ізольовану частину товстої кишки поміщали в розчин Кребса та м'язову частину відділяли від слизової, підслизової та серозної оболонок. М'язову тканину розрізали на смужки розміром – 10×7 мм та поміщали в робочу камеру (об'ємом 30 мл) з проточним розчином Кребса. М'язові смужки закріплювали на двох сталевих гачках, один з яких був стаціонарно вмонтований у стінку камери, а інший приєднаний до штока тензодатчика. Для отримання оптимальної сили скорочення смужки ГМ піддавали пасивному натягу з силою 0,5 г. Тканину перфузували розчином Кребса зі сталою швидкістю 5 мл/хв за допомогою 4-канального перистальтичного насоса IPS ISM 930 "Ismatec" (Німеччина).

Скорочення індукували деполяризацією 80 мМ гіперкалієвим розчином. Гіперкалієвий розчин, готували методом ізотонічної заміни у вихідному розчині

Кребса необхідної частини іонів  $\text{Na}^+$  на еквімолярну кількість іонів  $\text{K}^+$ . Далі зразки відмивали впродовж 10 хв і додавали GSK1016790A (0,3 мкМ, Sigma) (агоніст TRPV4 каналів) або ментол (100 мкМ, Sigma) (агоніст TRPM8 каналів) (Рис. 2.7).

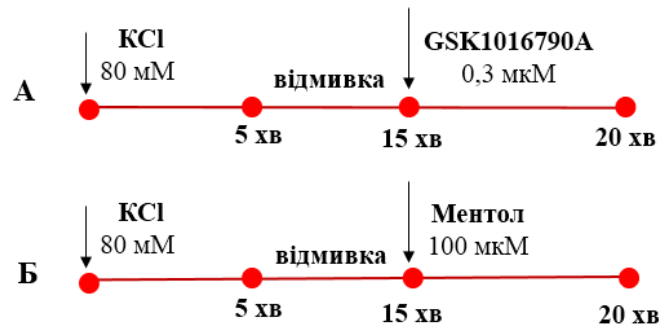


Рис. 2.7. Схематичне зображення протоколу експерименту для дослідження ролі TRPV4 (А) та TRPM8 (Б) іонних каналів на скоротливу функцію ГМ товстої кишки методом тензометрії *in vitro*.

## 2.10. Рестрація трансмембранної різниці потенціалів за допомогою камери Уссінга

Для рестрації трансмембранної різниці потенціалів після аутопсії у щурів вирізали проксимальний відділ товстої кишки (на відстані 7 см від цекуму в сторону анального отвору), розрізали вздовж по брижейці, відділяли повздовжний м'язовий шар, залишаючи лише слизовий та підслизовий. Використовували фрагмент товстої кишки проксимального відділу розміром 0,5 см<sup>2</sup> та кріпили на слайдер, який далі монтували у спеціальний отвір камери Уссінга. Кожна півкамера була заповнена 5 мл розчину Кребса-Рінгера (в мМ): 117 NaCl, 5,9 KCl, 24,8 NaHCO<sub>3</sub>, 1,2 NaHPO<sub>4</sub>\*2H<sub>2</sub>O (0,1M), 1,2 MgCl<sub>2</sub>, 2,5 CaCl<sub>2</sub> зі сталою температурою 37<sup>0</sup> C, та постійною аерацією карбогеном (95% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>). До півкамери, в якій омивається апікальна сторона товстої кишки (сторона з боку слизової оболонки), додавали 10 мМ/л маніту, а до півкамери, у якій омивалася латеральна сторона (сторона з боку підслизової оболонки) – 10 мМ/л

глюкози. Після того, як слайдер вмонтовано в камеру, стабілізували тканину до виходу струму короткого замикання на плато. Реєстрацію струму короткого замикання проводили в умовах фіксації напруги на 0 мВ ( $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ ). Транsepітеліальну резистентність реєстрували як відповідь на імпульс струму величиною 10  $\mu\text{A}$  [129].

Для дослідження ролі TRPV4 каналів (Рис. 2.8.): після стабілізації тканини (вихід на плато) здійснювали запис 20 хв, далі в 1-шу камеру додавали 0,01% ДМСО (розчинник агоніста), в 2-гу камеру додавали GSK1016790A (0,3  $\mu\text{M}$ , Sigma) (агоніст TRPV4 каналів). У кінці експерименту додавали розчин карбахоліну (кінцева концентрація в камері 50  $\mu\text{M}$ ) для дослідження дії антагоніста на  $\text{Ca}^{2+}$ -залежну секрецію йонів.

Значення струму короткого замикання для TRPV4 каналів визначали в стартовій точці, через 15, 30 та 45 хв експерименту.

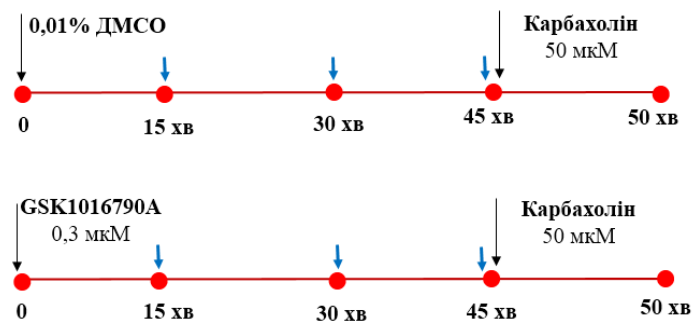


Рис. 2.8. Схематичне зображення протоколу експерименту для дослідження ролі TRPV4 іонних каналів у трансмембранній різниці потенціалів за допомогою камери Уссінга. ↓ - точки, в яких відбирали проби для визначення проникності epітеліального бар'єру товстої кишки за допомогою FITC-декстрану.

Для дослідження ролі TRPM8 каналів після стабілізації тканини додавали етанол 96% (кінцева концентрація 0,1 %, запис 5 хв) або ментол (100  $\mu\text{M}$ , Sigma) (запис 5 хв) – далі 50  $\mu\text{M}$  карбахоліну (проводили запис ще 40 хв) (Рис. 2.9.).

Значення струму короткого замикання TRPM8 каналів визначали в стартовій точці, через 5, 15, 30 та 45 хв експерименту.

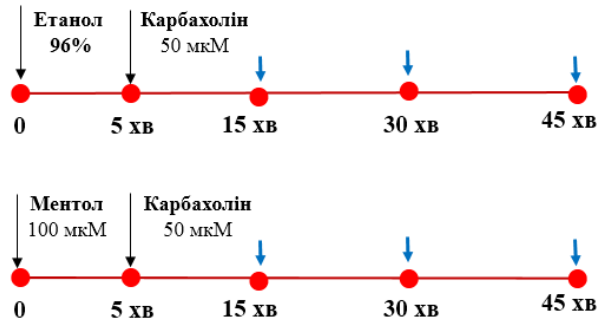


Рис. 2.9. Схематичне зображення протоколу експерименту для дослідження ролі TRPM8 іонних каналів у трансмембранній різниці потенціалів за допомогою камери Уссінга. ↓ - точки, в яких відбирали проби для визначення проникності епітеліального бар'єру товстої кишки за допомогою FITC-декстрану.

Для визначення проникності епітеліального бар'єру товстої кишки за дії агоністів та антагоністів TRPV4 та TRPM8 іонних каналів після стабілізації тканини з латеральної сторони кожної камери відбирали 500 мкл розчину, а з апікальної сторони додавали 500 мкл FITC-декстрану (фінальна концентрація 2 мг/мл). На 15, 30 та 45 хв від початку запису з латеральної сторони відбирали по 100 мкл і переносили зразки в чорну пляшку (Рис. 2.7-2.8.). Визначення інтенсивності сигналу FITC-декстрану у зразках здійснювали за допомогою спектрофотометра Synergy HT (BioTek Instruments, USA) за довжини хвилі збудження 485 нм та довжини хвилі поглинання 528 нм.

Значення коефіцієнта проникності ( $P_{app}$ ) виражали з рівняння Фіка та розраховували за наступною формулою:

$$P_{app} = \frac{J}{\Delta C}, \quad (1)$$

Оскільки:

$$J = \frac{\vartheta}{A \cdot t}, \quad (2)$$

$$\vartheta = \frac{C_1}{V}, \quad (3)$$

$$\Delta C = (C_0 - C_1), \quad (4)$$

то:

$$P_{app} = \frac{C_1}{V \cdot S \cdot t \cdot (C_0 - C_1)}, \quad (5)$$

Де:  $J$  – густина потоку речовини (моль/см<sup>2</sup>\*с);

$C_0$  – концентрація FITC-декстрану в розчині з латеральної сторони в початковий момент часу (моль/л);

$C_1$  – концентрація FITC-декстрану в розчині з апікальної сторони через відповідний проміжок часу інкубації (моль/л);

$V$  – об'єм розчину з апікальної сторони мембрани (л);

$S$  – площа досліджуваної ділянки тканини (см<sup>2</sup>);

$t$  – час перенесення FITC-декстрану через мембрану.

З огляду на співвідношення 1 л = 1000 см<sup>3</sup>, розмірність проникності виражали в см/с.

## 2.11. Бактеріологічний аналіз просвітної мікробіоти щурів

Мікробіологічному аналізу підлягали фекальні біоптати щурів-самців. Випорожнення відбирали у пробірки із 9 мл SPS в об'ємі до мітки 10 мл, після чого готували робочі десятикратні розведення з 10<sup>-1</sup> по 10<sup>-8</sup>. Кількісний склад мікробіоти товстої кишки визначали посівом граничних розведень на диференційно-діагностичні середовища з селективними властивостями (Ендо, цитратний агар Симонса, маніт-сольовий агар, залізо-сульфітний агар, Bifidobacterium Agar, Lactobacillus MRS Agar) виробництва HiMedia Laboratories Pvt. Ltd. (Індія) [130].

Відповідні розведення (Табл. 2.1.) висівали по 0,1 мл суспензії на диференційно-діагностичні середовища в чашки Петрі та по 0,5 мл суспензії в пробірки, в які наливали 4,5 мл поживного середовища, для культивування анаеробних бактерій.

Посіви культивували 24-72 години за 37<sup>0</sup>С. Подальшу ідентифікацію виділених мікроорганізмів здійснювали за морфологічними та тинкторіальними показниками.

Таблиця 2.1.

Адаптовані титри для виявлення основних представників просвітної мікробіоти товстої кишки щурів.

Комерційна назва середовища	Мікроорганізми, що ростуть на середовищі	Титр для засіву біоптату
Endo Agar	бактерії групи кишкової палички	$10^{-1}$ ; $10^{-3}$ ; $10^{-5}$
Simmons Citrate Agar	умовно-патогенні ентеробактерії	$10^{-1}$ ; $10^{-3}$
Iron Sulfite Agar	<i>Clostridium spp.</i>	$10^{-1}$ ; $10^{-3}$ ; $10^{-5}$
Mannitol Salt Agar Base	<i>Staphylococcus spp.</i>	$10^{-1}$ ; $10^{-3}$ ; $10^{-5}$
Bifidobacterium agar	<i>Bifidobacterium spp.</i>	$10^{-5}$ ; $10^{-7}$ ; $10^{-8}$
Lactobacillus MRS Agar	<i>Lactobacillus spp.</i>	$10^{-3}$ ; $10^{-5}$ ; $10^{-7}$

Кількісний склад усіх видів мікроорганізмів в 1 г біоптату визначали за допомогою формули:

$$S = A \times B \times V, \text{ де}$$

S - кількість мікроорганізмів 1 г або 1 см<sup>2</sup> біоптату;

A - кількість колоній, що виростили на чашці;

B - коефіцієнт посівної дози (при посіві 0,1 мл = 10; 1,0 мл = 1; 0,05 мл = 20).

V - ступінь розведення посівного матеріалу.

## 2.12. Визначення показників окисно-антиоксидантного балансу

Під час аутопсії виділяли праву півкулю головного мозку у щурів з 6-ОНДА-ХП (місце введення нейротоксину) та повністю виділяли мозок у мишей з ротеноновою моделлю. Мозок гомогенізували в рідкому азоті для визначення стану антиоксидантної системи: 1 - за допомогою 0,9% фізіологічного розчину для визначення активності каталази, тіолових (SH)-груп білка та реактивності тіобарбітурової кислоти (ТБК-активні сполуки); 2 – у 0,01 М фосфатному буфері (рН=7,5) для визначення відновленого глутатіону (GSH), глутатіонпероксидази (GP), глутатіон-S-трансферази (GST).

### 2.12.1. Визначення каталазної активності

Активність каталази в мозку оцінювали колориметрично в реакції з 0,03% розчином  $\text{H}_2\text{O}_2$  [131,132]. Далі зразки витримували 10 хвилин при кімнатній температурі та зупиняли реакцію 4% молібдатом амонію (Альфарус, Україна). Вимірювання проводили за довжини хвилі 410 нм. Каталазну активність розраховували за формулою:

$$E = \left( \frac{A_{\text{хол}} - A_{\text{досл}}}{a \text{ мг білка} * 22000 * 10} \right) * 10^9 \text{ нмоль} \text{H}_2\text{O}_2 / \text{хв} * \text{мгбілка},$$

$E$  – каталазна активність;  $A_{\text{хол}}$  і  $A_{\text{досл}}$  - екстинція холостої та дослідної проб; 22000 – коефіцієнт мілімолярної екстинкції перекису водню,  $\text{мМ}^{-1} \times \text{см}^{-1}$ , 10 – час інкубації, хв,  $a$  – вміст білку в пробі, мг. Активність визначали у  $\text{мкмоль} \text{H}_2\text{O}_2$  на хвилину на 1 мг білка.

### 2.12.2. Визначення вмісту ТБК-активних сполук

Для визначення рівня ТБК-активних сполук до зразків додавали тріс-НСІ буфер (25 мМ тріс, 175 мМ КСІ, рН=7,4) [132,133]. Потім білок денатурували 20% трихлороцтовою кислотою (Merk, Німеччина) і центрифугували 15 хв при 1000 g. До супернатанту додавали 0,8% тіобарбітурової кислоти (Merk, Німеччина) та інкубували на киплячій водяній бані впродовж 15 хв. Вимірювання проводили за довжини хвилі 532 нм. Вміст ТБК-активних сполук виражали у нмолях на 1 мг білка та розраховували на основі молярного коефіцієнта екстинкції малонового діальдегідного комплексу з 2-тіобарбітуровою кислотою ( $\epsilon = 1,56 \times 10^5 \text{ см}^{-1} \times \text{М}^{-1}$ ) за формулою:

$$C = E_{\text{досл}} / a * \epsilon$$

де  $C$  – вміст ТБК-активних сполук,  $E_{\text{досл}}$  – значення екстинції досліджуваних зразків,  $a$  – вміст білка в пробі.

### 2.12.3. Визначення вмісту білкових тіолових груп

Для визнання загального рівня SH-груп у мозку проби змішували з 30 мМ трис-НСІ з 1 мМ ЕДТА (рН=8). Далі витримували 15 хв з 1,25% додецилсульфат натрію при  $T_{room}$ . Після додавання реактиву Елмана проби витримували в темному місці 30 хв. Для вимірювання небілкових SH-груп зразки змішували з 10,5% трихлороцтовою кислотою (Альфарус, Україна) і центрифугували при 3000 об/хв протягом 15 хвилин. Супернатант нейтралізували 1М NaOH. До нейтралізованих проб додавали 30 мМ трис-НСІ буферу з 1 мМ ЕДТА (рН=8,0). Потім зразки інкубували з реактивом Елмана 30 хв у темряві. Вимірювання проводили за довжини хвилі 412 нм. Рівень білкових SH-груп (ммоль/г білка) розраховували за допомогою коефіцієнта молярної екстинкції аніона тринітрофенолу  $14,15 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  [132,134].

Визначення вмісту білкових SH-груп проводили за формулою:

$$C_{\text{білкові}} = C_{\text{загальні}} - C_{\text{небілкові}}$$

Вміст SH-груп розраховували за формулою:

$$\frac{E}{14,15 \cdot a_{\text{пт}}} = \text{мм SH-груп/мг білка}, \text{ де}$$

$E$  – екстинкція проби;  $14,15 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  – коефіцієнт молярної екстинкції тіонітрофенільного аніона,  $a$  – кількість білку, мг.

### 2.12.4. Визначення відновленого глутатіону

Для визначення рівня відновленого глутатіону (GSH) послідовно до проб додавали: 0,1 М трис-НСІ буфер з 6 мМ ЕДТА (Sigma, США) (рН=8,5), 20% сульфосаліцилову кислоту (Merck, Німеччина). Рівень GSH оцінювали на основі його здатності окислюватися 5,5-дітіобіс-2-нітробензойною кислотою (Merck, Німеччина), що призводить до утворення дисульфіду глутатіону (Merck, Німеччина) та 5-тіо-2-нітробензойної кислоти (Merck, Німеччина), що мають

максимум поглинання при 412 нм [135]. Рівень GSH був кількісно визначений за допомогою калібрувальної кривої.

#### 2.12.5. Визначення глутатіон-пероксидази

Активність глутатіон-пероксидази (GP) оцінювали шляхом вимірювання невитраченого GSH після його додавання до реакційної суміші (0,1 М трис-НСІ буфер з 6 мМ ЕДТА (рН=8,5), 12 мМ NaN<sub>3</sub> та 4,8 мМ GSH (Merk, Німеччина) та t-бутил гідропероксиду (Merk, Німеччина). Реакцію зупиняли 20% трихлороцтовою кислотою. Вимірювання проводили за довжини хвилі 412 нм, l=0,5 см проти свого контролю. Активність ферменту виражали у нмоль GSH на 1 мг білку за калібрувальним графіком [136].

#### 2.12.6. Визначення глутатіон-S-трансферази

Загальну активність глутатіон-S-трансферази (GST) оцінювали шляхом вимірювання кон'югації 2 мМ 1-хлоро-2,4-динітробензолом (Merk, Німеччина) з GSH, що супроводжується збільшенням поглинання за довжини хвилі 340 нм Використовували молярний коефіцієнт екстинкції [137]. Розрахунок результатів проводили за формулою:

$$A = \frac{\Delta E * V_{\text{проби}} * 10^6}{V * l * \varepsilon * t}$$

$\Delta E$ -різниця екстинції до і після інкубації без величини різниці екстинції в контролі,  $V_{\text{проби}}$  – загальний об'єм проби,  $\varepsilon = 9600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ , екстинція для глутатіон-S-2,4,-динітробензойної кислоти,  $V$  – об'єм білку, який вносили,  $l$  – довжина хвилі,  $t$  – час інкубації.

### 2.13. Визначення складу поверхневого слизу кишечника щурів

Товсту кишку розрізали і занурювали в пробірки з 9 мл розчину 6н N-ацетил-1-цистеїну для визначення вмісту глікопротеїнів, гексоз, фукоз, гексозамінів та сіалових кислот у поверхневому слизі товстої кишки. Пробірки перемішували впродовж 4 хв на вортексі, зразки центрифугували при 3000 g впродовж 15 хв. Відбирали надосад, залишаючи у пробірці осад та надосадову рідину загальним об'ємом 1 мл. Вміст пробірок гомогенізували на диспергаторі T10 basic ULTRA-TURRAX® (IKA, Німеччина) при швидкості 5 (20500 rpm) впродовж 20 с [132].

#### 2.13.1. Визначення концентрації загальних глікопротеїнів слизу

Гомогенат слизу змішували з dH<sub>2</sub>O та 20% сульфосаліциловою кислотою і залишали на 10 хв [132]. Проби фільтрували, потім до них додавали 5% фосфорновольфрамової кислоти в 2 н HCl. Через 15 хв зразки центрифугували впродовж 15 хв при 7000 g, супернатант зливали.

Пробірки з осадом перевертали вверх дном та висушували на фільтрувальному папері. Осад розчиняли в 0,1 н NaOH та додавали 10% NaOH та реактиву Фоліна. Екстинцію вимірювали через 10 хв при  $\lambda=630$  нм. Розрахунок концентрації глікопротеїнів проводили за калібрувальною кривою на основі екстинкції тирозину у концентраціях 500 мкг/мл, 400 мкг/мл, 250 мкг/мл, 200 мкг/мл, 160 мкг/мл, 100 мкг/мл, 50 мкг/мл. Концентрацію глікопротеїнів виражали в мг на 1 мл слизу.

#### 2.13.2. Визначення концентрації гексоз слизу орциновим методом

Слиз гідролізували з 4 н HCl (1:1) впродовж 1 год при 100 °С [132,138]. Гідролізат слизу змішували з 0,1 н NaOH, додавали орциновий реактив (75 мл реактиву А: 60 мл H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>конц, 40 мл H<sub>2</sub>O; 10 мл реактиву Б: 0,16 г орцин, 10 мл dH<sub>2</sub>O) і нагрівали на водяній бані при 80°C впродовж 15 хв. Екстинцію вимірювали при довжині хвилі 500 нм. Розрахунок концентрації гексоз проводили за калібрувальною кривою. Концентрацію гексоз виражали в мкмоль на 1 мл слизу.

### 2.13.3. Визначення концентрації фукози слизу за методом Діше-Шеттлз

Гомогенат поверхневого слизу товстої кишки щурів гідролізували з 4 н HCl (1:1) впродовж 1 год при 100 °С [132,139]. Відбирали 100 мкл гідролізату слизу та додавали розчин H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>конц в dH<sub>2</sub>O (6:1) та інкубували 10 хв при T<sub>room</sub>. Потім ставили на 3 хв у киплячу водяну баню, далі – різко охолоджували на льоду. В кожну пробірку вносили 3% солянокислий цистеїн і залишали проби на 1 год при T<sub>room</sub> у темному місці до появи жовто-зеленого забарвлення. Екстинцію вимірювали при 396 нм та 430 нм проти контролю. Різниця між показниками екстинкції при 396 нм та 430 нм відповідала вмісту фукози. Концентрацію фукози виражали в мкмоль на 1 мл слизу.

### 2.13.4. Визначення концентрації гексозамінів слизу

Для визначення концентрації гексозамінів у поверхневому слизі товстої кишки зразки гідролізували з 8н HCl при 100 °С впродовж 5 год [132,140]. Гідролізат слизу нейтралізували 3н NaOH до слабо-лужної реакції. До вмісту нейтралізованого гідролізату слизу додавали ацетилацетоновий реактив. Зразки ставили на киплячу водяну баню на 15 хв. Після охолодження додавали 96% етанол та реактив Ерліха. Через 30 хв вимірювали екстинцію при 540 нм.

Результати обраховували за калібрувальною кривою, що була побудована за результатами екстинції стандартних розведень (10, 8, 6, 4, 2, 1 мкмоль/мл) d-глюкозамінгідрохлориду. Концентрацію гексозамінів виражали в мкмоль на 1 мл слизу, який був отриманий у результаті його виділення бн N-ацетил-1-цистеїном.

#### 2.13.5. Визначення концентрації сіалових кислот слизу методом Гесса

Концентрацію сіалових кислот визначали за методом Гесса [132,138]. До гідролізату слизу додавали 10% розчин трихлороцтової кислоти. Проби витримували на киплячій водяній бані впродовж 5 хв, охолоджували проточною водою впродовж 5 хв та центрифугували 10 хв при 7000 g. До супернатанту додавали оцтово-сірчанокислу суміш (5% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> в льодовій оцтовій кислоті). Проби нагрівали на водяній бані при температурі 100 °C впродовж 30 хв. Екстинцію вимірювали при 546 нм. Концентрацію сіалових кислот у зразках слизу визначали за калібрувальним графіком для N-ацетилнейрамінової кислоти (0,8 мг/мл; 0,6 мг/мл; 0,4 мг/мл; 0,2 мг/мл; 0,1 мг/мл) та виражали в мкмоль на 1 мл слизу.

#### 2.14. Визначення мієлопероксидази

Вимірювання мієлопероксидази (МРО) у поверхневому слизі товстої кишки проводили за H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-залежного окиснення о-дианізидин гідрохлориду [141]. До зразка додавали НТАВ буфер. Мікропробірки із зразками проводили через 3 цикли: 1 хв у рідкому азоті, 10 хв на водяній бані при T=37 °C. Проби сонікували протягом 10 с на ультразвуковому дезінтеграторі при вихідній силі струму – 0,5 А. Далі проби центрифугували впродовж 15 хв при 14 000 rpm, T=4 °C. В супернатанті визначали активність МРО на спектрофотометрі при 450 нм. Калібрували за допомогою стандартного розчину МРО.

## 2.15. Визначення оксигензалежної біоцидності перитонеальних макрофагів за допомогою НСТ-тесту

Мононуклеарні фагоцити перитонеального ексудату щурів отримували за методом, який описаний Pietrangeli та ін. [142]. Після евтаназії тварин в умовах стерильності оголяли область черева, обережно знімаючи шкіру. У черевну порожнину вводили 5 мл охолодженого розчину Хенкса і після масування відбирали рідину за допомогою стерильного шприца з товстою голкою в охолоджені пробірки. Отриману суспензію клітин двічі відмивали впродовж 10 хв при 1500 g і розводили в середовищі RPMI-1640, доводячи кількість клітин до необхідної концентрації в залежності від задачі експерименту. Виходячи із результатів фарбування розчином трипанового синього, в отриманих суспензіях, як правило, містилось не менше 85-98% живих макрофагів.

Для визначення оксигензалежної біоцидності перитонеальних макрофагів застосовували спонтанний та стимульований НСТ-тест. Тест проводили у 96-лункових плоскодонних планшетах за обліку результатів спектрофотометричним методом при довжини хвилі 540 нм. Для цього спочатку готували зразки суспензії клітин для аналізу. Проводили розведення клітин перитонеальних макрофагів у суспензії до концентрації  $1 \times 10^5$  на лунку. Вносили отриману суспензію клітин на 96-лунковий планшет. У дослідні проби для визначення спонтанної активності вносили 0,1 мл нітросинього тетразолію (НСТ) у розведенні – 20 мг НСТ у 10 мл фосфатно-буферного розчину. Для визначення стимулювальної активності додавали – 0,1 мл НСТ і 10 нг/мл форбол-12-меристат-13-ацетат (РМА), як додатковий стимул за стандартних умов. У контрольні лунки вносили тільки 0,1 мл фосфатного буферу. Клітини інкубували впродовж 1 години за температури 37°C в CO<sub>2</sub> інкубаторі. Після інкубації планшет центрифугували впродовж 10 хв за 1000 об/хв. Супернатант видаляли, а до осаду вносили 0,2 мл метанолу. Проводили повторне центрифугування за тих самих умов. Після видалення супернатанту в усі лунки додавали 0,1 мл КОН і 0,1 мл ДМСО, вміст акуратно піпетували. Облік результатів проводили

спектрофотометричним методом при довжині хвилі 540 нм. Спонтанну активність перитонеальних макрофагів виражали в умовних одиницях. Відсоток стимуляції активності перитонеальних макрофагів розраховували за формулою:

$$(C_T - C_P) / C_P \times 100\%, \text{ де}$$

$C_P$  – показник оптичної густини спонтанної проби;

$C_T$  – показник оптичної густини стимульованої форбол-12-меристат-13-ацетатом проби.

## 2.16. Вестерн-блот аналіз

Екстракт слизової оболонки товстої кишки щурів, що містить 100 мкг протеїнів, змішували з 2x Laemmli буфером (1:1), кип'ятили 5 хв при 95 °С. Розділення білків проводили методом електрофорезу у 8% поліакриламідному гелі з наступним переносом на нітроцелюлозну мембрану Hybond-ECL. Електрофоретичне розділення білків здійснювали за напруги 150V (60-80 хв), перенос на нітроцелюлозну мембрану за напруги 60V (3 год) з охолодженням.

Мембрану промивали буферним розчином TBST (10 мМ тріс-НСl, 150 мМ хлорид натрію, 0,05% поліоксиетиленсорбітан монолаурат (Твін-20), (рН=7,4) 4 рази по 10 хв. Первинні антитіла: ТН (1:200, Millipore, АВ152, США), TRPM8 поліклональні (1:200, Invitrogen, OSR00077W) або TRPV4 поліклональні(1:200 Abcam, ab39260) розводили у TBST та інкубували ніч за  $T_{room}$  на шейкері. Мембрану промивали в TBST тричі по 10 хв. Наносили вторинні антитіла (1:200, мишині анти-кролячі sc-2357, Santa Cruz Biotechnology) на 1 год. Мембрану промивали в TBST 5 разів по 5 хв.

Візуалізація проводилася ECL-реагентом ( $H_2O$  – 9 мл, 1М тріс-НСl для ECL-реагенту – 10 мл, 68 мМ кумарова кислота – 225 мкл, 1,2 мМ люмінол – 500 мкл). Свічення фіксували на радіографічній плівці (ОНІКО, Україна) після занурення плівки у проявник та фіксатор. Одержані зображення сканували за допомогою

сканера (Canon PIXMA MP235). Денситометричний аналіз проводили за допомогою LI-COR Image J 1.8.0. Молекулярну масу білків визначали за маркером молекулярної маси (CHEMICON International Inc., США). Результати були проаналізовані та нормалізовані проти  $\beta$ -актину [132].

## 2.17. Імуногістохімічні дослідження

Для імуногістохімічного дослідження щурів анестезували тіопенталом (50 мг/кг, *i.p.*) і транскардіально перфузували 100 мл крижаного гепаринізованого фізіологічного розчину (5000 ОД/л), а потім 150 мл 4% параформальдегіду (рН=7.4). Після транскардіальної перфузійної фіксації мозок та 1 см товстої кишки щурів (на відстані 1 см від анального отвору) видаляли, після чого фіксували в 4% параформальдегіді.

Парафінові зрізи товщиною 5 мкм депарафінували, демаскували епітопи розчином Target Retrieval (50x) протягом 15 хвилин (DAKO, EnVision Flex, DM828, США), блокували ендogenous пероксидазою за допомогою реагенту, що блокує пероксидазу, протягом 3 хвилин (DAKO, EnVision Flex, DM827, США), промивали у dH<sub>2</sub>O та у промивному буфері (50x, Artisan), інкубували у 4% сухому знежиреному молоці протягом 20 хв. 30-хвилинна інкубація в T<sub>room</sub> з первинними антитілами: TH (1:200, Millipore, AB152, США), TRPM8 поліклональні (1:200, Invitrogen, OSR00077W) або TRPV4 поліклональні (1:200 Abcam, ab39260), а потім вторинні антитіла (1:200, мишині анти-кролячі sc-2357, Santa Cruz Biotechnology) протягом 30 хв, T<sub>room</sub>. Впродовж 5 хв (для мозку) та 2 хв (для товстої кишки) використовували систему виявлення імунореактивності діамінобензидину (DAKO, EnVision Flex, DM827, США).

Інтенсивність TH-, TRPV4- та TRPM8-позитивного фарбування, у мозку та товстій кишці оцінювали за напівкількісною шкалою за допомогою кількісних методів оцінки (як описано [[http://www.ihcworld.com/ihc\\_scoring.htm](http://www.ihcworld.com/ihc_scoring.htm)]) (Табл.

2.2.). Результати оцінюються шляхом множення відсотка позитивних клітин (P) на інтенсивність (I) і представлені у вигляді швидкої оцінки (Q):  $Q = P \times I$ .

Таблиця 2.2.

Напівкількісна шкала для оцінки інтенсивності TH-, TRPV4- та TRPM8- позитивного фарбування методом кількісної оцінки:

<b>Оцінка</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>
<b>TH-позитивні клітини, %</b>	<10	10-25	25-50	50-75	>75
<b>Інтенсивність забарвлення</b>	н/в	слабке забарвлення	помірне забарвлення	сильне забарвлення	н/в

### 2.18. Статистична обробка результатів

Експериментальні дані обробляли статистично за допомогою програми OriginPro8. Побудову графіків виконували у програмі GraphPad Prism 8.0.2 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, United States). Перевірку вибірок на нормальний розподіл здійснювали за допомогою критерію Shapiro-Wilk.

Для виявлення наявності достовірних відмінностей між двома вибірками та приналежності їх до нормального розподілу використовувати t-критерій Стьюдента. У разі ненормального розподілу використовувати Mann-Whitney Test.

При одночасному порівнянні трьох та більше вибірок використовували однофакторний дисперсійний аналіз ANOVA або Kruskal-Wallis ANOVA. Перевіряли на нормальність за допомогою критерію Shapiro-Wilk, після цього перевіряли на рівність дисперсій тестом Levene. Для апостеріорного аналізу використовували тести Turkey та Fisher LSD.

Достовірними вважали результати за умови значення ймовірності  $P < 0,05$ . Результати представлені як середнє арифметичне  $\pm$  стандартна похибка середнього ( $M \pm SD$ ).

### РОЗДІЛ 3

## ПОРІВНЯЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА СТАНУ МОТОРНО-ЕВАКУАТОРНОЇ ФУНКЦІЇ ШКТ ТА АСОЦІЙОВАНИХ З НИМИ РОЗЛАДІВ ЗА РІЗНИХ МОДЕЛЕЙ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНО-ІНДУКОВАНОГО ПАРКІНСОНІЗМУ У ЩУРІВ ТА МИШЕЙ

Для вивчення різних аспектів патології ХП, недостатньо проаналізувати історії хвороби пацієнтів з діагнозом ХП. Тому з цією метою були розроблені експериментальні моделі ХП, які реалізуються на лабораторних тваринах, таких як щурі, миші та деякі примати [143]. Експериментальні моделі ХП поділяються на генетичні моделі та моделі індуковані хімічними агентами різного походження [144].

На першому етапі нашого дослідження ми провели пошук релевантної та легко-відтворюваної хімічно-індукованої моделі для дослідження молекулярних механізмів шлунково-кишкових розладів за ХП та тестування потенційних лікувальних чи профілактичних засобів.

### 3.1. Характеристика 6-OHDA та LPS-індукованого паркінсонізму у щурів

6-OHDA та LPS є двома нейротоксинами, які часто використовуються для моделювання ХП, особливо у гризунів [145–148]. Однією з переваг 6-OHDA моделі ХП є можливість оцінити втрату DA нейронів та відповідні функціональні зміни в ураженій півкулі, залишаючи іншу півкулю (без пошкоджень) для контролю. 6-OHDA модель ХП індукує дегенерацію DA нейронів і виснаження дофаміну у смугастому тілі шляхом прямого OS в організмі [149]. Тоді як LPS модель індукує OS шляхом значної активації мікроглії та селективній втраті DA нейронів у нігтростріальній системі [150].

Наше дослідження мало на меті оцінити взаємозв'язок між ступенем нейродегенерації (рівень та локалізація TH в SNpc, апоморфіновий тест, поведінкові та локомоторні порушення) та розвитком порушень з боку ШКТ, які є клінічно характерними для хворих на ХП (моторика товстої кишки, зміни мікробіоти), на моделі 6-OHDA- та LPS-індукованої ХП у щурів.

### 3.1.1. Ступінь руйнування дофамінергічних нейронів середнього мозку у щурів з індукованим паркінсонізмом

Першим етапом дослідження було оцінити відсоток зруйнованих DA нейронів SNpc у щурів з модельованим паркінсонізмом за допомогою апоморфінового тесту. Апоморфін є агоністом DA-рецепторів, діючи постсинаптично, викликає гіперстимуляцію гіперчутливих D<sub>1</sub> і D<sub>2</sub> дофамінових рецепторів у денервованому смугастому тілі та викликає обертання в протилежну сторону від ураження [151]. Це обертання також спостерігається після введення L-DOPA, ймовірно, через реакцію, спричинену дофаміном, що продукується L-DOPA, і посилюється в присутності гіперчутливих рецепторів на стороні денервації [149,151,152].

У нашому дослідженні індуковані апоморфіном оберти у щурів 6-OHDA-ХП на 1-му тижні експерименту (8-й день після операції) становили  $80,04 \pm 64,37$  обертів/30 хв, тоді як на 2-му тижні експерименту (15-й день після операції) значення зросли на 44 % ( $115,19 \pm 94,17$  обертів/30 хв,  $P < 0,05$ ) (Рис. 3.1.А).

У щурів з LPS-ХП показники апоморфінового тесту між 1-м та 2-м тижнями експерименту вірогідно не відрізнялися ( $48,10 \pm 46,25$  та  $50,10 \pm 41,55$  обертів/30 хв відповідно) (Рис. 3.1.А). Апоморфін-індукований тест показав, що у 17 з 21 щурів 6-OHDA-ХП і у 13 з 20 щурів LPS-ХП кількість обертів між 1-м і 2-м тестом на апоморфін була збільшена. У щурів контрольних груп до 2-го тижня експерименту кількість обертів зменшилася на 52% (плацебо-оперовані 6-OHDA) і на 40% (плацебо-оперовані LPS).

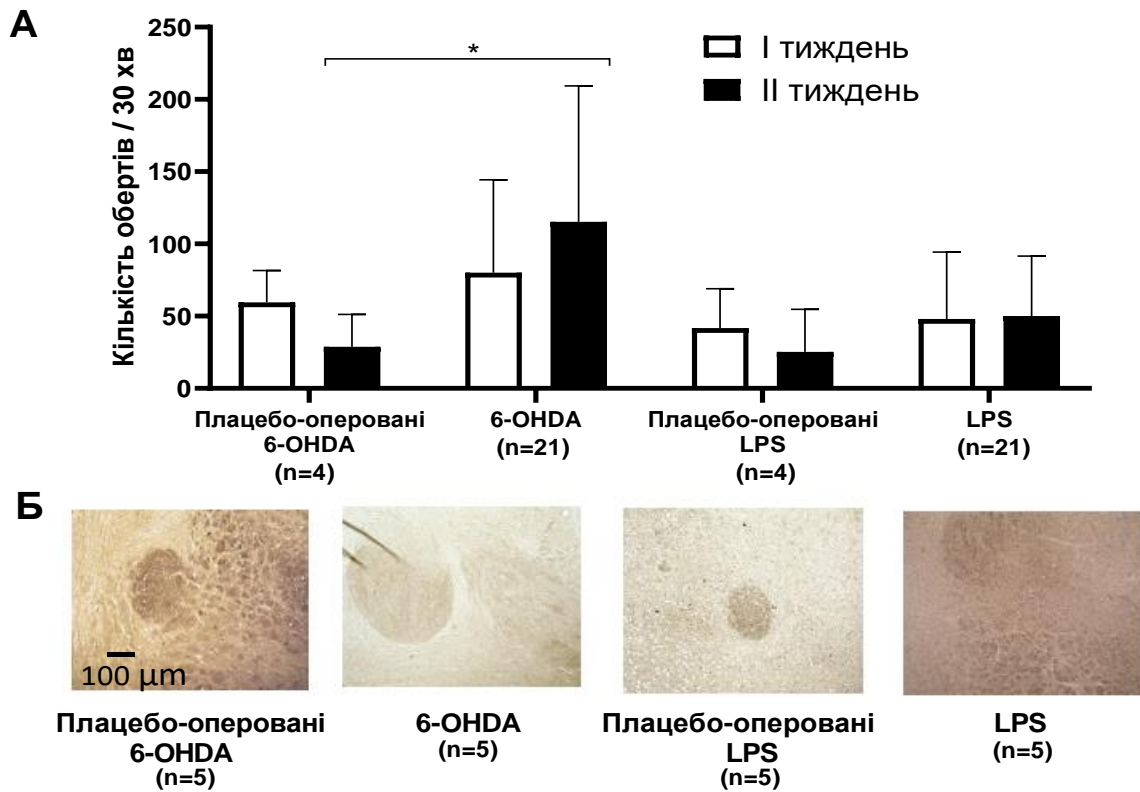


Рис. 3.1. Оцінка нейродегенерації центральних DA нейронів у щурів з 6-OHDA та LPS моделями ХП: А – індукована апоморфіном обертальна поведінка у щурів між 1-м та 2-м тижнями після моделювання ХП,  $n=50$ ; Б – мікрофотографії ТН-позитивного імунофарбування (коричневий колір) DA нейронів на парафінових зрізах середнього мозку щурів (5 мкм) на рівні SNpc,  $n=20$  (x50). \* $P < 0,05$  ( $M \pm SD$ ).

Для подальшого дослідження рівня дегенерації DA нейронів ми провели імуногістохімічні дослідження інтенсивності забарвлення ТН у середньому мозку. Імуногістохімічно ми спостерігали, що у щурів контрольної групи 6-OHDA-ХП 50-75% нейронів середнього мозку були ТН-позитивними ( $Q=6,0 \pm 0,0$ ), тоді як у щурів з 6-OHDA-індукованою ХП було приблизно 10-25% ТН-позитивних клітин ( $Q=2,0 \pm 1,4$ ) ( $P < 0,001$ ). У групі LPS-ХП інтенсивність забарвлення ТН-позитивних клітин зменшилася до  $Q=1,0 \pm 0,00$  ( $P < 0,001$ ) порівняно зі значеннями відповідної контрольної групи ( $Q=2,8 \pm 0,0$ ) (Рис. 3.1.Б).

### 3.1.2. Зміни поведінкових та локомоторних реакцій щурів з індукованим паркінсонізмом

Далі ми дослідили наскільки різниця в ступені безпосереднього ураження DA нейронів за обох моделей 6-OHDA- та LPS-індукованого паркінсонізму асоційована зі ступенем порушення поведінкових та локомоторних реакцій, які визначали в Open field тесті.

Ми виявили 4-кратне збільшення латентного періоду виходу з центру поля у щурів з 6-OHDA-ХП порівняно з відповідною контрольною групою ( $P < 0,05$ ) (Рис. 3.2.А) і відсутність змін у групі щурів з LPS-ХП. Кількість відвідувань центру поля з периферії зростає незначно в групі щурів з 6-OHDA-ХП ( $3,75 \pm 3,50$  раз відносно  $2,42 \pm 1,68$  раз у плацебо-оперованих 6-OHDA щурів) (Рис. 3.2.Б). У той час, як кількість відвідувань центру поля з периферії зменшилася в 2,6 рази у групі щурів з LPS-ХП порівняно з відповідною групою плацебо-оперованими ( $P < 0,05$ ).

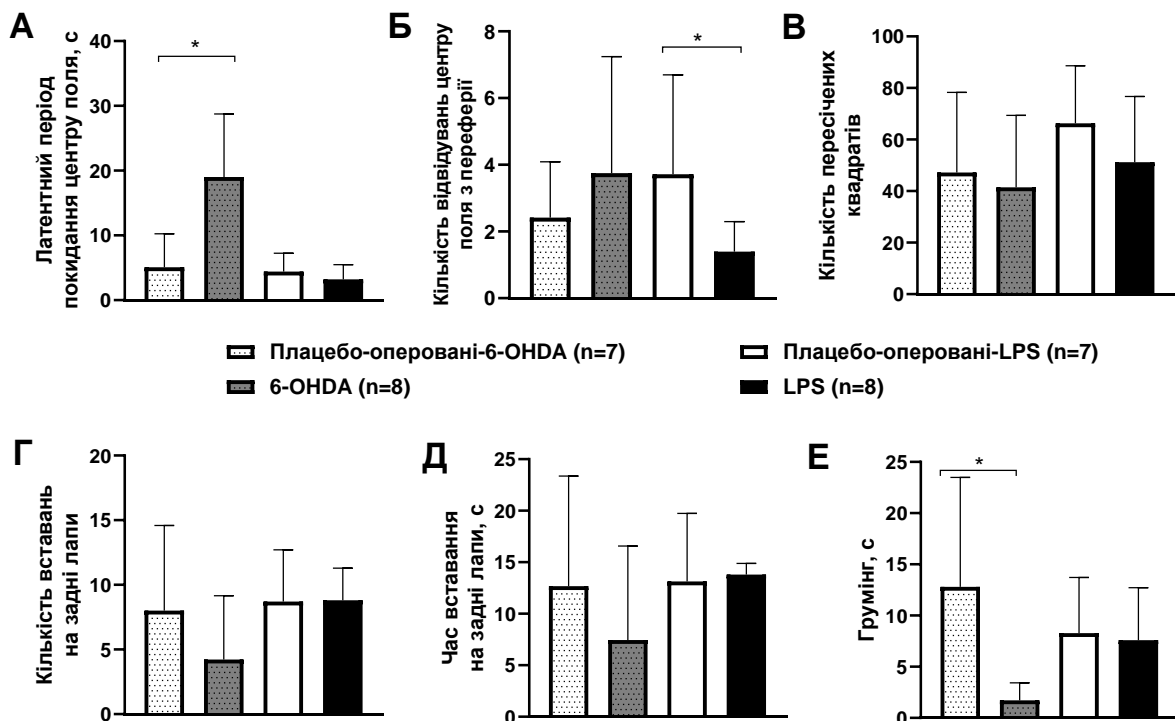


Рис. 3.2 Зміни поведінкових та локомоторних реакцій щурів з 6-OHDA та LPS моделями ХП у тесті Open field: А – рівень тривожності за латентним періодом виходу з центру поля, с; Б – кількість відвідувань центру поля з

периферії у тесті Open field; В - загальна кількість пересічених квадратів (горизонтальна активність) за увесь період тестування у тесті Open field; Г – кількість вставань на задні лапи у тесті Open field; Д – час стояння на задніх лапах у тесті Open field, с; Е – грумінг у тесті Open field, с (n=30). \*P < 0,05 (M±SD).

Загальна кількість пересічених квадратів щурами із ХП була меншою порівняно з відповідними контролями, але в той же час LPS групи перетинали більше квадратів порівняно з 6-OHDA групами, проте цей показник не досягав вірогідної різниці в жодній із досліджуваних моделей (Рис. 3.2.В). Кількість вставань (Рис. 3.2.Г) і час стояння на задніх лапах (Рис. 3.2.Д) у щурів з 6-OHDA-ХП зменшилися у 2 рази та у 1,5 рази відповідно. Вірогідних змін даних показників у щурів з LPS-ХП не спостерігалось. Час грумінгу зменшився в 7,5 разів у щурів 6-OHDA-ХП ( $12,8 \pm 10,7$  с) порівняно з контрольною 6-OHDA групою ( $1,71 \pm 1,70$  с) (P<0,05). Змін у грумінгу в LPS моделі ХП не спостерігалось. (Рис. 3.2.Е).

Таким чином, ми чітко прослідковуємо взаємозв'язок між збільшенням рівня дегенерації DA нейронів в середньому мозку щурів з 6-OHDA-ХП та порушенням поведінкових та локомоторних реакцій. Відповідно, у щурів з LPS-ХП всі ці показники були менш виразними.

### 3.1.3. Зміни маси тіла, вмісту води у фекаліях, питної та харчової поведінки у щурів з індукованим паркінсонізмом

Супутні захворювання, пов'язані із втратою маси тіла та недоїданням, можуть вплинути на прогресування ХП, спричиняючи дискінезію, зниження когнітивних функцій та ортостатичну гіпотензію, і навіть призводячи до інвалідності та смертності [153].

Найбільша втрата маси тіла у щурів з 6-OHDA-ХП становила 13% на 21-й день експерименту ( $116,73 \pm 20,6$  %) у порівнянні з контролем ( $134,14 \pm 12,32$  %).

У нашому дослідженні на 28-й день експерименту, у групі плацебо-оперованих щурів та 6-OHDA-ХП, спостерігалось збільшення маси тіла на 38% та 34% відповідно показників від початку експерименту (Рис. 3.3.А). До 28-го дня експерименту різниця в масі тіла становила всього 3%. 1-й день експерименту був прийнятий за 100%. Різниця у масі тіла щурів між групами LPS-ХП і плацебо-оперованих щурів впродовж усього експерименту не спостерігалось.

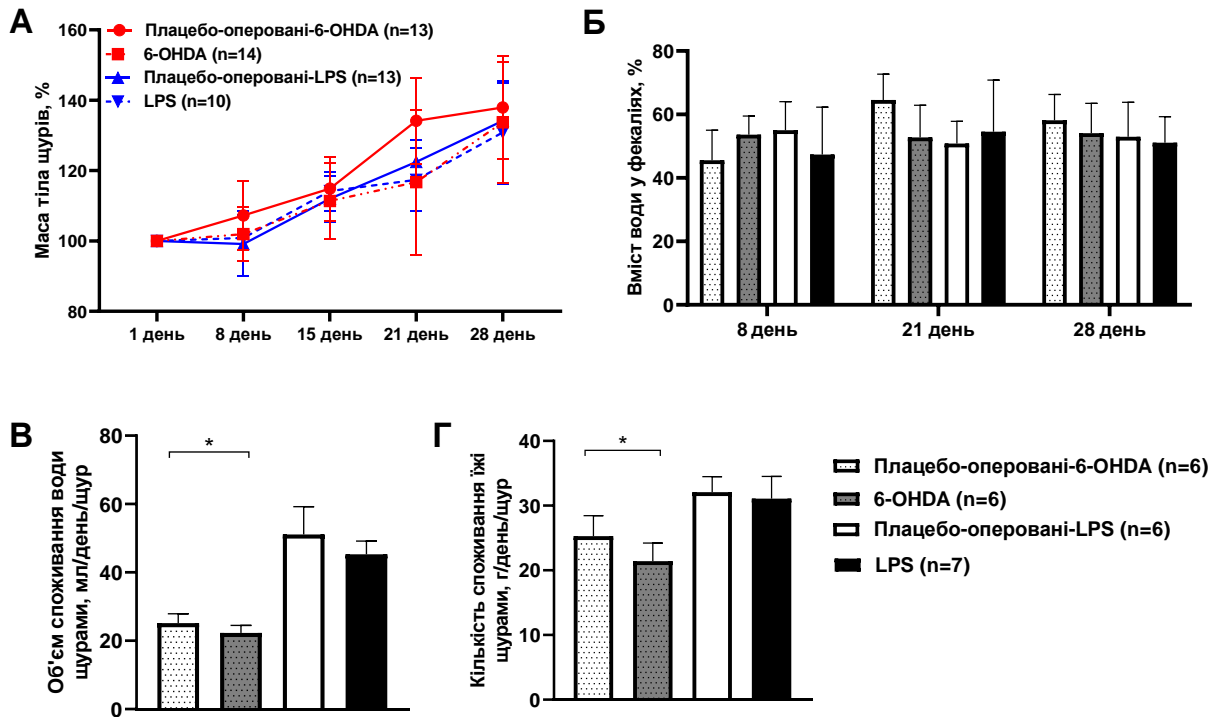


Рис. 3.3. Зміни маси тіла, вмісту води у фекаліях, питної та харчової поведінки у щурів з 6-OHDA- та LPS-ХП: А – зміни маси тіла щурів із ХП на 1, 8, 15, 21 та 28 добу після операції, %, n=50; Б – вміст води у фекаліях щурів із ХП на 8, 21 та 28 добу після операції, %, n=25; В – об'єм споживання води щурами з 14-21 день експерименту, мл/день/щур, n=25; Г – кількість споживання їжі щурами з 14-21 день експерименту, г/день/щур, n=25. \*P<0,05 (M±SD).

Вміст води у фекаліях щурів з 6-OHDA-ХП на 8-му добу експерименту збільшився на 18 % порівняно з відповідною контрольною групою (Рис. 3.3.Б). На 21-й день експерименту ми спостерігали тенденцію до збільшення вмісту води у фекаліях щурів з 6-OHDA-ХП порівняно з плацебо-оперованими 6-OHDA щурами. Вміст води у фекаліях щурів з 6-OHDA-індукованим паркінсонізмом

знизився на 18% порівняно з контролем на 21-й день. До 28 доби експерименту вміст води у фекаліях щурів знизився на 7%. Протягом усього експерименту значення вмісту води у фекаліях у щурів з 6-OHDA-ХП не змінювалися ( $52,63 \pm 5,86$  %), тоді як значення у контрольній для 6-OHDA групи збільшилися з  $45,53 \pm 9,48$ % до  $58,18 \pm 8,15$ %.

У групі LPS-ХП вміст води у фекаліях щурів на 8-й день експерименту знизився на 13%, а на 21-й підвищився на 8% порівняно з контрольною LPS групою відповідного дня експерименту (Рис. 3.3.Б). На 28-й день експерименту різниці у вмісті води у фекаліях між плацебо-оперованими щурами і LPS-ХП не спостерігалось.

У нашому дослідженні ми також визначали об'єм споживання води в 6-OHDA та LPS групах впродовж 15-21 дня експерименту (Рис. 3.3.В). Щури з 6-OHDA-ХП та LPS-ХП споживали на 11% менше води порівняно з відповідними контрольними групами. Проте, контрольні та дослідні LPS щури випивали вдвічі більше води, ніж 6-OHDA групи. Крім того, кількість споживаної їжі в обох групах LPS була в 1,3 рази вищою, ніж у групах 6-OHDA-ХП (Рис. 3Г). Щури з 6-OHDA-ХП споживали на 15% менше їжі, ніж плацебо-оперовані щури. Різниці між контрольними щурами та з LPS-ХП у кількості спожитої їжі не спостерігалось. Зменшення споживання води та їжі щурами з 6-OHDA-ХП досягала вірогідної різниці ( $P < 0,05$  відно показників у відповідній контрольній групі).

#### 3.1.4. Зміни просвітної мікробіоти дистального відділу товстої кишки щурів з індукованим паркінсонізмом

Дослідження, проведені за останні 10 років, показали, що люди з певними захворюваннями: ожиріння/метаболічний синдром, ЗЗК, нейродегенеративні захворювання (включаючи ХП) мають подібні характерні особливості мікробіоти та схильні до дисбактеріозу [154,155]. Кишкова мікробіота стала

основною темою досліджень ХП [156,157]. Дисфункція епітеліального бар'єру з підвищеною проникністю, змінами у складі мікробіоти та підвищеним рівнем запалення в просвіті кишечника були продемонстровані у пацієнтів із ХП і вважаються такими, що сприяють ініціації патогенного каскаду ХП [68,158].

У нашому експерименті ми досліджували склад просвітної мікробіоти фекалій щурів із ХП, результати якої висвітлені у статті [130]. Для визначення кількісних та якісних змін складу мікробіоти кишечника у щурів з ХП використовували селективно-діагностичні середовища. Мікробіоту фекалій досліджували на 28-му добу після хірургічного втручання (Табл. 3.1.). Перш за все звертали увагу на кількісні зміни мікробіоти у представників анаеробно-цукролітичної мікробіоти. Оскільки відомо, що *Bifidobacterium* і *Lactobacillus* є одними із продуцентів гамма-аміномасляної кислоти (ГАМК), яка є основним гальмівним нейромедіатором ЦНС мозку і мішенню для великого арсеналу лікарських засобів. Також ГАМК може брати участь у стимуляції моторики кишечника та забезпеченні перистальтичного рефлекса товстої кишки [159].

Змін у кількості представників анаеробно-цукролітичної мікробіоти (*Bifidobacterium* і *Lactobacillus*) у 6-OHDA моделі ХП не спостерігалось. Також не було суттєвих змін у чисельності *Clostridium*, бактерій роду *Staphylococcus*. Бактерії, які метаболізують лактозу, є лактозопозитивними *E. coli*, а бактерії, що не здатні до ферментації, є лактозонегативними *E. coli*. У нашому дослідженні ми спостерігали зниження рівня *E. coli*, що не ферментує лактозу, у 6-OHDA-ХП щурів. Через 1 місяць від початку дослідження кількість лактоzoneферментуючих *E.coli* достовірно зменшувалася ( $P<0,05$ ), але в той же час кількість лактозоферментуючих *E.coli* не змінювалася (Табл. 3.1.).

Таблиця 3.1.

Зміни просвітної мікробіоти дистального відділу товстої кишки щурів за 6-OHDA- та LPS-індукованого паркінсонізму (lg КУО/г фекалій), визначені методом культивування на селективних середовищах, n=15.  $M\pm SEM$ , \* $P<0,05$  порівняно з відповідним контролем.

Групи мікроорганізмів	Плацебо-оперовані 6-ОНДА n=3	6-ОНДА n=4	Плацебо-оперовані LPS n=4	LPS n=4
<i>Bifidobacterium</i>	8,10±0,17	8,05±0,09	<b>8,20±0,36</b>	7,10±0,21
<i>Lactobacillus</i>	8,47±0,29	8,47±0,12	<b>7,09±0,46</b>	<b>5,70±1,10</b>
<i>Clostridium</i>	2,73±0,37	2,95±0,00	2,64±0,25	2,83±0,07
<i>E. coli</i> лактозоферментуючі	5,10±0,17	5,02±1,70	<b>3,16±1,09</b>	<b>4,35±0,37</b>
<i>E. coli</i> лактозоферментуючі	<b>3,10±0,17</b>	<b>0,58±1,15*</b>	4,49±0,35	4,48±0,50
Умовно-патогенні ентеробактерії	0	0	<b>2,46±0,90</b>	<b>4,21±0,52*</b>
<i>Staphylococcus aureus</i>	4,33±0,35	4,15±0,43	4,41±0,92	4,25±0,36
<i>Staphylococcus spp.</i>	3,63±0,32	3,40±0,89	<b>3,82±0,29</b>	<b>1,87±1,08*</b>
<i>Candida</i>	<b>5,03±0,28</b>	<b>6,57±0,25</b>	0	0

На 1 порядок зросла кількість дріжджеподібних грибів роду *Candida*. У щурів 6-ОНДА-ХІІ кількість цитратоферментуючих умовно-патогенних ентеробактерій не виявлено.

У LPS-індукованих щурів спостерігалася тенденція до зниження *Lactobacillus* ( $P < 0,05$ ), *Bifidobacterium* та збільшення лактозоферментуючих *E.coli* та умовно-патогенних ентеробактерій (Табл. 3.1.). Змін у чисельності *Clostridium*, лактозоферментуючої *E.coli* ми не виявили. Серед бактерій роду *Staphylococcus* спостерігається тенденція до зменшення *Staphylococcus spp*, при чому змін в чисельності *Staphylococcus aureus*. не спостерігалось порівняно з плацебо-оперованими LPS щурами.

### 3.1.5. Зміни індексу маси лімфоїдних органів у щурів з індукованим паркінсонізмом

Зменшення маси сліпої кишки та збільшення розміру селезінки є одними з показників запалення товстої кишки [160]. Імунна функція сліпої кишки обумовлюється наявністю апендикса. Він у своїй стінці має лімфоїдні фолікули,

які виробляють антитіла у відповідь на чужорідні агенти, що потрапляють в організм через систему травлення. У нашому дослідженні ми продемонстрували незначне зменшення маси сліпої кишки на 7% як у 6-OHDA моделях ( $23,16 \pm 6,77$  мг/г у плацебо та  $21,46 \pm 4,66$  мг/г 6-OHDA-ХП), так і в LPS моделях ( $21,07 \pm 4,30$  мг/г у плацебо та  $19,72 \pm 6,31$  мг/г LPS-ХП) (Рис. 3.4.).

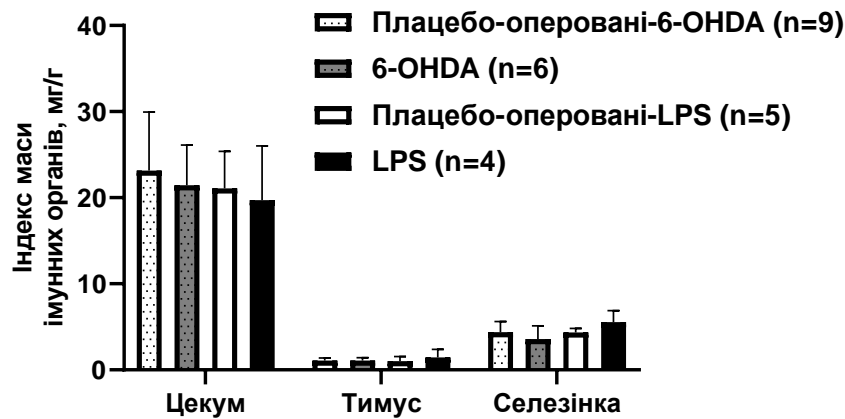


Рис. 3.4. Зміни індексу маси імунних органів у щурів із ХП, мг/г, n=24. (M±SD).

У LPS щурів зниження індексу маси сліпої кишки було більш вираженим (Рис. 3.4.), що супроводжувалося тенденцією до збільшення в індексі маси тимусу та маси селезінки у щурів з LPS-ХП, але не з 6-OHDA-ХП.

Проте слід звернути увагу, що жоден із досліджуваних показників не досягав статистичної достовірності в обох моделях ХП, що може бути свідченням мінімального системного запалення за даними моделями.

### 3.1.6. Зміни часу кишкового транзиту та моторної активності товстої кишки у щурів з індукованим паркінсонізмом

З метою емпіричного підтвердження паттерну порушення моторно-евакуаторної функції ШКТ за 6-OHDA та LPS моделей ХП було досліджено швидкість транзиту барвника кармінового червоного по ШКТ. Дослідження

проводили на 21 добу експерименту шляхом *per os* введення 3% барвника кармінового червоного (ЕКО РЕСУРС, Україна). Показано, що у щурів з 6-ОНДА-індукованим паркінсонізмом швидкість кишкового транзиту через травний канал становила  $624,3 \pm 51,51$  хв, що на 26 % повільніше ( $P < 0,05$ ) порівняно з контрольною групою ( $498,7 \pm 37,96$  хв) (Рис. 3.5.А). Група LPS-ХП мала протилежний ефект. Швидкість проходження барвника кармінового червоного у щурів з LPS-ХП була більшою на 15% ( $P < 0,05$ ), що становило  $407,3 \pm 52,69$  хв.

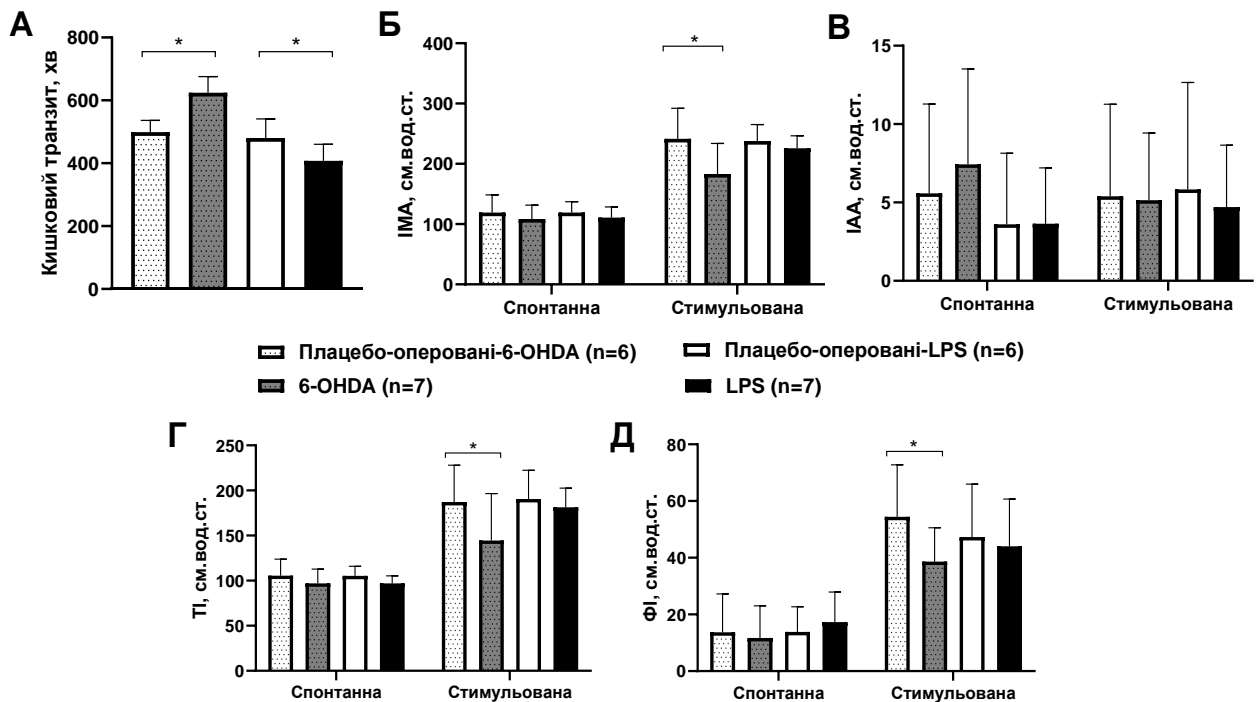


Рис. 3.5. Час кишкового транзиту по травному каналу та моторна активність товстої кишки у щурів з 6-ОНДА та LPS-ХП: А – час кишкового транзиту по травному каналу (0,5 мл 3% кармінового червоного), хв,  $n=24$ ; Б – індекс моторної активності (ІМА) спонтанної та стимульованої моторики товстої кишки щурів, ст.вод.ст,  $n=26$ ; В – індекс амплітуди активності (ІАА) спонтанної та стимульованої моторики товстої кишки щурів, ст.вод.ст,  $n=26$ ; Г – тонічний індекс (ТІ) спонтанної та стимульованої моторики товстої кишки щурів, ст.вод.ст,  $n=26$ ; Д – фазовий індекс (ФІ) спонтанної та стимульованої моторики товстої кишки щурів, ст.вод.ст,  $n=26$ . \* $P < 0,05$  ( $M \pm SD$ ).

Існують зв'язки між мікробіотою та моторикою ШКТ. Рухливість, включаючи скорочувальну активність поздовжнього та циркулярного шарів м'язів, відіграє певну роль у визначенні відносної кількості та різноманітності бактерій у просвітній та пристінковій мікробіоті [161]. Зниження моторики тонкої кишки є визначальним фактором у розвитку надмірного бактеріального росту тонкої кишки і є поширеним у пацієнтів із ХП [162].

Оцінку рухової активності товстої кишки щурів проводили методом баланографії на 21 добу експерименту за такими показниками, як ІМА, ІАА, ТІ та ФІ (Рис. 3.5.Б-Д). Спонтанна рухова активність ІМА, ТІ, ФІ всіх дослідницьких груп залишалася на контрольному рівні.

Стимульовану моторику моделювали *i.p.* введенням агоніста ацетилхоліну - карбахоліну (10 мкг/кг). Карбахолін у 2 рази підвищував моторну активність товстої кишки в усіх дослідних групах. ІМА у щурів 6-OHDA-ХП сповільнився на 24% порівняно з плацебо-оперованими 6-OHDA щурами ( $P < 0,05$ ). Стимульований карбахоліном ТІ товстої кишки у 6-OHDA-ХП був меншим на 22% ( $P < 0,05$ ) ( $144,40 \pm 52,21$  см.вод.ст.) порівняно з контролем 6-OHDA ( $187,18 \pm 40,87$  см.вод.ст.). У нашому дослідженні ФІ стимульованої моторики товстої кишки був знижений на 29% ( $38,63 \pm 11,96$  см.вод.ст.) у щурів із 6-OHDA-ХП, порівняно з плацебо-оперованими 6-OHDA щурами ( $54,45 \pm 18,33$  см.вод.ст.) ( $P < 0,05$ ). Змін у стимульованій моторній активності дистального відділу товстої кишки у щурів із LPS-індукованою ХП не спостерігалось.

У нашому дослідженні було показано, що час кишкового транзиту вздовж усього травного каналу у щурів (моторна-евакуаторна функція) з 6-OHDA-ХП сповільнився на 26%, тоді як у групі LPS-ХП прискорився на 15% порівняно з відповідною контрольною групою. Проте, зниження моторної активності товстої кишки спостерігалось лише у щурів з 6-OHDA-ХП. У LPS моделі змін моторики товстої кишки не спостерігалось. Таким чином, 6-OHDA модель ХП краще відображає зміни в моториці ШКТ, ніж LPS модель.

### 3.2. Характеристика перебігу ротенон-індукованої моделі хвороби Паркінсона у мишей

Ротенон є інгібітором МК-I, який широко використовується для моделювання ХП у тварин. Відповідно до літературних даних є декілька різних протоколів моделювання ротенон-індукованої ХП [124,163,164]. З метою обрання адекватної для нашої лінії мишей Balb-c, ми протестували 2 різних протоколи. При першому моделюванні ротенонової моделі ХП у мишей ми використовували дозу ротенону 30 мг/кг, який розводили у хлороформі та карбоксиметилцелюлозі і вводили щоденно *per os* [163], але цей протокол зумовлював майже 100% смертність серед мишей. Через 2 тижні від початку введення речовин всі 30 тварин загинули. Тому, ми зосередили свою увагу на моделі, коли ротенон потрібно вводити в низькій дозі у (2,5 мг/кг/день) впродовж 4 тижнів [124], яка за літературними даними зумовлює розвиток двох характерних ознак ХП: 1) втрата DA нейронів SNpc; 2) поява  $\alpha$ -синуклеїн-позитивних нейронних включень, що нагадують тільця Леві, а також дисфункцію ШКТ, що супроводжувалося накопиченням внутрішньоклітинного  $\alpha$ -синуклеїну у холінергічних нейронах у дорсальному моторному ядрі блукаючого нерва (DMV) і кишковому м'єнтеральному сплетенні.

Ротенон розводили у соняшниковій олії і вводили *i.p.* у дозі 2,5 мг/кг щоденно впродовж 28 днів.

У нашому досліді миші з ротеноновою моделлю ХП продовж усього експерименту були більш кволі, спостерігалось погіршення стану хутра. На 1-й тиждень експерименту у мишей з ХП спостерігалися закрепи, тоді як у контрольній групі – діарея. За весь час експерименту в групі мишей з ротеноновою ХП загинуло 4 із 15 мишей. У групі плацебо загинуло 2 із 15 мишей.

### 3.2.1. Дослідження поведінкових та локомоторних реакцій мишей з ротенон-індукованим паркінсонізмом

Першим етапом дослідження було вивчення поведінкових та локомоторних реакцій тварин для підтвердження ефективності моделювання ХП у мишей за допомогою Pole тесту. Згідно літературних джерел миші з ротеноновою моделлю ХП витрачають на оберт та спуск по дерев'яній жердині у Pole тесті більше часу, ніж група плацебо [125]. Наші дані підтвердили ці факти і було показано (Рис. 3.6.А), що миші з ХП витрачають на оберт головою вниз по жердині  $4,65 \pm 2,05$  с, що майже вдвічі більше, ніж група плацебо ( $2,65 \pm 0,90$  с,  $P < 0,01$ ). Також збільшується час на спуск у 1,4 рази у мишей з ротеноновою ХП ( $10,94 \pm 3,30$  с) у порівнянні з мишами контрольної групи ( $7,84 \pm 2,28$  с).

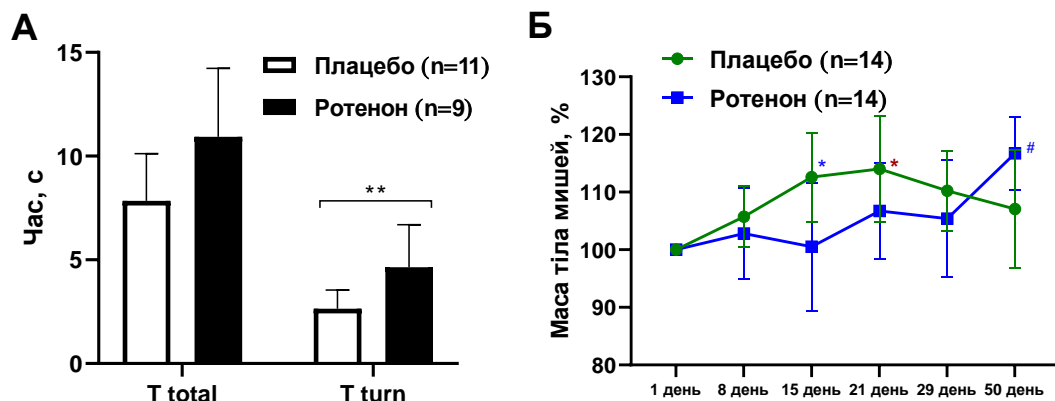


Рис. 3.6. Зміни поведінкових та локомоторних реакцій та маси тіла мишей з ротеноновою моделлю ХП: А – оцінка моторної функції у мишей з порушенням функціонування базальних гангліїв за допомогою Pole тесту, с,  $n=20$ ,  $**P < 0,01$  ( $M \pm SD$ ); Б - зміни маси тіла щурів із ХП на 1, 8, 15, 21, 29 та 50 добу експерименту, %,  $n=28$ ,  $*P < 0,05$  в порівнянні з 15 днем експерименту у мишей з ротеноновою ХП,  $*P < 0,05$  в порівнянні з 8 днем експерименту у мишей групи плацебо,  $\#P < 0,05$  в порівнянні з 8 та 15 днем експерименту у мишей з ротеноновою ХП, ( $M \pm SD$ ).

Масу тіла тварин визначали на 1-й, 8-й, 15-й, 21-й, 29-й та 50-й дні експерименту. Було показано, що до 29-го дня експерименту миші з

ротеноновою моделлю ХП набирали менше в масі тіла, ніж група плацебо. Найбільша різниця спостерігалася на 15-й день експерименту і становила 12% ( $P < 0,05$ ). В інші дні експерименту маса тіла відрізнялася на 8%, 5% та 9% відповідно (Рис. 3.6.Б). Після 29-го дня експерименту показники маси тіла змінилися і миші з ХП набирали на 10% більше, ніж плацебо. У групі плацебо на 50-й день експерименту маса мишей становила на 7% більше в порівнянні з початком експерименту. Тоді як у мишей з ХП ця цифра становила 17%.

Далі ми перевірили класичні біохімічні маркери OS та запалення в мозку мишей з ротенон-індукованою ХП у порівнянні з групою плацебо для підтвердження розвитку хвороби.

Розвиток ротенон-індукованої ХП у мишей не вплинув на концентрацію мієлопероксидази (МРО) у мозку в порівнянні з мишами групи плацебо (Рис. 3.7.А).

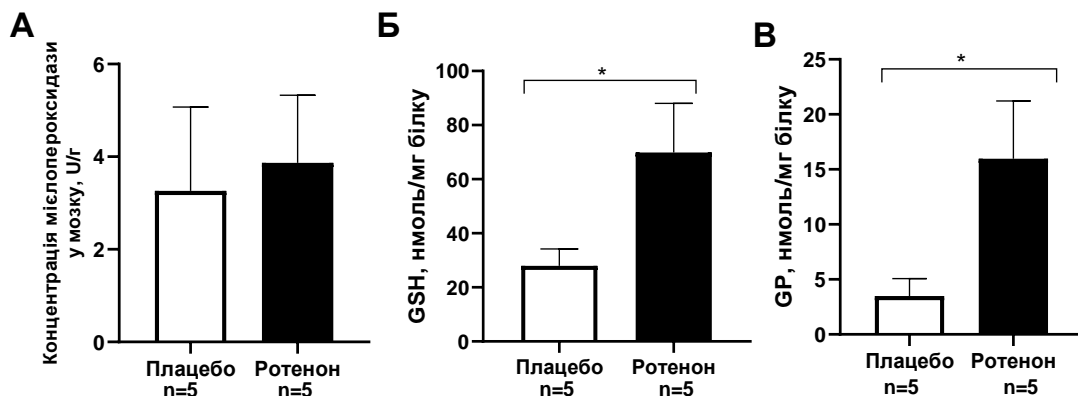


Рис. 3.7. Зміни рівня маркерів запалення та оксидативного стресу в мозку мишей з ротеноновою моделлю ХП: А – концентрація мієлопероксидази, U/г, Б - рівень відновленого глутатіону (GSH), нмоль/мг, В - рівень активності глутатіонпероксидази (GP), нмоль/мг, n=10, \* $P < 0,05$  ( $M \pm SD$ ).

У нашому дослідженні рівень маркерів OS - GSH та GP у мозку мишей з ХП збільшувалися у 2,5 та 4,5 рази відповідно ( $P < 0,05$ ) (Рис. 3.7.Б,В). Таким чином, можна припустити, що системне введення ротенону призвело до активації про-оксидатних процесів в мозку, що є одною із ознак ХП і відповідно свідчить про адекватність моделювання ХП у мишей ротеноном.

### 3.2.3. Зміни часу кишкового транзиту у мишей з ротенон-індукованим паркінсонізмом

Дослідження впливу ХП на швидкість транзиту по травному каналу у мишей проводили на 50-й день від початку експерименту за допомогою *per os* введення чорного активованого вугілля (Charcoal). Втрата маси, зміна довжини товстої та тонкої кишок, відстань, яку пододало вугілля з хімусом, а також швидкість спорожнення шлунку свідчать про стан моторної функції ШКТ. Більш тривалий період виведення свідчить про порушення моторної функції ШКТ та розвиток таких патологічних станів, як ускладнена прохідність ШКТ, гастропарез, закрепи тощо [165].

Перед початком експерименту мишей поміщали на 24 год на голод з вільним доступом до води. До початку голодування маса тварин груп плацебо та ротенон-індукованої ХП становила  $27,00 \pm 3,74$  г та  $32,17 \pm 3,13$  г відповідно. Тоді як через 24 год маса зменшилася на 15% в обох групах (Рис. 3.8.А).

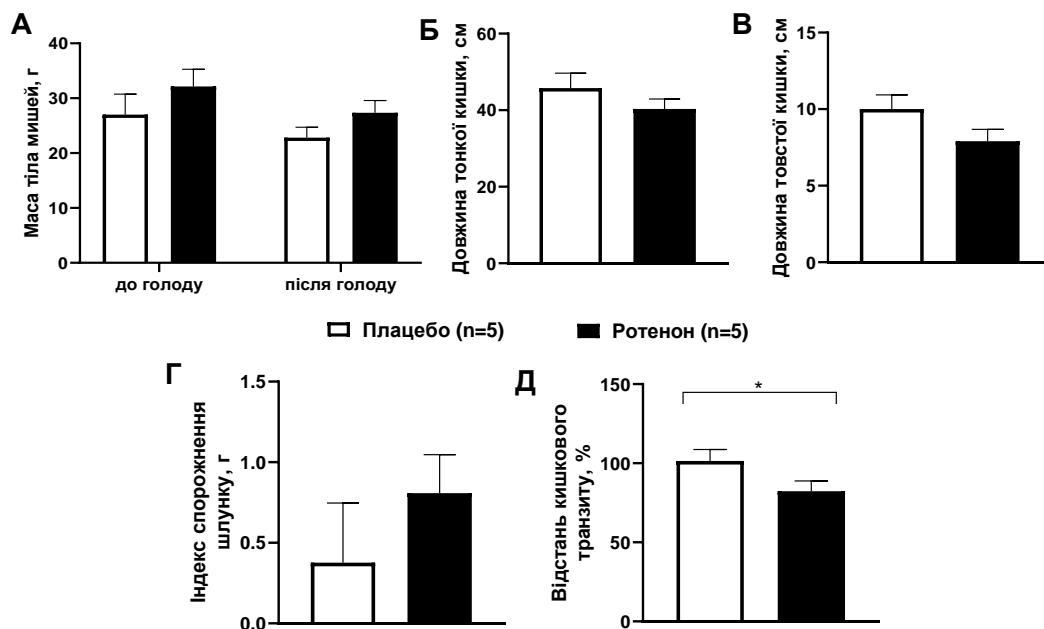


Рис 3.8. Швидкість транзиту чорного активованого вугілля (Charcoal) по травному каналу та порушення моторно-евакуаторної функції ШКТ у мишей з ротеновою моделлю ХП: А - маса тіла мишей до та після періоду голодування, г; Б – довжина тонкої кишки у мишей, см; В - довжина товстої кишки у мишей,

см; Г - індекс спорожнення шлунку мишей, г; Д - відстань, яку пододало активоване вугілля у кишечнику мишей, %, n=10, \*P < 0,05 (M±SD).

Довжина тонкої та товстої кишок мала тенденцію до зменшення у групі мишей з ХП, але суттєвих відмінностей не спостерігалось (Рис. 3.8.Б,В). Також у ході експерименту було визначено індекс спорожнення шлунку (евакуаторна функція шлунку), який становив для мишей групи плацебо  $0,38 \pm 0,37$  г, а для мишей із ротенон-індукованим паркінсонізмом цей показник був удвічі більшим  $0,81 \pm 0,24$  г. Достовірних відмінностей не спостерігалось (Рис. 3.8.Г).

У мишей групи плацебо відстань, яку пододало чорне активоване вугілля становила  $101,50 \pm 7,27\%$ , тоді як у мишей з ХП ці показники були на рівні  $82,33 \pm 6,51\%$  (Рис. 3.8.Д). Таким чином, у мишей з ротенон-індукованою ХП, у порівнянні з тваринами групи плацебо, спостерігалось затримка моторно-евакуаторної функції ШКТ на 19% (P<0,05).

### 3.3. Дослідження основних показників перебігу 6-ОНДА-індукованого паркінсонізму у щурів через 1 та 7 місяців після моделювання хвороби Паркінсона

ХП є хронічним захворюванням, яке поширене у літніх людей (>65 років), але у спадкових випадках вона може початися у віці 30-40 років [166]. Віддалені наслідки ХП досліджені на  $\beta$ -ситостерол d-глюкозид-, PFF-, резерпін-індукованих моделях [167–169], але довгострокові зміни ШКТ у щурів з 6-ОНДА-моделлю ХП досі не досліджені. Тому для більш глибокої характеристики 6-ОНДА-викликаної ХП у щурів ми дослідили як будуть змінюватися поведінкові та локомоторні реакції, моторно-евакуаторна функція ШКТ, склад мікробіоти та бар'єрна функція товстої кишки щурів у двох точках, через 1 і 7 місяців після одноразового стереотаксичного введення 6-ОНДА.

### 3.3.1. Порівняння показників поведінкових та локомоторних реакцій у щурів з 6-OHDA-індукованим паркінсонізмом у Open field тесті

Дослідження поведінкових та локомоторних реакцій проводили за допомогою Open field тесту. Ми виявили, що в 4 рази ( $P < 0,01$ ) збільшився латентний період покидання центру поля в 6-OHDA щурів ( $19,09 \pm 9,75$ ) через 1 місяць після моделювання ХП в порівнянні з відповідним контролем ( $5,09 \pm 5,15$ ). На 7-й місяць експерименту у плацебо-оперованих щурів латентний період покидання центру поля зменшився в 5 разів у порівнянні з групою плацебо на 1-й місяць. Проте у групи щурів з 6-OHDA-ХП через 7 місяців даний показник залишався вищим за показник в контрольній групі ( $P < 0,01$ ) (Рис. 3.9.А). Достовірних змін у кількості відвідувань центру поля з периферії та у загальній кількості пересічених квадратів поля у плацебо-оперованих та щурів з модельованою 6-OHDA -ХП не спостерігалось через 1 та 7 місяців експерименту (Рис. 3.9.Б,В).

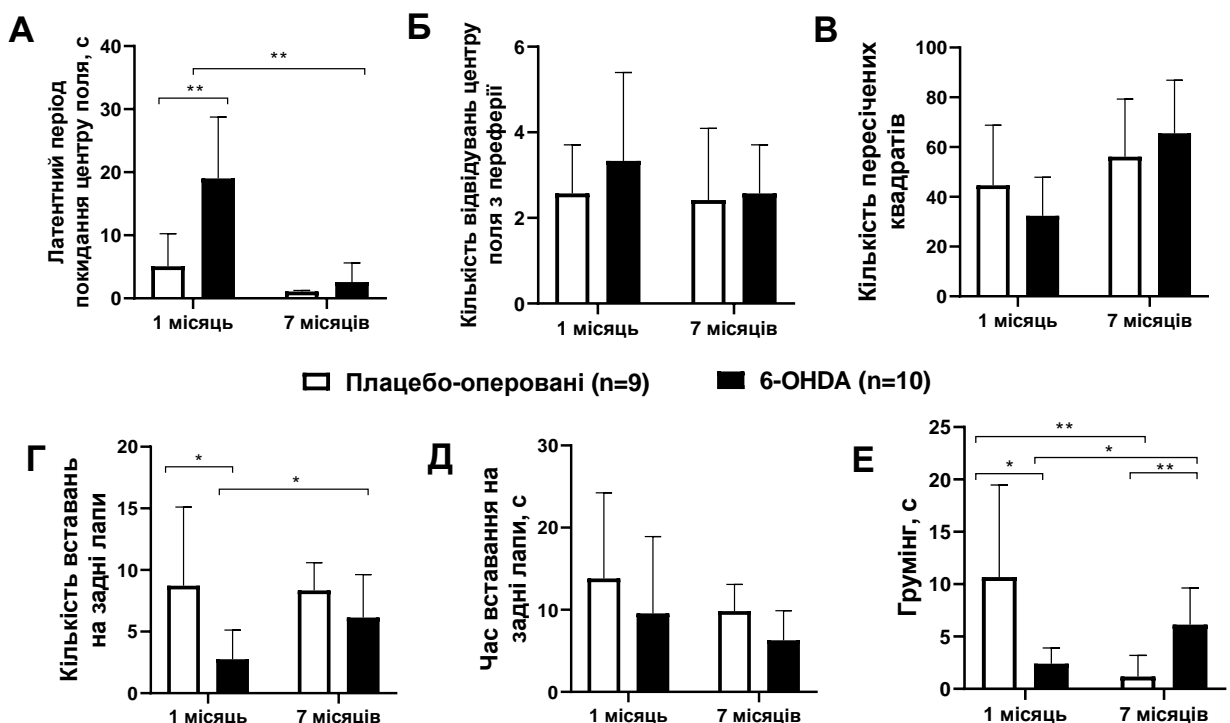


Рис. 3.9. Зміни поведінкової та локомоторної реакцій щурів з 6-OHDA-ХП у тесті Open field через 1 та 7 місяців після моделювання ХП: А – латентний період покидання центру поля, с; Б – кількість відвідувань центру поля з

периферії у тесті Open field; В - загальна кількість пересічених квадратів за увесь період тестування у тесті Open field; Г – кількість вставань на задні лапи у тесті Open field; Д – час стояння на задніх лапах у тесті Open field, с; Е – грумінг у тесті Open field, с; n=19. \*P<0,05, \*\*P<0,01 (M±SD).

Кількість вставань на задні лапи через 1 місяць після моделювання 6-ОНДА-ХП була втричі менша (P<0,05) за показник у плацебо-оперованих щурів (8,73±6,39 та 2,57±2,38 відповідно). Тоді як на 7 місяць показники у 6-ОНДА групі збільшилися вдвічі до 6,14±3,49 (P<0,05), але не досягали показників відповідної контрольної групи. Змін у плацебо-оперованих тварин на 1-й та 7-й місяць не спостерігалось (Рис. 3.9.Г).

Загальна тривалість стояння на задніх лапах також була зменшена у 6-ОНДА-ХП порівняно з плацебо-оперованими щурами у 1,5 рази через 1 та 7 місяців експерименту (Рис. 3.9.Д). Час грумінгу був значно меншим (у 9 разів, P<0,01) у щурів з 6-ОНДА-ХП через 1 місяць експерименту. Через 7 місяців експерименту щури групи плацебо мали значно менший час грумінгу у порівнянні з групою плацебо через 1 місяць експерименту. При цьому у щурів з 6-ОНДА-ХП на 7 місяць він збільшився у порівнянні як з відповідною групою плацебо (P<0,01), так і з показником у щурів з 6-ОНДА-ХП на 1 місяць експерименту (P<0,05) (Рис. 3.9.Е). На 1 місяць експерименту значення грумінгу у групи з ХП становило у 4,5 раз менше від плацебо-оперованих щурів відповідного віку (P<0,05). Тоді як на 7 місяць експерименту у щурів з 6-ОНДА-ХП значення більшилися у 5 разів (P<0,01).

### 3.3.2. Порівняння показників маси тіла та функціонування шлунково-кишкового тракту у щурів з 6-ОНДА-індукованим паркінсонізмом

Плацебо-оперовані щурі набирали 43% маси тіла між 1-м днем і 1-м місяцем експерименту, тоді як щури з 6-ОНДА-ХП лише 27%, що на 11% менше

порівняно з контрольною групою ( $P < 0,05$ ). На 7-й місяць ми спостерігали збільшення маси тіла у щурів із 6-ОНДА-ХП на 16% ( $216,78 \pm 19,98\%$ ) порівняно з контрольною групою на 7-му місяці експерименту ( $200,62 \pm 5,19\%$ ) (Рис. 3.10.А).

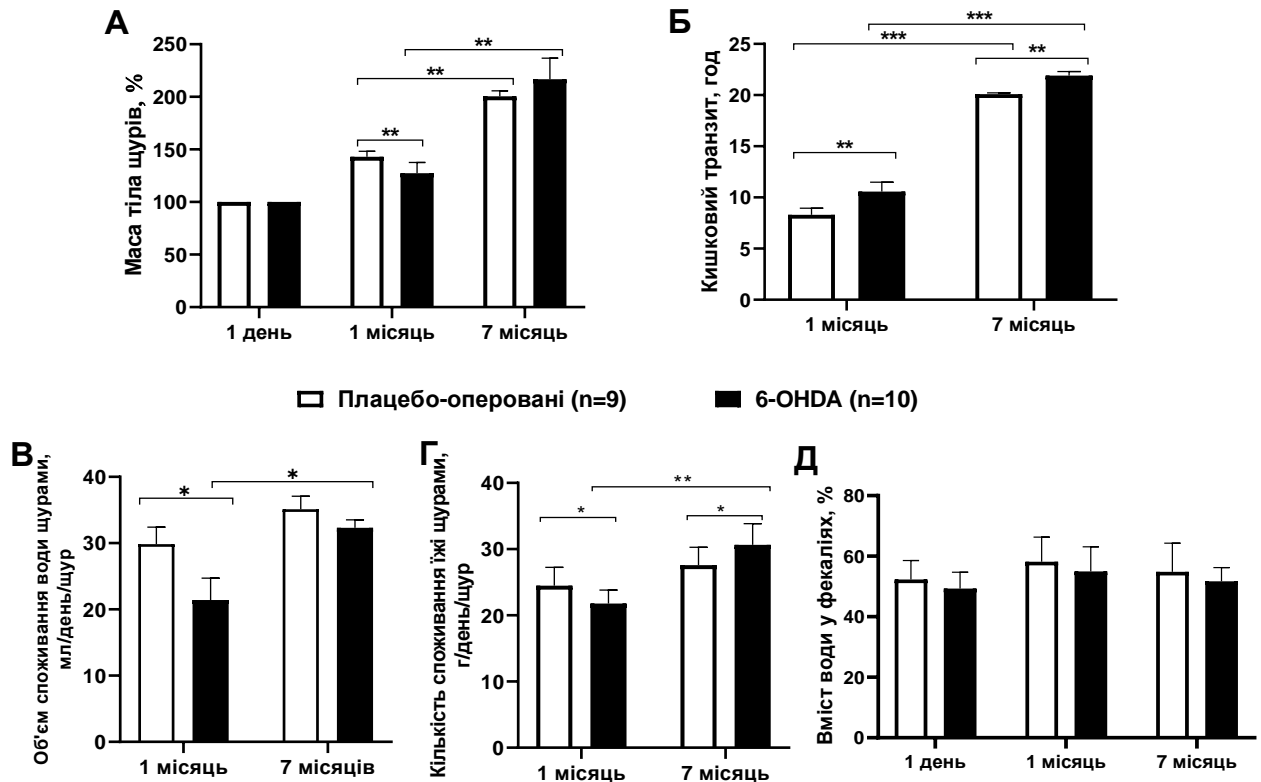


Рис. 3.10. Зміни маси тіла, питної і харчової поведінки, а також моторно-евакуаторної функції травного каналу на 1-й та 7-й місяць після моделювання 6-ОНДА-ХП: А – зміни маси тіла щурів із ХП на 1-й та 7-й місяць після операції, %; Б – загальний час проходження кишкового транзиту (0,5 мл 3% кармінового червоного) у щурів із ХП, год; В – об'єм споживання води щурами, мл; Г – кількість споживання їжі щурами, г; Д – вміст води у фекаліях щурів, %; n=19. \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$ , \*\*\* $P < 0,001$  ( $M \pm SD$ ).

Зміни в кишечнику щурів із 6-ОНДА-ХП через 7 місяців експерименту також супроводжувалися збільшенням споживання питної води та їжі (Рис. 3.10.В,Г) та збільшенням кількості води у фекаліях порівняно з 1 місяцем експерименту [170]. Ми спостерігали зменшення об'єму споживання води на 1-му місяці експерименту у щурів із 6-ОНДА-ХП ( $22,04 \pm 5,22$  мл) порівняно

плацебо-оперованими ( $30,92 \pm 10,04$  мл) (Рис. 3.10.В). Об'єм споживання води через 7 місяців збільшився до  $35,11 \pm 1,96$  мл у групі плацебо-оперованих щурів та  $32,3 \pm 1,19$  мл у 6-ОНДА-ХП щурів ( $P < 0,05$ ).

Вміст води у фекаліях щурів з ХП мав тенденцію до зниження, але суттєвих змін не спостерігалось (Рис. 3.10.Д). На 1-й день експерименту значення становили  $52,30 \pm 6,28$  % у плацебо щурів та  $49,31 \pm 5,42$  %. На 7-й місяць експерименту значення не майже не змінилися і становили  $54,85 \pm 9,43$  % та  $51,71 \pm 4,54$  % відповідно.

Ми спостерігали затримку кишкового транзиту через увесь травний канал у щурів з 6-ОНДА-ХП на 1-й місяць експерименту на 27%, а на 7-му місяці на 9% порівняно з плацебо-оперованими тваринами ( $P < 0,01$ ). На 7-й місяць час кишкового транзиту у щурів збільшився в 2,5 рази в контрольній групі і вдвічі у щурів 6-ОНДА-ХП ( $P < 0,001$ ) (Рис. 3.10.Б). Згідно літературних даних, старіння значно прискорює кишковий транзит [171], але у щурів з ХП спостерігається протилежна реакція.

Через 1 місяць після операції сповільнений шлунково-кишковий транзит у щурів 6-ОНДА-ХП співвідносився із зменшенням вмісту води у фекаліях та об'ємом споживання води. Через 7 місяців ми спостерігали фізіологічну адаптацію та відсутність істотної різниці за цими параметрами між досліджуваними групами.

Також ми спостерігали зниження індексу маси сліпої кишки на 1-й місяць експерименту на 46 %. Тоді як з часом (7-й місяць експерименту) відбулося зниження індексу маси сліпої кишки у плацебо-оперованих 6-ОНДА щурів на 35% у порівнянні з показниками на 1-й місяць експерименту. Це на 57% менше, ніж у щурів з 6-ОНДА-ХП на 7-й місяць експерименту (Рис. 3.11).

Розвиток збільшеної сліпої кишки є типовою ознакою у гнотобіонтів (тварини, що вільні від мікроорганізмів) [172]. Здається, що збільшення сліпої кишки залежить від кількості накопичених речовин, які у звичайних тварин повинні бути розщеплені шляхом мікробної ферментації. Крім того, в нещодавньому огляді [173] було запропоновано внесок *appendix vermiformis* у

розвиток ХП у той час як апендектомія в ранньому дитинстві знижує ризик розвитку ХП.

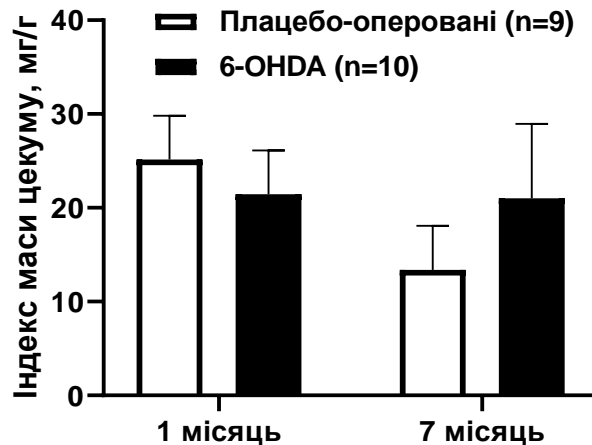


Рис. 3.11. Індекс маси сліпої кишки щурів із 6-OHDA-ХП, мг/г; n=19.

Цікаво, що індекс маси сліпої кишки у плацебо-оперованих щурів був удвічі нижчим на 7-му місяці експерименту порівняно з 1 місяцем експерименту [174]. На нашу думку, таку різницю можна пояснити удвічі збільшеною масою тіла щура на 7-му місяці експерименту проти 1-го місяця експерименту (Рис. 3.10.А).

Окрім цього, зміни в розмірі цекуму можуть бути показником порушення мікробного гомеостазу, який в свою чергу є чинником розвитку запалення. Для підтвердження даного припущення ми провели наступну серію експерименту.

### 3.3.3. Просвітна мікробіота товстої кишки щурів у різні терміни 6-OHDA-індукованого паркінсонізму

Ми дослідили зміни просвітної мікробіоти дистального відділу товстої кишки щурів у різні терміни 6-OHDA-експериментального паркінсонізму (Табл. 3.2.) [130]. У наших дослідженнях показники анаеробно-цукролітичної мікробіоти (*Bifidobacterium* та *Lactobacillus*) залишалися в межах контрольних значень впродовж усього експерименту. Представники роду *Clostridium* в організмі є одними з основних продуцентів бутирату, який є енергетичним

субстратом для епітеліоцитів кишечника. У нашому дослідженні ми відмічали тенденцію до збільшення представників роду *Clostridium* лише через 2 місяці від початку експерименту у щурів з 6-ОНДА-індукованим паркінсонізмом. Чисельність лактозопозитивної *E.coli* достовірно зростала ( $P<0,05$ ) на 1,5 та 2 місяці досліду. У той же час, спостерігалось зниження на 2-3 порядки лактозонегативної *E.coli*.

Таблиця 3.2.

Зміни просвітної мікробіоти дистального відділу товстої кишки щурів у різні терміни 6-ОНДА-індукованого паркінсонізму (lg КУО/г фекалій),  $n=7$ .  $M\pm SEM$ ,  $*P<0,05$  порівняно з відповідним контролем.

Група мікроорганізмів	1 місяць		1.5 місяці		2 місяці	
	Плацебо-оперовані $n=3$	6-ОНДА $n=4$	Плацебо-оперовані $n=3$	6-ОНДА $n=4$	Плацебо-оперовані $n=3$	6-ОНДА $n=4$
<i>Bifidobacterium</i>	8,10±0,17	8,05±0,09	8,74±2,46	8,20±0,40	8,96±0,22	8,67±0,32
<i>Lactobacillus</i>	8,47±0,29	8,47±0,12	7,35±0,92	7,55±0,71	7,04±0,79	7,25±0,75
<i>Clostridium</i>	2,73±0,37	2,95±0,00	2,95±0,00	2,95±0,00	<b>2,95±0,00</b>	<b>3,21±0,53</b>
<i>E. coli</i> лактозоферментуючі	5,10±0,17	5,02±1,70	<b>4,65±0,80</b>	<b>6,08±0,70*</b>	<b>4,39±0,55</b>	<b>6,24±1,26*</b>
<i>E. coli</i> лактозонегативні	<b>3,10±0,17</b>	<b>0,58±1,15*</b>	<b>4,74±0,37</b>	<b>1,50±3,00*</b>	<b>2,50±2,83</b>	<b>0*</b>
Умовно-патогенні ентеробактерії	0	0	<b>1,24±1,75</b>	<b>1,86±1,24</b>	<b>1,35±1,90</b>	<b>0</b>
<i>Staphylococcus aureus</i>	4,33±0,35	4,15±0,43	4,54±0,34	4,95±1,10	4,24±0,34	4,27±0,20
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	3,63±0,32	3,40±0,89	2,74±0,37	2,50±3,00	<b>3,75±0,07</b>	<b>4,52±0,33*</b>
<i>Candida</i>	<b>5,03±0,28</b>	<b>6,57±0,25</b>	5,30±1,41	5,78±0,15	6,59±0,16	6,53±0,65

Розвиток нейродегенерації при ХП може також пов'язуватися із зростанням *E.coli* в мікробіоті ШКТ, оскільки *E.coli* містить у своїй клітинній стінці LPS, який призводить до агрегації  $\alpha$ -синуклеїну. З однієї сторони вже доведено роль LPS, як ендотоксину, який сприяє нейродегенерації, а з іншої *E.coli* також може продукувати білок, який пригнічує токсичний амілоїд, що накопичується при ХП та інших нейродегенеративних захворюваннях. Амілоїд утворюється внаслідок накопичення білків всередині клітин тканини, де він

призводить до загибелі клітин і, як наслідок, порушення нормального функціонування органу. *E.coli* здатна синтезувати амілоїд у вигляді волокон карліну, які відкладаються не всередині клітини, а ззовні, що не призводить до загибелі клітин [175].

У нашому експерименті ми також визначали бактерії роду *Staphylococcus*. Кількість патогенного *Staphylococcus aureus*, який здатен до ферментації маніту, не змінювалася впродовж усього експерименту. Тоді як кількість сапрофітного *Staphylococcus epidermidis*, який не здатен до зброджування маніту, достовірно збільшувалася у 1,5 раза ( $P < 0,05$ ) через 2 місяці після моделювання хвороби.

Ali Keshavarzian із співавторами [176] показали, що зміна мікробіоти товстої кишки та дисбактеріоз можуть бути одним з механізмів нейрозапалення, що призводить до розвитку ХП. Було показано зменшення кількості бактерій родини *Bifidobacteriaceae* та збільшення родин *Bacteroidaceae*, *Clostridiaceae*, *Enterobacteriaceae* у пацієнтів із ХП.

Отримані дані свідчать, що незначні зміни у складі просвітної мікробіоти у щурів з 6-OHDA-ХП прогресують з часом і можуть бути виявлені вже через 2-місяці після моделювання ХП. Загалом, зміни мікробіоти ШКТ можна розглядати, як наслідок розвитку ХП. Оскільки, нервова система здатна впливати на кишечник та його нормобіоту через зміни моторики, секреції ферментів, гормонів, компонентів слизового бар'єру і т.д. Ці зміни можуть бути використані, як ранній біомаркер розвитку ХП, у той час, коли нейромоторні симптоми ще не проявляються. Зміни в мікробному гомеостазі, можуть призводити до порушення слизового бар'єру кишечника, що є також характерною ознакою ХП.

3.3.4. Вуглеводний склад поверхневого слизу кишечника у щурів з 6-OHDA-індукованим паркінсонізмом

Кишковий епітелій складається з абсорбційних і секреторних клітин, включаючи ентероцити, ентероендокринні клітини, клітини Панета та келихоподібні клітини. Келихоподібні клітини — це спеціалізовані клітини, оснащені специфічним біологічним механізмом для секреції слизу та присутні по всій довжині кишечника [177].

Слиз є в'язкопружним гідрогелем, що відіграє важливу роль у захисному бар'єрі епітелію. Основними структурними компонентами гідрогелів є полімерні гелеутворюючі муцини, що щільно глікозильовані білками, які захищають від колонізації патогенних мікроорганізмів та їх транслокацію в кров та органи [132,178]. Муцин О-глікозильовані глікопротеїни знаходяться в концентрації 1–5% і відповідають за в'язкопружні властивості шару слизу [179]. Глікопротеїни слизу локалізуються на апікальній мембрані ентероцитів. Основним секреторним муцином тонкої та товстої кишки є MUC2 [179]. У нашому дослідженні рівень глікопротеїнів у поверхневому шарі слизу товстої кишки підвищився на 35% у плацебо-оперованих щурів та на 50% у групі 6-OHDA-XII між 1-м і 7-м місяцем експерименту. Достовірна різниця між контрольною та дослідною групами була відсутня (Рис. 3.12.А).

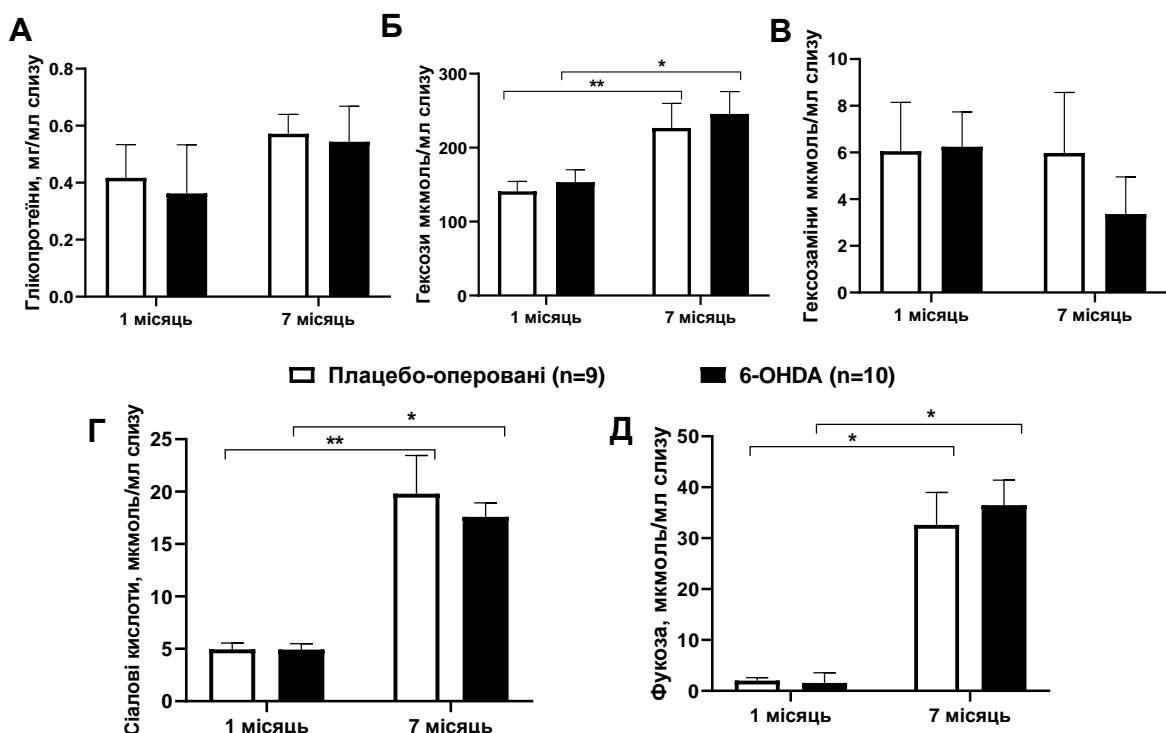


Рис. 3.12. Вуглеводний склад поверхневого шару слизу кишечника щурів 6-ОНДА на 1-му та 7-му місяці після операції: А – вміст глікопротеїну в поверхневому шарі слизу товстої кишки щурів із ХП, мг/мл слизу; Б – вміст гексоз у поверхневому шарі слизу товстої кишки щурів із ХП, мкмоль/мл слизу; В – вміст гексозамінів у поверхневому шарі слизу товстої кишки щурів із ХП, мкмоль/мл слизу; Г – вміст сіалових кислот у поверхневому слизі товстої кишки щурів із ХП, мкмоль/мл слизу; Д – вміст фукози в поверхневому слизу товстої кишки щурів із ХП, мкмоль/мл слизу. \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$  ( $M \pm SD$ ),  $n=19$ .

Залишки гексози, гексозаміну, фукози, сіалових кислот і сульфатованих моносахаридів знаходяться в кінцевому положенні олігосахаридів муцину. Сульфатування та сіалювання олігосахаридів муцину надає додатковий опір слизу до руйнування бактеріальними глікозидазами [132,180]. Таким чином, доцільно оцінювати не тільки загальну кількість глікопротеїнів поверхневого слизу, а й якісний склад їх вуглеводних залишків.

Вміст гексоз у слизі був на 60 % більшим у всіх дослідних групах на 7-му місяці дослідження порівняно з 1 місяцем ( $P < 0,05$ ). Різниця між контрольною та групою щурів із ХП становила 8% на 1-й та 7-й місяць експерименту (Рис. 3.12.Б). Рівень гексозамінів знизився лише в групі 6-ОНДА-ХП на 7-му місяці експерименту, тобто на 56% порівняно з показниками через 1 місяць і на 55% порівняно з групою з плацебо-оперованих щурів через 7 місяців від початку експерименту (Рис. 3.12.В).

Вміст сіалової кислоти в поверхневому слизі товстої кишки збільшився в 4 рази у плацебо-оперованих щурів ( $P < 0,01$ ) і в 3,5 рази в групі 6-ОНДА-ХП ( $P < 0,05$ ) через 7 місяців у порівнянні з відповідними групами через 1 місяць від початку експерименту. Рівень сіалової кислоти в групі з ХП на 7-му місяці був на 11% нижчим порівняно з відповідно групою плацебо-оперованих щурів (Рис. 3.11.Г). Вміст фукози різко зріс на 7-му місяці в 16 разів у групі плацебо-оперованих ( $P < 0,05$ ) і в 23 рази в групі 6-ОНДА-ХП в порівнянні з 1-м місяцем експерименту ( $P < 0,05$ ) (Рис. 3.11.Д).

## Висновки до розділу

1. Вперше комплексно досліджено та співставлено показники НМС (моторно-евакуаторну функцію ШКТ, харчову та питну поведінку, зміни просвітної мікробіоти) із ступенем нейродегенеративних порушень, поведінкових і локомоторних реакцій на 6-OHDA та LPS моделях експериментального паркінсонізму у щурів. Обидві моделі є адекватними і відтворюваними, проте патологічні порушення при 6-OHDA моделі більш схожі на клінічну картину ХП з боку змін в ШКТ. Зокрема у щурів з 6-OHDA-ХП спостерігалось пригнічення моторної функції товстої кишки, а також швидкості кишкового транзиту вздовж травного каналу. Тому саме 6-OHDA модель може бути використана як експериментальна основа для вивчення ранніх НМС.
2. Враховуюючи той факт, що миші, іноді є більш широко використовуваним типом тварин у сучасних фармакологічних експериментах, нами вперше, з використанням ротенонової моделі ХП у мишей, було показано пригнічення моторно-евакуаторної функції ШКТ асоційованого з розвитком поведінкових і локомоторних симптомів ХП.
3. Через 7 місяців після моделювання 6-OHDA-ХП показники поведінкових та локомоторних реакції в Open field тесті ставали менш виразними у порівнянні з показниками на 1-й місяць після введення 6-OHDA. Через 7 місяців у щурів збільшувалася маса тіла, причому щури з 6-OHDA-ХП набирали більше маси тіла, ніж відповідна група плацебо, що супроводжувалося споживанням більшої кількості їжі на день. .
4. Ми вперше повідомили про віддалені зміни кишечника за 6-OHDA-індукованої ХП *in vivo* на 7-му місяці експерименту. Ми виявили, що швидкість кишкового транзиту у 7-місячних щурів з часом подвоюється, проте цей показник є повільнішим у щурів із ХП, наслідком чого спостерігаються закрепи у щурів із ХП.
5. У щурів із LPS-індукованим паркінсонізмом спостерігаються більш суттєві зміни мікробіоти ШКТ, ніж у 6-OHDA моделі через 1 місяць моделювання

- ХП. Проте, у щурів з 6-OHDA-ХП зміни у складі просвітної мікробіоти прогресують з часом і можуть бути виявлені вже через 2-місяці після моделювання ХП.
6. У віддалені терміни 6-OHDA-індукованого паркінсонізму через 7 місяців від початку моделювання ХП, спостерігається поява якісних змін глікопротеїнів слизу, що може супроводжуватися подовженням вуглеводних ланцюгів глікопротеїнів. Зміни вуглеводного складу поверхневого слизу товстої кишки можуть призводити до порушення в'язкості слизу, взаємодії з бактеріями кишкової мікробіоти, електролітами в результаті чого порушується бар'єрна функція епітеліального шару кишечника.

## РОЗДІЛ 4. РОЛЬ TRPV4 ТА TRPM8 ІОННИХ КАНАЛІВ У КИШЕЧНИКУ ЩУРІВ З 6-ОНДА-ІНДУКОВАНИМ ПАРКІНСОНІЗМОМ

У розділі 3 ми показали, що нейродегенерація DA нейронів у середньому мозку щурів за умов 6-ОНДА-індукованого паркінсонізму супроводжується розладами з боку функціонування ШКТ, зокрема затримка моторно-евакуаторної функції кишечника, порушення кишкового мікробіоценозу та стану слизового бар'єру. У дослідженнях інших авторів показано, що зміни з боку ШКТ в патогенезі ХП можуть бути обумовлені молекулярними змінами в кишечнику. Зокрема, Liu X. із співавторами в 2021 році [181] опублікували результати досліджень проведених на мишах з хронічною МРТР-індукованою моделлю ХП. Було встановлено взаємозв'язок між кількістю TH-позитивних клітин у товстій кишці та станом моторної функції кишечника. Зокрема вони показали, що за даної моделі спостерігалось збільшення TH-позитивних клітин у товстій кишці мишей, що асоціювалось з нормальною функцією кишечника на фоні протилежного ефекту в мозку.

Тому на наступному етапі нашого дослідження ми вивчали молекулярні механізми порушення функції ШКТ у різні терміни 6-ОНДА-індукованого паркінсонізму у щурів.

### 4.1. Локалізація та рівень тирозингідроксилази у товстій кишці щурів з 6-ОНДА-індукованим паркінсонізмом

На 1-й місяць експерименту імуногістохімічно встановлено 2-кратне зменшення інтенсивності забарвлення TH у товстій кишці щурів з 6-ОНДА-паркінсонізмом ( $Q=2,00\pm 0,00$ ) у порівнянні з контрольною групою ( $Q=4,00\pm 0,00$ ) (Рис. 4.1.). Локалізація TH-позитивних клітин - апікально в епітеліоцитах товстої кишки.

Ці дані підтвердженні вестерн-блот аналізом (Рис. 4.2.). Нормалізація відбувалася за  $\beta$ -актином. Значення рівня TH у плацебо-оперованих щурів становить  $5,27 \pm 3,12$  ум.од., тоді як у щурів з 6-OHDA-ХП значення зменшуються майже вдвічі до  $2,81 \pm 1,62$  ум.од.

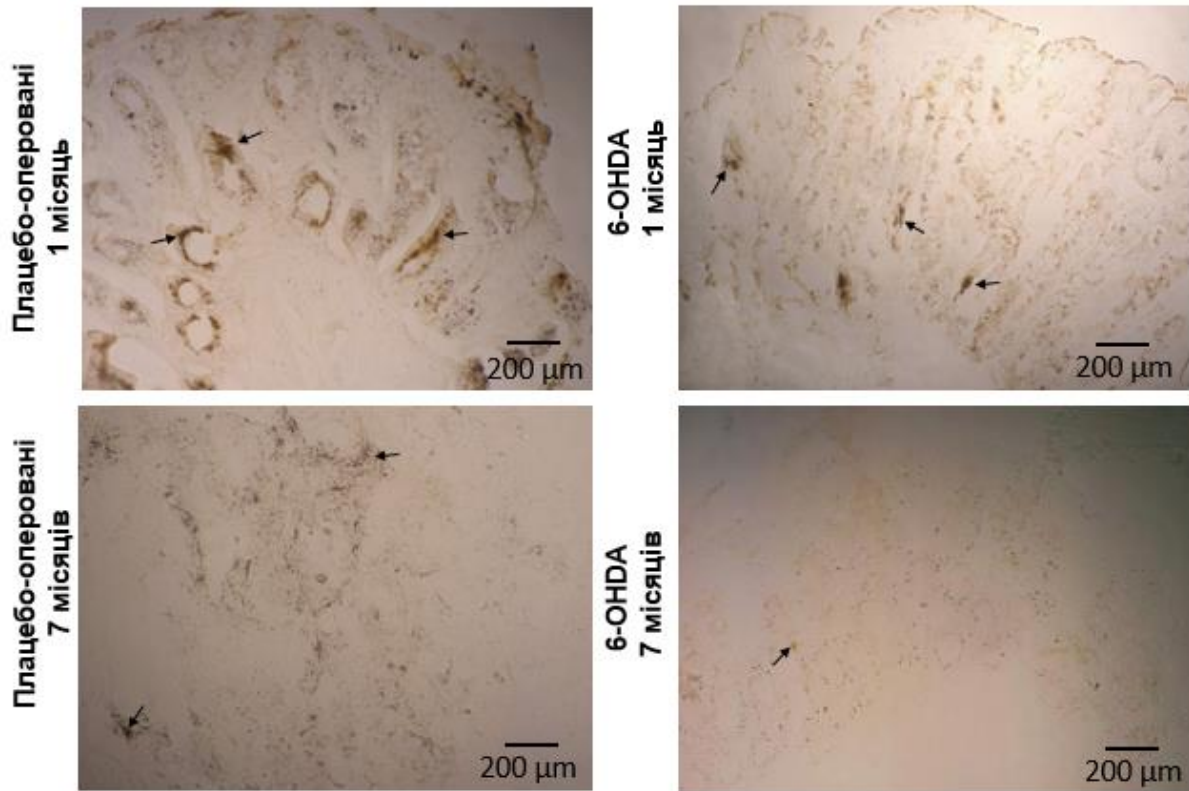


Рис. 4.1. Мікрофотографії парафінових зрізів товстої кишки щурів (5 мкм) через 1 і 7 місяців після моделювання 6-OHDA-ХП. TH-позитивне імуофарбування ( $\rightarrow$ , коричневий колір) DA нейронів товстої кишки. А – парафінові зрізи товстої кишки плацебо-оперованих щурів через 1 місяць експерименту, Б – парафінові зрізи товстої кишки щурів з 6-OHDA-ХП через 1 місяць експерименту, В – парафінові зрізи товстої кишки плацебо-оперованих щурів через 7 місяців експерименту, Г – парафінові зрізи товстої кишки щурів з 6-OHDA-ХП через 7 місяців експерименту.  $n=20$ , (x200).

Слід зазначити, що у контрольній групі щурів, на 7-му місці експерименту відбувалося фізіологічне зниження інтенсивності забарвлення TH-позитивних клітин у товстій кишці (Рис. 4.1.) у порівнянні з контрольною групою через 1 місяць після моделювання ХП. У щурів з 6-OHDA-ХП через 7 місяців

експерименту ТН-позитивні клітини в товстій кишці щурів майже не ідентифікувалися.

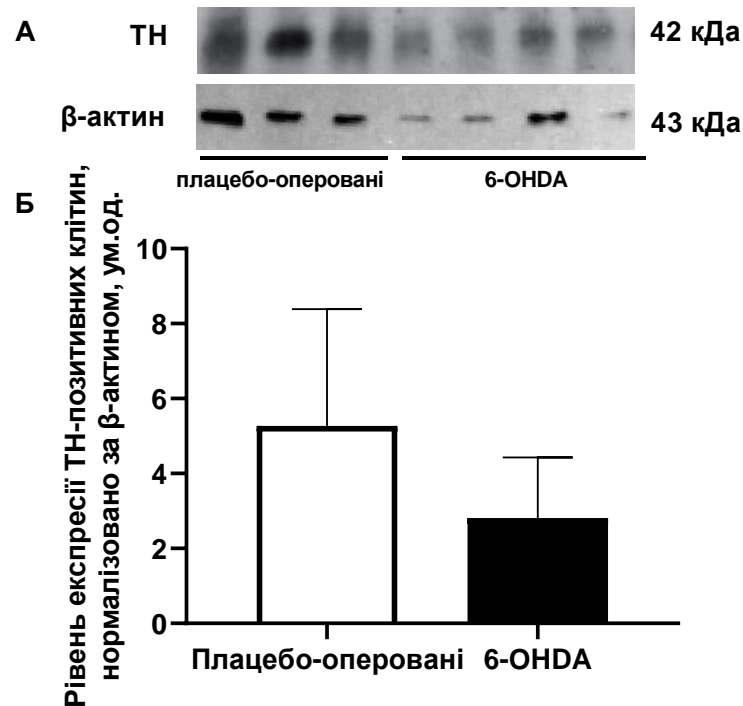


Рис. 4.2. Рівень експресії ТН у слизовій оболонці товстої кишки щурів з 6-OHDA-ХП визначений методом вестерн-блот: А – блотограма, Б – співвідношення кількості ТН до β-актину.  $M \pm SD$ ;  $n=7$ .

Таким чином, наше дослідження показало зниження рівня ТН у слизовій оболонці товстої кишки щурів з 6-OHDA-ХП, що на фізіологічному рівні відображається у порушенні секретомоторної та бар'єрної функції товстої кишки щурів.

#### 4.2. Роль TRPV4 іонних каналів у регуляції моторної, секреторної та бар'єрної функції товстої кишки щурів з 6-OHDA-індукованим паркінсонізмом

##### 4.2.1. Експресія та локалізація TRPV4 іонних каналів у товстій кишці щурів з 6-OHDA-індукованим паркінсонізмом

Імуногістохімічну ідентифікацію TRPV4 іонних каналів у товстій кишці щурів з паркінсонізмом проводили на 1-й та 7-й місяць експерименту. Ми спостерігали підвищену інтенсивність TRPV4-позитивного забарвлення у товстій кишці щурів із 6-OHDA-ХП ( $Q=3,66\pm 0,58$ ), що відповідає приблизно 50-75% TRPV4-позитивного забарвлення у порівнянні з плацебо-оперованими щурами ( $Q=2,66\pm 0,57$ ) на 1-й місяць експерименту (Рис. 4.3.). Локалізація TRPV4 іонних каналів була переважно апікально на епітеліоцитах товстої кишки щурів.

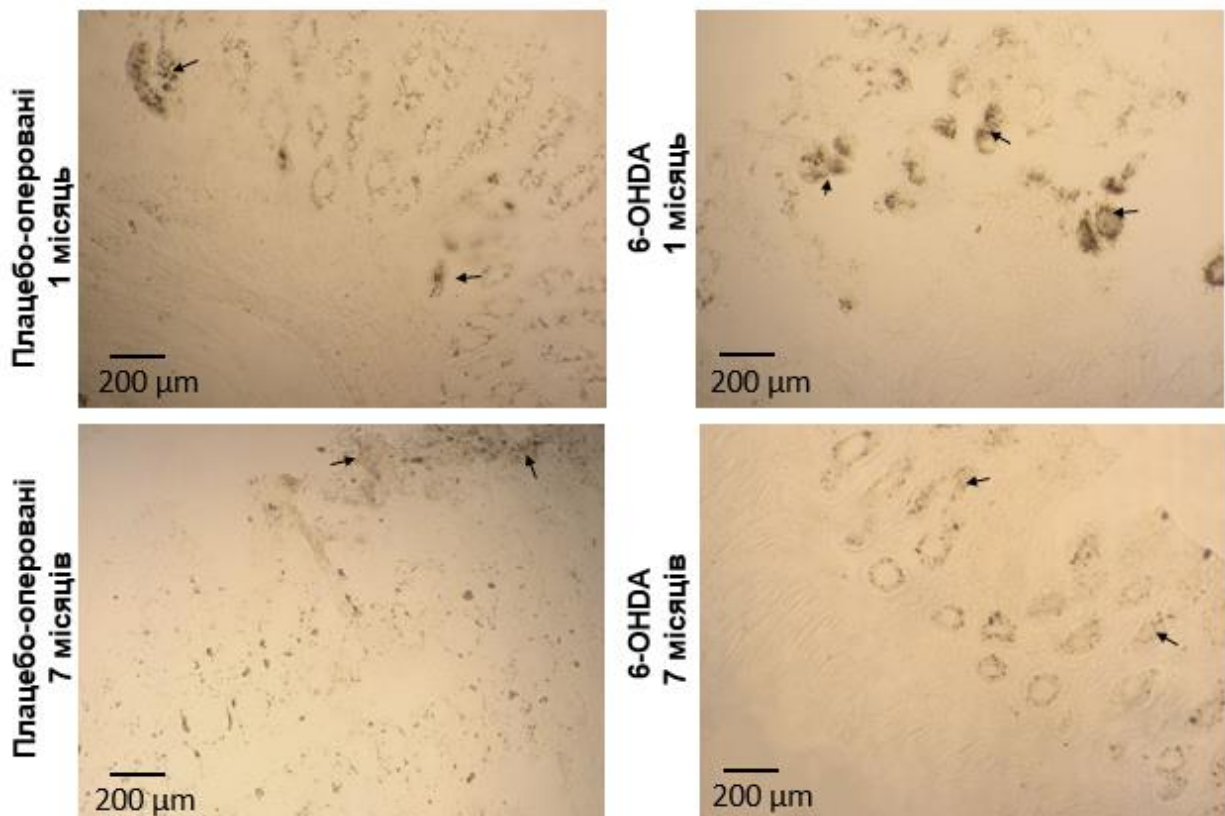


Рис. 4.3. Мікрофотографії парафінових зрізів товстої кишки щурів (5 мкм) через 1 і 7 місяців після моделювання 6-OHDA-ХП. Позитивне імунофарбування ( $\rightarrow$ , коричневий колір) TRPV4 іонних каналів товстої кишки. А – парафінові зрізи товстої кишки плацебо-оперованих щурів через 1 місяць експерименту, Б – парафінові зрізи товстої кишки щурів з 6-OHDA-ХП через 1 місяць експерименту, В – парафінові зрізи товстої кишки плацебо-оперованих щурів через 7 місяців експерименту, Г – парафінові зрізи товстої кишки щурів з 6-OHDA-ХП через 7 місяців експерименту.  $n=20$ , (x200).

Також нами було досліджено рівень експресії TRPV4 іонних каналів у слизовій оболонці товстої кишки щурів з 6-OHDA моделлю ХП методом вестерн-блот на 1-й місяць експерименту. Експресія TRPV4 каналів знаходиться на низькому рівні, можливо саме через їх невелику кількість в товстій кишці. Значення рівня експресії TRPV4 іонних каналів у плацебо-оперованих щурів становить  $2,23 \pm 0,94$  ум.од., тоді як у щурів з 6-OHDA-ХП значення збільшені вдвічі до  $5,26 \pm 2,95$  ум.од (Рис. 4.4.). Дані значення співвідносяться із показниками імуногістохімічного дослідження (Рис. 4.3.).

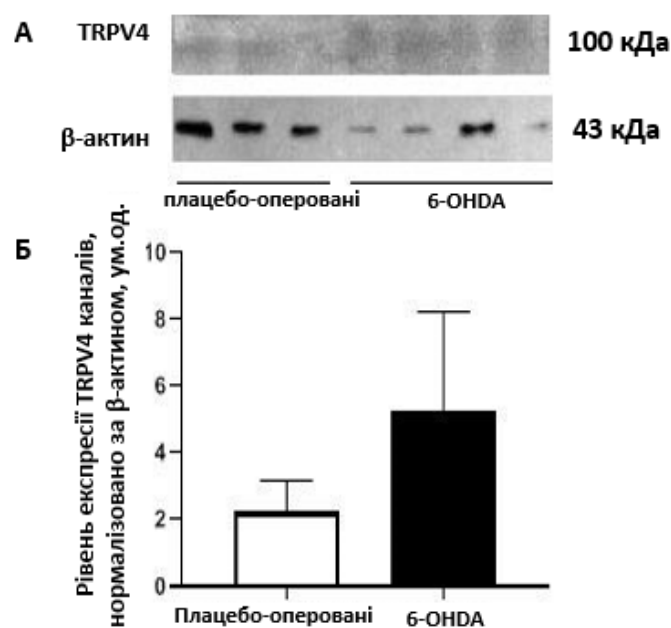


Рис. 4.4. Рівень експресії TRPV4 іонних каналів у слизовій оболонці товстої кишки щурів з 6-OHDA-ХП визначений методом вестерн-блот: А – блотограма, Б – співвідношення кількості TRPV4 іонних каналів до β-актину.  $M \pm SD$ ;  $n=7$ .

Слід зазначити, що аналогічно ситуації з кількістю TH-позитивних клітин в товстій кишці, ми спостерігали зменшення інтенсивності забарвлення TRPV4 іонних каналів у групі плацебо-оперованих щурів через 7 місяців від початку експерименту. Проте, за умов 6-OHDA-ХП, навіть через 7 місяців інтенсивність забарвлення TRPV4-позитивних клітин була вищою у порівнянні з групою плацебо (Рис. 4.3.).

Таким чином, результати дослідження показали вдвічі збільшення експресії TRPV4 іонних каналів у слизовій оболонці товстої кишки у щурів з 6-OHDA-ХП.

#### 4.2.2. Роль TRPV4-іонних каналів у моторній функції товстої кишки щурів з 6-OHDA-індукованим паркінсонізмом

На 1-й місяць експерименту ми проводили дослідження дії агоніста TRPV4 іонних каналів (0,3 мкМ GSK1016790A) на скоротливу активність ізольованої ділянки дистального відділу товстої кишки у щурів з 6-OHDA-ХП методом балонографії *in vitro* (див. п. 2.9.4, протокол Рис. 2.5.) Максимальний пік скорочення за стимуляції 1 мкМ карбахоліном ізольованої ділянки товстої кишки у плацебо-оперованих щурів становив  $42,14 \pm 7,79$ , що на 14% більше, ніж у щурів з ХП ( $36,13 \pm 8,63$ ) (Рис. 4.5.A). Достовірних змін не спостерігалось.

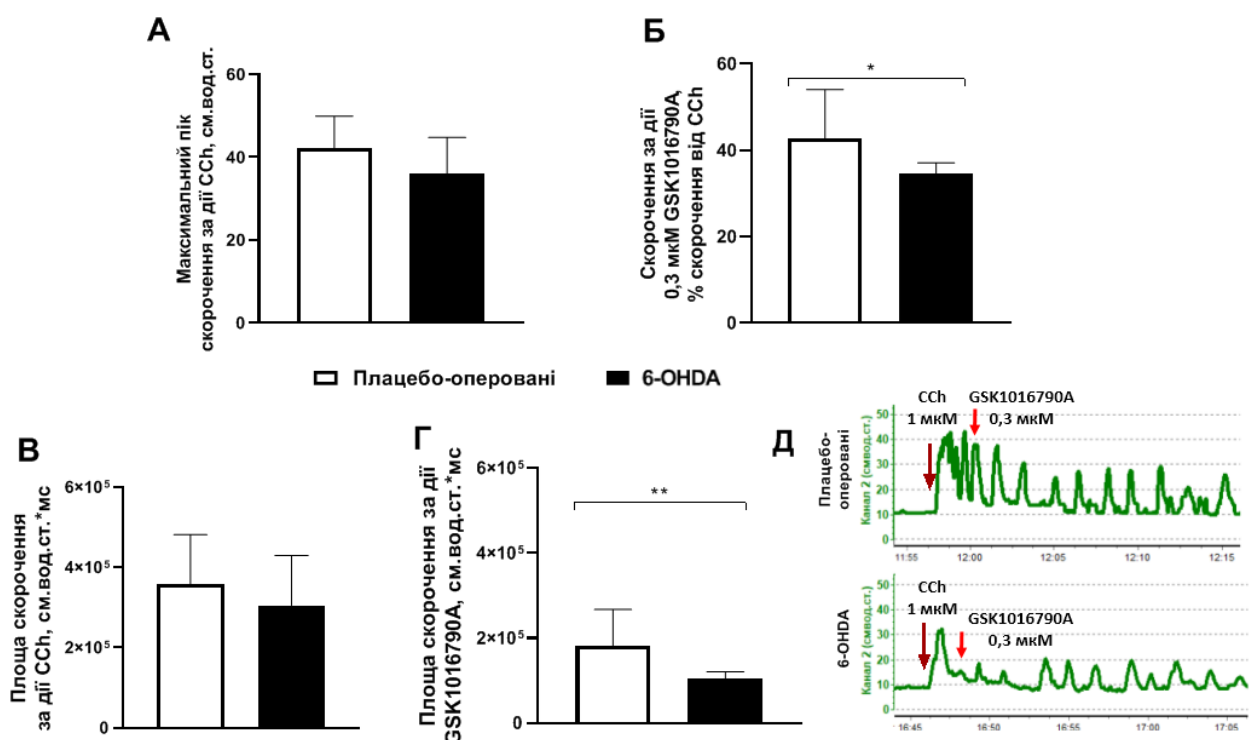


Рис. 4.5. Дія агоніста (0,3 мкМ GSK1016790A) TRPV4 іонних каналів на скоротливу активність ізольованої ділянки дистального відділу товстої кишки щурів з 6-OHDA-ХП на 1-й місяць експерименту методом балонографія *in vitro*:

А - максимальний пік скорочення за стимуляції 1 мкМ карбахоліном (CCh) ізольованої ділянки дистального відділу товстої кишки; Б – скорочення ізольованої ділянки дистального відділу товстої кишки за дії 0,3 мкМ GSK1016790A, % скорочення по відношенню до скорочення за дії карбахоліну; В - площа скорочення за дії карбахоліну, см.вод.ст\*мс; Г - площа скорочення за дії 0,3 мкМ GSK1016790A, см.вод.ст\*мс; Д – оригінальні записи скорочень за дії 0,3 мкМ GSK1016790A. N=10, n=10; \*\* P<0,01 (M ± SD).

Запис здійснювали на фоні карбахолін-стимульованої моторики. Одним з показників, що визначали – це відсоток максимального піку скорочення за дії речовин по відношенню до максимального піку скорочення за дії карбахоліну. Скорочення за дії агоніста TRPV4 каналів GSK1016790A на ізольовану ділянку товстої кишки у щурів з 6-OHDA-ХП по відношенню до стимулятора карбахоліну становив на 19% менше за показники контрольної групи (34,66±2,45 та 42,76±11,33 відповідно) (P<0,05) (Рис. 4.5.Б).

Одним з важливих біофізичних параметрів роботи ГМ, який характеризує скоротливу активність м'язу, є площа під кривою (площа скорочення). У ході експерименту було показано, що площа скорочень за дії карбахоліну у групи щурів з 6-OHDA-індукованим паркінсонізмом та плацебо-оперованих щурів майже не відрізняється (Рис 4.5.В). Тоді як площа під кривою за дії агоніста TRPV4 каналів зменшилась на 44% (P<0,01) у щурів з ХП в порівнянні з контрольною групою (1,0\*10<sup>5</sup> та 1,8\*10<sup>5</sup> см.вод.ст.\*мс відповідно) (Рис. 4.5.Г).

Також варто зауважити, що дані скоротливої активності ізольованої ділянки товстої кишки *in vitro* співпадають із даними стимульованої моторної активності дистального відділу товстої кишки, який визначали методом балонографії *in vivo* (п. 3.1.6., Рис. 3.5.). Площа під кривою скорочення відповідає ІМА і достовірно (P<0,05) знижується за дії карбахоліну у щурів з 6-OHDA-ХП.

Щоб додатково підтвердити роль TRPV4 іонних каналів у моториці товстої кишки, ми провели дослідження на ізольованій ділянці ГМ товстої кишки методом тензометрії *in vitro*. Ми фіксували ізометричний натяг ГМ товстої

кишки щурів з 6-OHDA-ХП. У нашому дослідженні максимальна скоротлива активність ГМ товстої кишки після активації 80 мМ КСІ була знижена у щурів із 6-OHDA-ХП до  $2,13 \pm 1,44$  г, що на 16% менше, ніж у групі плацебо-оперованих щурів (Рис. 4.6.А).

Результат дії агоніста TRPV4 GSK1016790A на ГМ товстої кишки щурів з 6-OHDA-ХП був меншим на 46%, ніж у плацебо-оперованих щурів ( $P < 0,05$ ) (Рис. 4.6.Б).

У даному дослідженні ми вперше повідомляємо про вплив агоніста TRPV4 каналів на моторику товстої кишки у щурів з 6-OHDA-індукованою ХП *in vitro*. Таким чином, активація TRPV4 іонних каналів знижує скоротливу активність товстої кишки у щурів з 6-OHDA-індукованою ХП. Тому TRPV4 іонні канали можуть представляти перспективну терапевтичну мішень для корекції порушень моторики ШКТ при патогенезі ХП.

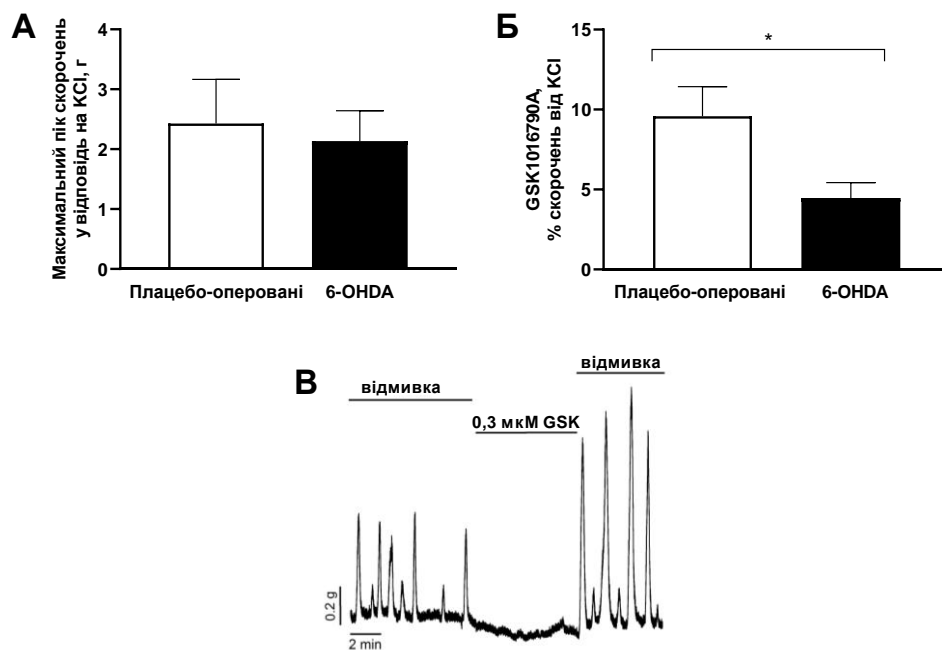


Рис. 4.6. Скоротлива активність товстої кишки щурів з 6-OHDA-ХП за дії агоніста TRPV4 іонних каналів методом тензометрії: А – максимальний пік скорочення за стимуляції 80 мМ КСІ гладеньком’язових смужок товстої кишки, г, N=16, n=32; Б - вплив агоніста TRPV4 іонних каналів (0,3 мкМ GSK1016790A) на скорочення гладеньком’язових смужок товстої кишки, %, В – оригінальний

запис скорочень ГМ товстої кишки щурів з 6-OHDA-ХП за дії 0,3 мкМ GSK1016790A. N=10, n=10; \* P<0,05 (M±SD).

4.2.3. Вплив лігандів TRPV4 іонних каналів на кишкову секрецію, цілісність щільних контактів та трансепітеліальну проникність епітелію товстої кишки щурів з 6-OHDA-індукованим паркінсонізмом

Нами також було досліджено дію агоністу TRPV4 іонних каналів GSK1016790A на кишкову секрецію, цілісність щільних контактів та трансепітеліальну проникність епітелію товстої кишки щурів з 6-OHDA-експериментальною ХП, за допомогою камери Усінга.

У всіх досліджуваних груп спостерігалось зниження струму короткого замикання у товстій кишці з часом, що свідчить про знижену секрецію та транспорт іонів через епітелій кишки (Рис. 4.7.А). Для контрольної групи (плацебо-оперовані+ДМСО) початкове значення становило  $63,04 \pm 19,7 \mu\text{A}/\text{cm}^2$  і через 45 хвилин знижувалось до  $33,60 \pm 21,7 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ . Для контрольної групи (плацебо-оперовані+GSK1016790A) ці значення становили  $54,8 \pm 14,5 \mu\text{A}/\text{cm}^2$  і через 45 хвилин зменшувалось до  $9,2 \pm 22,9 \mu\text{A}/\text{cm}^2$  (P<0,05). Початкові значення струму короткого замикання у товстій кишці щурів з 6-OHDA моделлю-ХП були на  $20 \mu\text{A}/\text{cm}^2$  більшими за значення контрольної групи. Щурі з 6-OHDA-ХП+ДМСО були на рівні  $83,85 \pm 16,0 \mu\text{A}/\text{cm}^2$  і зменшувалось до  $57,24 \pm 21,01 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ , тоді коли 6-OHDA-ХП + GSK1016790A – значення зменшувались з  $69,6 \pm 8,69 \mu\text{A}/\text{cm}^2$  до  $46,07 \mu\text{A}/\text{cm}^2$  (P<0,05).

У щурів з 6-OHDA-ХП спостерігалось менш інтенсивний показник струму короткого замикання при додавання стимулятора карбахоліну (50 мкМ) з латеральної сторони товстої кишки ( $484,88 \pm 187,44 \mu\text{A}/\text{cm}^2$  та  $328,20 \pm 137,85 \mu\text{A}/\text{cm}^2$  відповідно) у порівнянні з групою плацебо (P<0,05). При додаванні карбахоліну у щурів обох дослідних груп за дії GSK1016790A спостерігалася тенденція до зниження струму короткого замикання, що свідчить про понижену

секрецію іонів  $\text{Cl}^-$  (Рис. 4.7.Б). Пікові значення струму короткого замикання за дії карбахоліну у щурів з паркінсонізмом у порівнянні з плацебо-оперованими тваринами менше на  $70 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ . Відповідь на карбахолін за дії GSK1016790A у плацебо-оперованих щурів та у щурів з 6-OHDA моделлю ХП становило  $382,58 \pm 167,054 \mu\text{A}/\text{cm}^2$  та  $329,13 \pm 122,77 \mu\text{A}/\text{cm}^2$  відповідно.

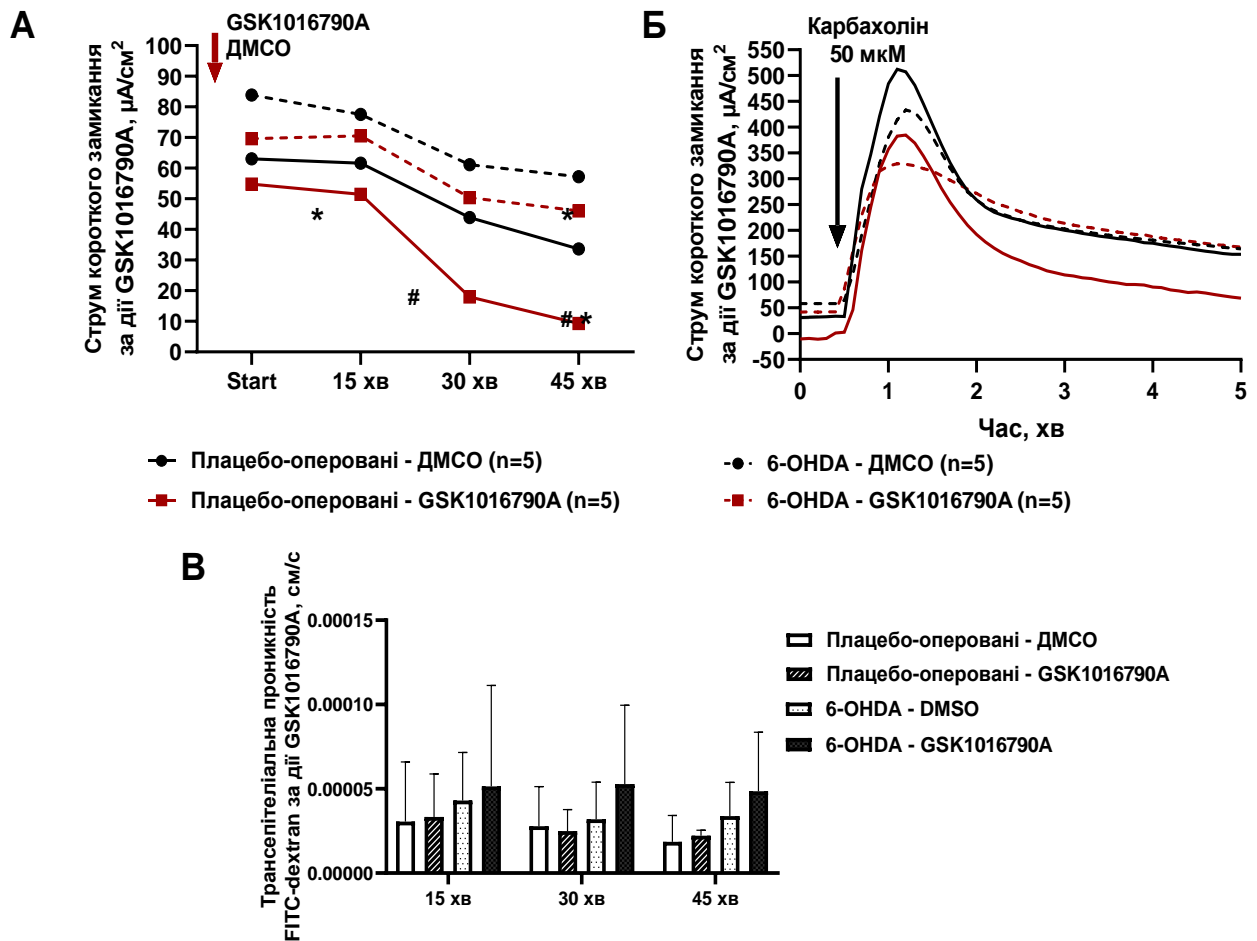


Рис. 4.7. Роль агоніста TRPV4 іонних каналів GSK1016790A ( $0,3 \mu\text{M}$ ) на електрофізіологічні показники епітелію товстої кишки за 6-OHDA моделі ХП. Контрольною речовиною виступав  $0,01\%$  ДМСО. А - зміна струму короткого замикання препаратів епітелію товстої кишки,  $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ ; Б - вплив карбахоліну ( $50 \mu\text{M}$ ) на показники струму короткого замикання препаратів епітелію товстої кишки,  $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ ; В - зміна трансепітеліальної проникності FITC-декстрану через препарати епітелію товстої кишки, см/с.  $n=10$ ,  $N=20$ . \* -  $P < 0,05$  у порівнянні із стартовою точкою, # -  $P < 0,05$  в порівнянні з 15 хв експерименту.

Таким чином, було показано, що у плацебо-оперованих щурів внаслідок активації TRPV4 іонних каналів спостерігається зниження електрогенного транспорту іонів через епітелій товстої кишки. У щурів з 6-OHDA-індукованим паркінсонізмом активація каналів GSK1016790A не справляла аналогічного ефекту на електрогенний транспорт, проте ми спостерігали зниження рівня карбахолін-стимульованого транспорту іонів через епітелій товстої кишки щурів.

У ході дослідження також було показано, що трансепітеліальна проникність FITC-декстрану через епітелій товстої кишки у щурів з ХП через 15 хв після дії ДМСО була більшою, ніж у плацебо-оперованих щурів  $4,03 \cdot 10^{-5}$  см/с та  $3,06 \cdot 10^{-5}$  см/с відповідно. За дії GSK1016790A ці значення становили  $5,14 \cdot 10^{-5}$  см/с та  $3,3 \cdot 10^{-5}$  см/с відповідно. GSK1016790A збільшує трансепітеліальну проникність епітелію товстої кишки щурів з паркінсонізмом на  $2 \cdot 10^{-5}$  см/с. На 45 хв дії речовин тенденція залишалася незмінною. Достовірних змін не спостерігалось.

#### 4.3. Роль TRPV8 іонних каналів у регуляції моторної та секреторної функції товстої кишки щурів з 6-OHDA-індукованим паркінсонізмом

##### 4.3.1. Експресія та локалізація TRPM8 іонних каналів у товстій кишці щурів з 6-OHDA-індукованим паркінсонізмом

Імуногістохімічну ідентифікацію TRPM8 іонних каналів у товстій кишці щурів з паркінсонізмом проводили на 1-й та 7-й місяць експерименту. На 1-й місяць експерименту було встановлено майже повне зникнення рецепторів TRPM8 іонних каналів у товстій кишці щурів з 6-OHDA-експериментальним паркінсонізмом у порівнянні з контрольною групою ( $Q=1,33 \pm 0,58$ ) (Рис. 4.8.). TRPM8 іонні канали локалізуються апікально на епітеліоцитах товстої кишки щурів.

Ці дані підтвердженні вестерн-блот аналізом (Рис. 4.9.). Значення рівня експресії TRPM8 іонних каналів у плацебо-оперованих щурів на 1-й місяць експерименту становлять  $1,74 \pm 0,74$  ум.од., тоді як у щурів з 6-OHDA-ХП спостерігається тенденція до зменшення ( $1,09 \pm 0,70$  ум.од.).

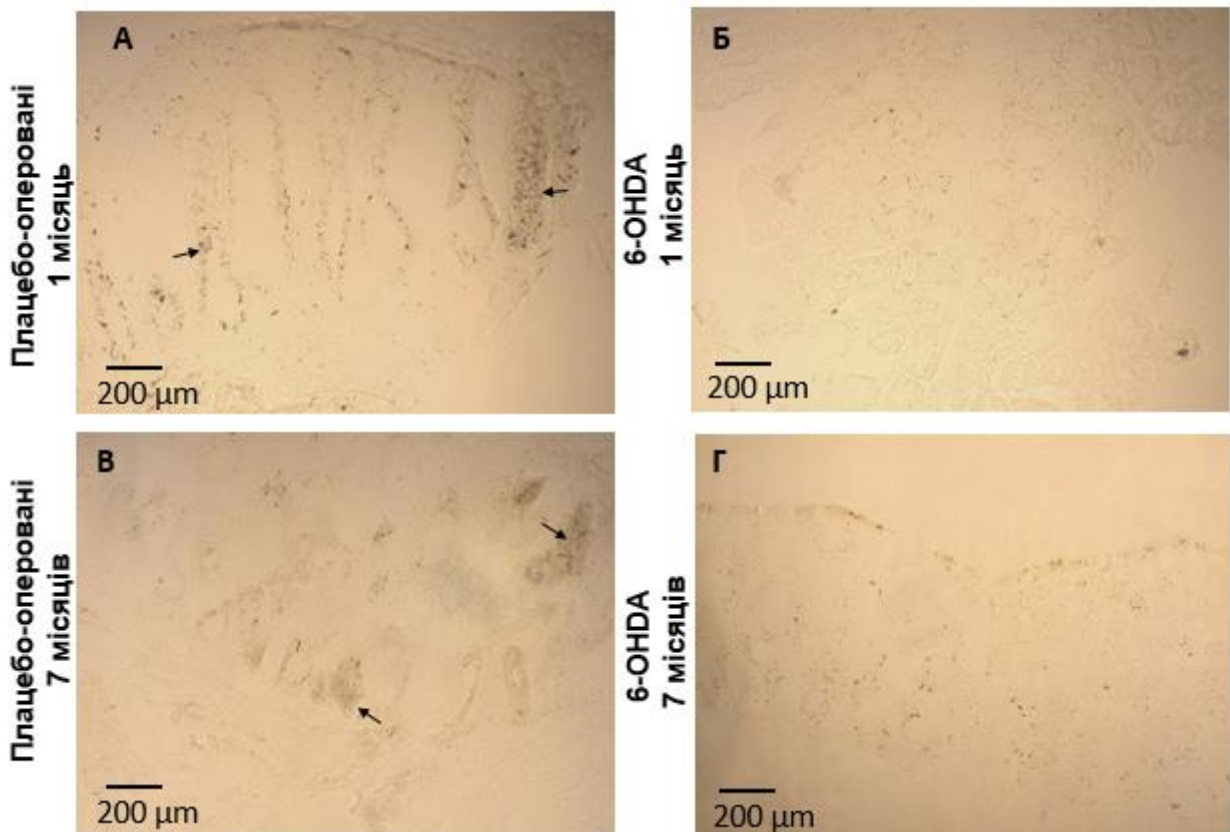


Рис. 4.8. Мікрофотографії парафінових зрізів товстої кишки щурів (5 мкм) через 1 і 7 місяців після моделювання 6-OHDA-ХП. Позитивне імунофарбування ( $\rightarrow$ , коричневий колір) TRPM8 іонних каналів товстої кишки. А – парафінові зрізи товстої кишки плацебо-оперованих щурів через 1 місяць експерименту, Б – парафінові зрізи товстої кишки щурів з 6-OHDA-ХП через 1 місяць експерименту, В – парафінові зрізи товстої кишки плацебо-оперованих щурів через 7 місяців експерименту, Г – парафінові зрізи товстої кишки щурів з 6-OHDA-ХП через 7 місяців експерименту.  $n=20$ , (x200).

Слід зазначити, що на 7-й місяць експерименту змін у рівні експресії TRPM8 іонних каналів у товстій кишці плацебо-оперованих щурів майже не спостерігалось (Рис. 4.8.). У щурів з 6-OHDA-ХП через 7 місяців експерименту

не ідентифікувалися TRPM8 іонні канали у товстій кишці щурів так само, як і на 1-й місяць експерименту у цій дослідній групі.

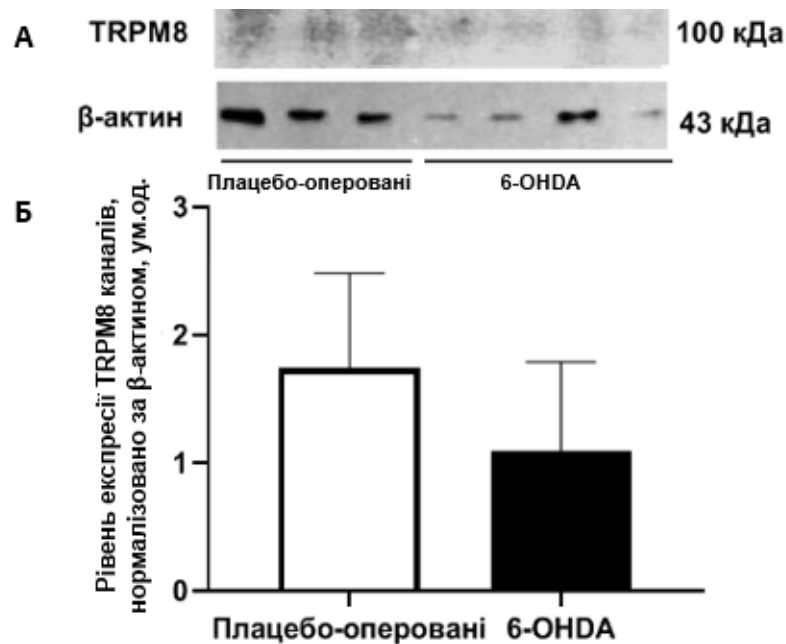


Рис. 4.9. Рівень експресії TRPM8 іонних каналів у слизовій оболонці товстої кишки щурів з 6-OHDA-ХП визначений методом вестерн-блот: А – блотограма, Б – співвідношення кількості TRPM8 іонних каналів до  $\beta$ -актину.  $n=7$ .  $M \pm SD$ .

Таким чином, наше дослідження показало майже повне зникнення експресії TRPM8 іонних каналів у слизовій оболонці товстої кишки у щурів з 6-OHDA-ХП.

#### 4.3.2. Роль TRPM8 іонних каналів у моторній функції товстої кишки щурів з 6-OHDA-індукованим паркінсонізмом

На 1 місяць експерименту ми проводили дослідження дії агоніста (100 мкМ ментолу) TRPM8 іонних каналів на скоротливу активність ізольованої ділянки дистального відділу товстої кишки у щурів методом балонографії *in vitro*.

Максимальний пік скорочення ізольованої ділянки дистального відділу товстої кишки за дії 1 мкМ карбахоліну у плацебо-оперованих щурів становив

64,19±14,45 см.вод.ст., що на 30% більше, ніж у щурів з ХП (44,63±17,47 см.вод.ст.) (Рис. 4.10.А). Достовірних відмінностей не спостерігалось. Площа скорочень за дії карбахоліну у групи щурів з 6-ОНДА-індукованим паркінсонізмом та плацебо-оперованих щурів зменшилася на 23% і становить ( $3,0 \cdot 10^5$  та  $4,7 \cdot 10^5$  см.вод.ст.\*мс відповідно) ( $P < 0,05$ ) (Рис. 4.10.В).

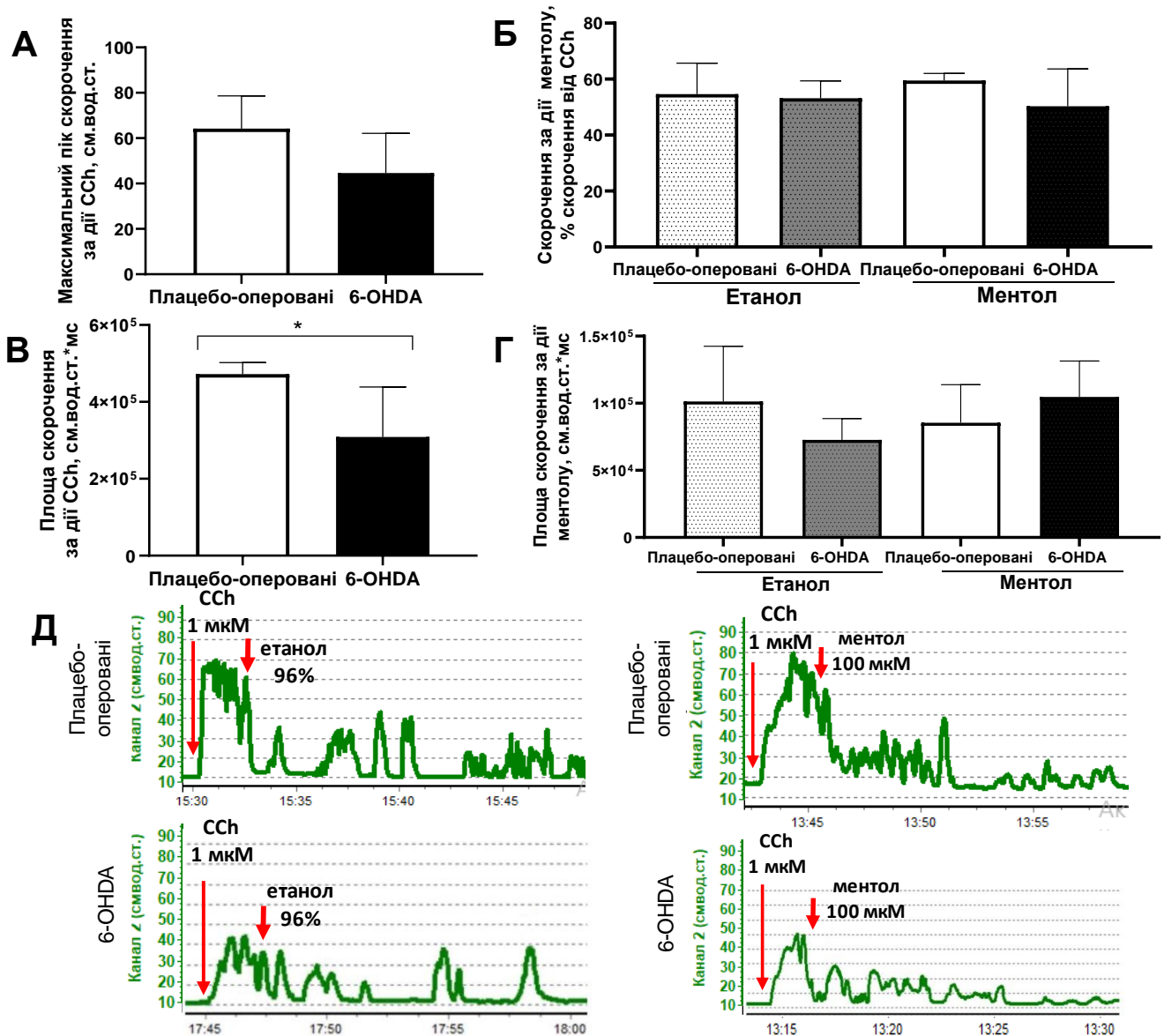


Рис. 4.10. Роль TRPM8 іонних каналів в скоротливій активності ізольованої ділянки дистального відділу товстої кишки у щурів з 6-ОНДА-ХП: А - максимальний пік скорочення після стимуляції 1 мкМ карбахоліном (ССh) ізольованої ділянки дистального відділу товстої кишки; Б – скорочення ізольованої ділянки дистального відділу товстої кишки за дії 100 мкМ ментолу, % скорочення по відношенню до скорочення за дії карбахоліну; В – площа

скорочення за дії карбахоліну, см.вод.ст\*мс; Г – площа скорочення за дії 100 мкМ ментолу, см.вод.ст\*мс; Д – оригінальні записи скорочень за дії етанолу та ментолу на ізольовану ділянку дистального відділу товстої кишки щурів. n=10, N=20. (M±SD). \*P<0,05

Балонографічне дослідження скоротливої функції ізольованої ділянки дистального відділу товстої кишки *in vitro* за дії агоніста TRPM8 іонних каналів проводили на фоні дії карбахоліну. В якості контролю виступав етанол (розчинник ментолу).

У плацебо-оперованих тварин максимальний пік скорочення за дії етанолу по відношенню до скорочення за дії карбахоліну становив 54,63±11,05 %. У щурів з ХП значення за дії етанолу становили 53,15±6,24 (Рис. 4.10.Б.). За дії ментолу у щурів з 6-OHDA-ХП відсоток скорочення по відношенню до карбахоліну становив 50,33±13,30 %, що на 15% менше, ніж у плацебо-оперованих щурів 59,52±2,51 %. Достовірних змін не спостерігалось.

Площа скорочення у щурів з ХП за дії етанолу на 28% менша за значення у щурів групи плацебо-оперованих ( $7,2 \cdot 10^4 \pm 1,5$  та  $1,0 \cdot 10^5 \pm 4,1$  см.вод.ст.\*мс відповідно) (Рис. 4.10.Г.). За дії ментолу площа скорочення ізольованої ділянки товстої кишки збільшилася на 22% у щурів з 6-OHDA-ХП у порівнянні з групою плацебо-оперованих тварин і становила  $1 \cdot 10^5 \pm 2,7$  та  $8,5 \cdot 10^4 \pm 2,8$  см.вод.ст.\*мс відповідно.

Також для підтвердження ролі TRPM8 іонних каналів у скоротливій активності товстої кишки у щурів з ХП ми також реєстрували ізометричне скорочення смужок ГМ товстої кишки методом тензометрія.

Максимальна скорочувальна активність ГМ після активації 80 мМ КСІ була знижена у щурів з 6-OHDA-ХП до  $1,38 \pm 0,34$  г в порівнянні з контрольною групою ( $1,93 \pm 1,06$  г) (Рис. 4.11.А). За дії ментолу не спостерігалось значних змін в скороченні ГМ товстої кишки у щурів з модельованим паркінсонізмом (Рис. 4.11.Б).

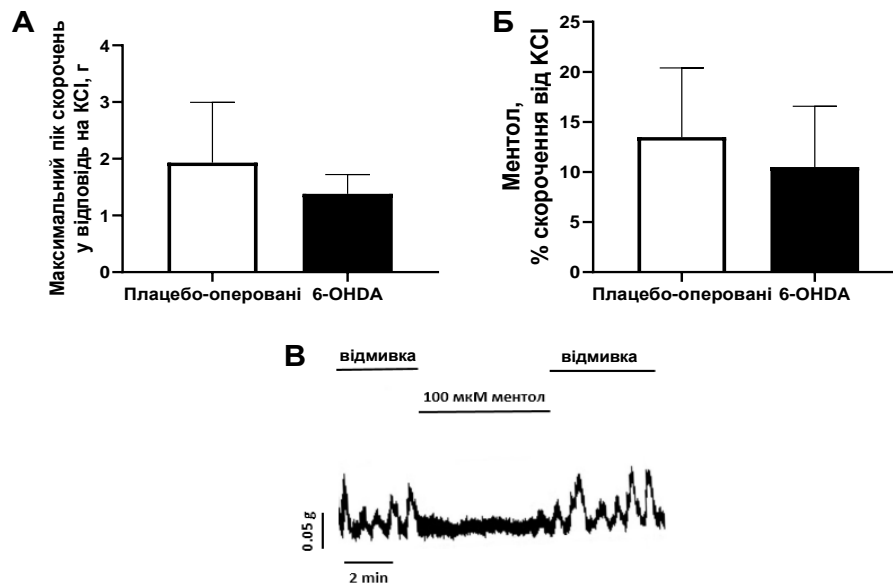


Рис. 4.11. Скоротлива активність товстої кишки щурів з 6-OHDA-ХП за дії агоніста TRPM8 іонних каналів методом тензометрії: А - максимальний пік скорочення за стимуляції 80 мМ КСІ гладеньком'язових смужок товстої кишки, г; Б – вплив агоніста TRPM8 іонних каналів 100 мкМ ментолу на скорочення гладеньком'язових смужок товстої кишки, %; В - оригінальний запис скорочень ГМ товстої кишки щурів з 6-OHDA-ХП за дії 100 мкМ ментолу. N=10, n=10. (M ± SD).

#### 4.3.3. Вплив лігандів TRPM8 іонних каналів на транспорт іонів через епітелій товстої кишки щурів з 6-OHDA-індукованим паркінсонізмом

Нами було досліджено дію агоніста TRPM8 іонних каналів на транспорт іонів через епітелій товстої кишки, за допомогою камери Усінга у щурів з 6-OHDA-модельованою ХП.

У всіх досліджуваних груп в перші 10 хв експерименту змін у струмі короткого замикання у товстій кишці не спостерігалось. Після додавання карбахоліну спостерігалось збільшення струму короткого замикання, що свідчить про підвищену секрецію та транспорт іонів через епітелій товстої кишки (Рис. 4.12.А).

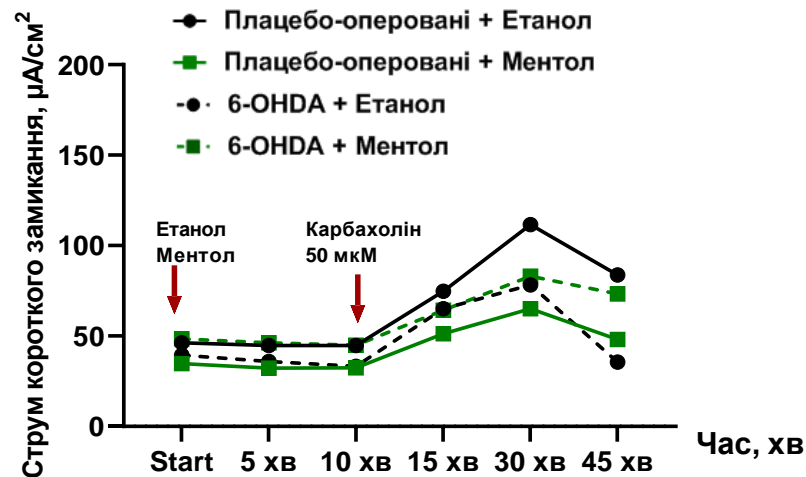


Рис. 4.12. Вплив агоніста TRPM8 іонних каналів 100 мкМ ментолу на карбахолін-стимульований (50 мкМ) електрогенний транспорт іонів через препарати епітелію товстої кишки за 6-ОНДА моделі XII. Зміна струму короткого замикання препаратів епітелію товстої кишки,  $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ .  $n=10$ ,  $N=20$ .

Пік активності струму за дії речовин на фоні карбахоліну спостерігався на 30 хв експерименту. У порівнянні з початковими даними у плацебо-оперованих щурів спостерігалось збільшення струму короткого замикання за дії етанолу у 2,5 раза (з  $46,21 \pm 7,03$  до  $111,54 \pm 54,76$   $\mu\text{A}/\text{cm}$ ) ( $P < 0,05$ ), ментолу у 2 раза (з  $39,46 \pm 6,11$  до  $78,26 \pm 32,21$   $\mu\text{A}/\text{cm}$ ) ( $P < 0,05$ ). Тоді як у щурів з XII значення були меншими в порівнянні з початковими значення у 2 раза за дії етанолу ( $65,09 \pm 40,48$   $\mu\text{A}/\text{cm}$ ) ( $P < 0,05$ ), у 1,7 раза за дії ментолу ( $83,12 \pm 25,21$   $\mu\text{A}/\text{cm}$ ) ( $P < 0,05$ ) (Рис. 4.12.А,Б.).

На відміну від TRPV4 іонних каналів, введення агоністу TRPM8 іонних каналів ментолу (100 мкМ) не викликало змін у показниках базального струму короткого замикання в обох досліджуваних групах, плацебо-оперованих та 6-ОНДА-XII. Хоча, у щурів групи плацебо, попереднє введення ментолу, призводило до пригнічення стимулювального ефекту карбахоліну. У щурів з 6-ОНДА-XII такого ефекту ми не спостерігали. Відсутність ефекту ментолу у щурів з ОНДА-XII може бути пояснена з одного боку суттєвим зниженням рівня TRPM8 протеїну в слизовій оболонці товстої кишки щурів, а з іншого порушенням TRPM8-опосередкованої регуляції в патогенезі 6-ОНДА-XII.

## Висновки до розділу

1. У щурів з 6-OHDA-ХП спостерігається 2-кратне зменшення експресії ТН, зникнення TRPM8 іонних каналів і 2-кратне збільшення експресії TRPV4 іонних каналів у товстій кишці.
2. ТН-позитивні клітини, TRPV4 та TRPM8 іонні канали локалізуються апікально на епітеліоцитах товстої кишки щурів.
3. На 1-й місяць експерименту на фоні дії карбахоліну агоніст TRPV4 каналів GSK1016790A призводив до зниження відсотку максимального піку скорочення та зменшення площі скорочення ізольованої ділянки товстої кишки. Фармакологічна активація TRPV4 каналів агоністом також знижувала скоротливу активність ГМ товстої кишки щурів у 6-OHDA моделі ХП.
4. Активація TRPM8 каналів ментолом призводила до збільшення площі скорочення ізольованої ділянки товстої кишки у щурів з 6-OHDA-ХП. За реєстрації ізометричного скорочення смужок ГМ товстої кишки методом тензометрії спостерігали незначну тенденцію до зниження скорочень у щурів з 6-OHDA моделлю.
5. У щурів з 6-OHDA моделлю-ХП спостерігається збільшена секреція та транспорт іонів через епітелій товстої кишки. Агоніст TRPV4 іонних каналів GSK1016790A призводить до зниження струму короткого замикання та збільшення трансепітеліальної проникності епітелію товстої кишки щурів з ХП. Фармакологічна активація TRPV4 каналів призводить до збільшення електрогенного транспорту іонів. У щурів з 6-OHDA-індукованим паркінсонізмом активація каналів GSK1016790A спричиняла зниження рівня карбахолін-стимульованого транспорту іонів через епітелій товстої кишки щурів, що може говорити про порушення секреції іонів  $Cl^-$  в епітелії товстої кишки.
6. Активація TRPM8 іонних каналів задіяна в карбахолін-стимулюючому електрогенному транспорті іонів через епітелій товстої кишки щурів з 6-OHDA-експериментальним паркінсонізмом.

## РОЗДІЛ 5. ВПЛИВ ПЕРВИННОГО ВОДНОГО РОЗЧИНУ C<sub>60</sub> ФУЛЕРЕНУ НА ЩУРІВ З 6-ОНДА-ІНДУКОВАНИМ ПАРКІНСОНІЗМОМ

Наступним етапом нашого дослідження ми провели експерименти з використанням системного введення C<sub>60</sub>FAS, який за численними даними ефективно запобігає перекисному окисленню та руйнуванню мембран, викликаному вільними радикалами [105] і, крім того, має ефект на скоротливу активність ГМ [118]. Оскільки одним з механізмів розвитку ХП є прямий оксидативний ефект, а антиоксидантна терапія, включаючи розробку нових нанорозмірних поглиначів вільних радикалів, залишається привабливою стратегією [64], тому доцільно було перевірити наскільки C<sub>60</sub>FAS є перспективним і безпечним для застосування в якості додаткового терапевтичного засобу в комплексній терапії при ХП.

Токсичність наночастинок для клітин значною мірою залежить від багатьох фізико-хімічних факторів, включаючи розмір, форму, хімічний склад, розчинність, площу поверхні, поверхневий заряд та умови експерименту [182,183]. У нашому дослідженні використовувався первинний (немодифікований) C<sub>60</sub>FAS, який був розчинений у воді.

В огляді Jelena Kolosnjaj та ін. [184] повідомляється, що C<sub>60</sub>FAS не має гострої або підгострої токсичності для великої різноманітності живих організмів, від бактерій і грибів до лейкоцитів людини, а також у мишей, щурів і морських свинок на відміну від хімічно-модифікованих фулеренів. Moussa та ін. [185] вперше показали, що висококонцентрована водна суспензія мікронізованого C<sub>60</sub> (100 мг/мл) не має ані летальної, ані гострої чи підгострої токсичності за *i.p.* ін'єкції гризунам.

Раніше було показано [121], що діапазон доз C<sub>60</sub>FAS 75–150 мг/кг не має токсичної дії (значення LD<sub>50</sub> становило 721 мг/кг). Токсична дія C<sub>60</sub> фулерену спостерігалася при концентрації від 300 мг/кг. Зміни спостерігались у порушенні поведінки мишей, гематотоксичності та патоморфологічних змінах у тканинах

селезінки, печінки та нирок. У цьому дослідженні C<sub>60</sub>FAS вводили щурам із ХП *i.p.* щодня впродовж 10 днів (0,65 мг/кг на день). Отже, згідно з попередніми дослідженнями, ця доза не є токсичною для організму.

#### 5.1. Ступінь руйнування дофамінергічних нейронів середнього мозку щурів з 6-ОНДА-індукованим паркінсонізмом за дії C<sub>60</sub> фулерену

Плацебо-оперовані щури не демонстрували апоморфін-індуковану ротаційну поведінку, що пояснюється відсутністю дегенерації DA нейронів у групах цих щурів. На 8-й день експерименту щури з 6-ОНДА-ХП, які отримували SPS, оберталися 61,18±22,92 обертів/30 хв, тоді як щури, які отримували C<sub>60</sub>FAS оберталися менш інтенсивно – 47,71±31,70 обертів/30 хв, але достовірної різниці не спостерігалось. На 2-му тижні кількість обертів зростала до 83,27±61,23 обертів/30 хв у щурів з 6-ОНДА+SPS, і до 76,57±46,98 у щурів, які отримували 6-ОНДА+C<sub>60</sub>FAS (P<0,05) (Рис. 5.1.А).

Апоморфін-індукований поведінковий тест показав, що у 5 з 11 щурів з 6-ОНДА, які отримували SPS, і у 4 з 15 щурів, які отримували C<sub>60</sub>FAS, кількість обертів між 1-м і 2-м тестом на апоморфін була зменшена. У щурів, які отримували C<sub>60</sub>FAS, відсоток зниження становив 62,29±14,83 % проти 23,07±18,47 % у щурів, які отримували 6-ОНДА+SPS.

Імуногістохімічний аналіз показав, що у плацебо-оперованих щурів спостерігається 50-75% нейронів середнього мозку, які були ТН-позитивними (Q=6,0±0,1), тоді як щурі з 6-ОНДА-індукованою ХП мали близько 10-25% ТН-позитивного забарвлення (Q=2,0±1,4) (P<0,001). Лікування C<sub>60</sub>FAS збільшило інтенсивність забарвлення ТН-позитивних клітин (Q=3,7±0,5) порівняно з 6-ОНДА щурами (P<0,05), однак цей параметр не повернувся до контрольних значень (Рис. 5.1.Б).

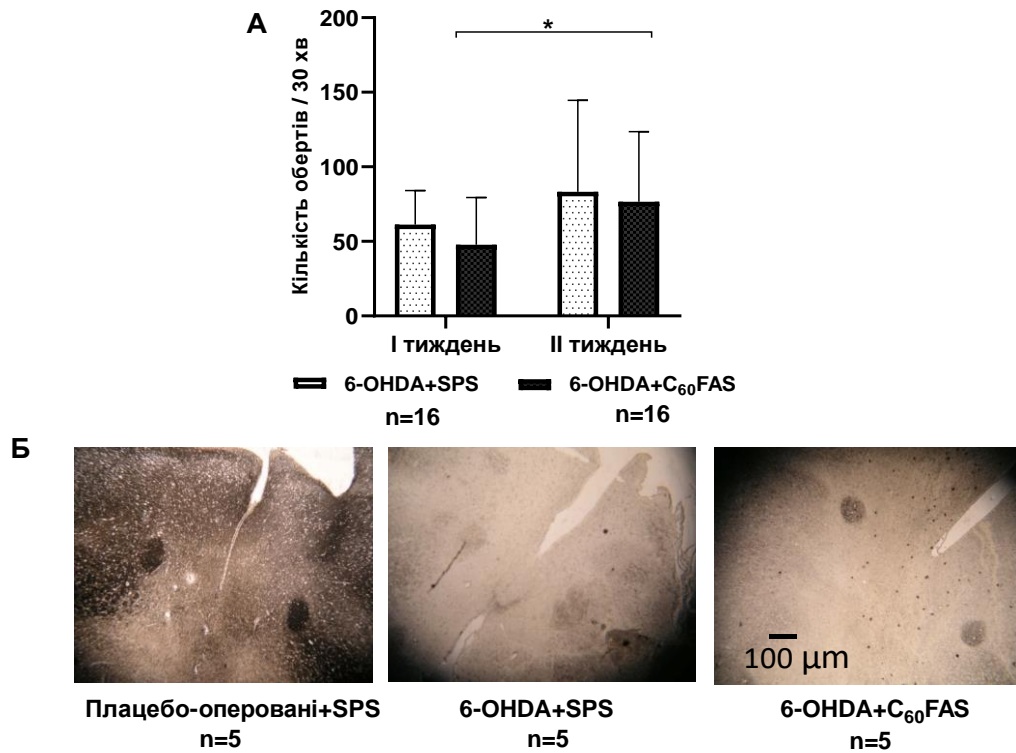


Рис. 5.1. Вплив C<sub>60</sub>FAS на кількість DA нейронів у середньому мозку щурів з 6-OHDA-ХП: А – кількість апоморфін-індукованих обертів у щурів на 1-й та 2-й тиждень після моделювання 6-OHDA-ХП, n=25; Б – мікрофотографії парафінових зрізів середнього мозку щурів (5 мкм) з ТН-позитивним імуофарбуванням DA клітин (коричневий колір), n=15 (x50). Достовірність відмінностей між вибірками оцінювали за допомогою однофакторного дисперсійного аналізу (ANOVA) з використанням критерію Turkey (M±SD). \*P<0,05

## 5.2. Зміни поведінкових та локомоторних реакцій щурів з 6-OHDA-індукованим паркінсонізмом за дії C<sub>60</sub> фулерену

Щури з 6-OHDA-індукованою ХП характеризувалися порушенням рівня тривожності порівняно із плацебо-оперованими щурами. Ми виявили, що у щурів з 6-OHDA-ХП у 2 рази збільшився латентний період покидання центру поля (Рис. 5.2.А) і в 2,5 рази кількість відвідувань центру поля з периферії

порівняно з плацебо-оперованими щурами (Рис. 5.2.Б). Лікування  $C_{60}FAS$  у 4 рази зменшувало латентний період виходу з центру поля ( $P<0,05$ ) і кількість відвідувань центру поля з периферії ( $P<0,01$ ) порівняно з 6-OHDA-XII+SPS (Рис. 5.2.А,Б).

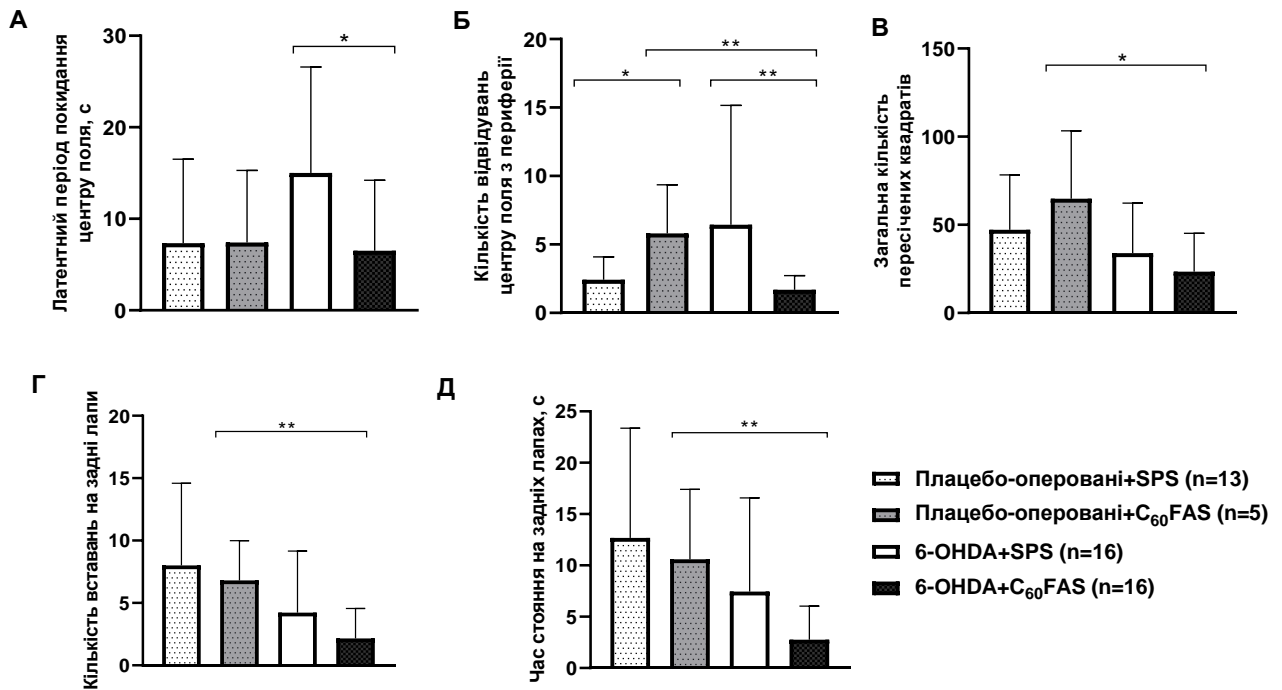


Рис. 5.2. Вплив  $C_{60}FAS$  на поведінкові та локомоторні реакції у щурів із 6-OHDA-XII: А - рівень тривожності за латентним періодом виходу з центру поля у тесті Open Field, с; Б - кількість відвідувань центру поля з периферії у тесті Open Field, с; В - загальна кількість пересічених квадратних (горизонтальна активність) у тесті Open Field, с; Г – кількість вставань на задні лапи у тесті Open Field; Д – час стояння на задніх лапах у тесті Open Field, с, n=50. Достовірність відмінностей між вибірками оцінювали за допомогою однофакторного дисперсійного аналізу (ANOVA) з використанням критерію Turkey ( $M\pm SD$ ). \* $P<0,05$ , \*\* $P<0,01$

Крім того, загальна кількість пересічених квадратів, кількість вставань на задні лапи і загальна тривалість стояння на задніх лапах незначно зменшилися у 6-OHDA-XII порівняно з групами щурів з плацебо ураженнями (Рис. 5.2.В,Д). Це являє собою незначне порушення дослідницької (вертикальної) та горизонтальної активності, які були знижені лікуванням  $C_{60}FAS$ .

### 5.3. Зміни маси тіла, вмісту води у фекаліях, питної та харчової поведінки щурів з 6-OHDA-індукованим паркінсонізмом за дії C<sub>60</sub> фулерену

У даному дослідженні плацебо-оперовані щури + SPS набирали 35% маси тіла між 1-м і останнім (21-м) днями експерименту (від 183,9±21,3 г до 248±40,6 г). Ін'єкція C<sub>60</sub>FAS щурам із плацебо-операціями не вплинула на збільшення маси тіла. Щури між 1-м і 21-м днями експерименту збільшили масу тіла на 38% (з 206,4±13,2 г до 283±20,2 г). Щури 6-OHDA-ХП збільшили масу тіла лише на 25% (з 187,3±22,1 г до 233,4±34,8 г), що на 11% менше порівняно із плацебо-оперованими щурами. Лікування C<sub>60</sub>FAS не покращило набір маси тіла у щурів 6-OHDA-ХП, вони набрали 24% маси тіла (від 190,1±20,8 г до 234,58±28,5 г) (Рис. 5.3.А).

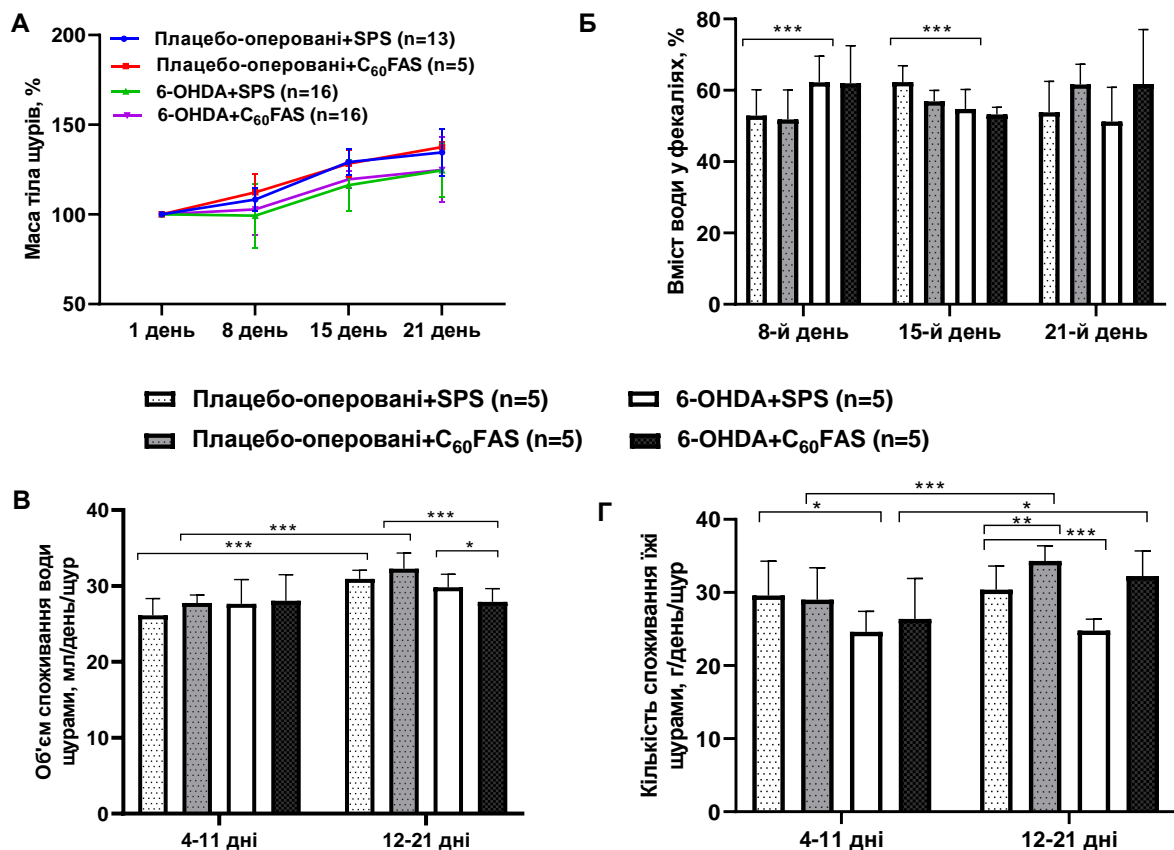


Рис. 5.3. Вплив C<sub>60</sub>FAS на масу тіла, вміст води у фекаліях щурів та кількість споживання води та їжі у щурів із 6-OHDA-ХП: А – зміни маси тіла у плацебо-оперованих щурів та щурів з 6-OHDA-ХП після введення C<sub>60</sub>FAS, %, n=50; Б – вміст води у фекаліях у плацебо-оперованих щурів та щурів з 6-OHDA-ХП на 8-

й, 15-й та 21-й день після введення  $C_{60}FAS$ , %,  $n=50$ ; В – об'єм споживання води щурами, мл/день/щур,  $n=20$ ; Г – об'єм споживання їжі щурами, г/день/щур,  $n=20$ . Достовірність відмінностей між вибірками оцінювали за допомогою однофакторного дисперсійного аналізу (ANOVA) з використанням критерію Turkey ( $M \pm SD$ ). \* -  $P < 0,05$ , \*\* -  $P < 0,01$ , \*\*\* -  $P < 0,001$

Вміст води у фекаліях щурів із 6-OHDA+SPS та 6-OHDA+ $C_{60}FAS$  був дещо підвищений на 8-й день експерименту порівняно з плацебо-оперованими тваринами ( $P < 0,05$ ), що може бути результатом загальної токсичної дії 6-OHDA (Рис. 5.3.Б). Через 2 тижні після моделювання 6-OHDA-ХП вміст води у фекаліях у щурів, які отримували 6-OHDA-ХП, значно знизився порівняно з плацебо-оперованими щурами ( $P < 0,05$ ), що може свідчити про затримку моторики товстої кишки. До 21-го дня експерименту ми спостерігали тенденцію до збільшення вмісту води у фекаліях щурів, які отримували 6-OHDA+ $C_{60}FAS$ , порівняно зі щурами, які отримували SPS, що співвідноситься із даними про покращення моторики товстої кишки та загального часу проходження через ШКТ.

Вимірювання об'єму спожитої води та їжі визначали на 4-11 дні (час введення  $C_{60}FAS$ ) та 12-21 дні (період відміни  $C_{60}FAS$ ) експерименту. У нашому дослідженні ми спостерігали поступове збільшення об'єму споживання води на 4-11 дні та 12-21 дні експерименту у SPS, а також у групах плацебо-оперованих щурів, яким вводили  $C_{60}FAS$  (Рис. 5.3.В). Протилежна картина була у щурів 6-OHDA-ХП. Лікування  $C_{60}FAS$  не покращило споживання води щурами 6-OHDA-ХП. Крім того, щури з 6-OHDA-ХП, які отримували  $C_{60}FAS$ , випивали менше (12%) об'єму води порівняно з щурами, які отримували 6-OHDA+SPS ( $P < 0,05$ ).

Обсяг споживання їжі у щурів з 6-OHDA зменшився в 1,2 рази порівняно з групами щурів із плацебо ураженнями + SPS ( $P = 0,05$ ) протягом 4-11 днів експерименту (Рис. 5.3.Г). У контрольній групі щурів та з 6-OHDA-ХП, які отримували  $C_{60}FAS$ , різниці протягом 4-11 днів експерименту не спостерігалось. Протягом 12-21 дня експерименту ми спостерігали збільшення споживання їжі у щурів, які отримували  $C_{60}FAS$ . Група плацебо-оперованих щурів +  $C_{60}FAS$

підвищила значення на 12% порівняно з групою плацебо-оперованих + SPS тварин ( $P < 0,01$ ). Значення споживання їжі щурами 6-OHDA+C<sub>60</sub>FAS зросли на 27% порівняно з щурами, які отримували 6-OHDA-ХП+SPS ( $P < 0,05$ ). У щурів 6-OHDA+SPS значення знизилися на 18% порівняно з групами щурів із плацебо-оперованими + SPS ( $P < 0,001$ ).

Зменшення споживання їжі плацебо-оперованими щурами + C<sub>60</sub>FAS впродовж 12-21 дня експерименту співвідносилось з підвищенням рівня тривожності за латентним періодом відходу від центру поля та кількістю відвідувань центру поля з периферії.

#### 5.4. Зміни часу кишкового транзиту та моторної активності товстої кишки щурів з 6-OHDA-індукованим паркінсонізмом за дії C<sub>60</sub> фулерену

Ми спостерігали затримку часу проходження по ШКТ на 20% через увесь травний канал у щурів 6-OHDA-ХП ( $P < 0,01$ ) (Рис. 5.4.А). Лікування C<sub>60</sub>FAS покращило час проходження ШКТ у 6-OHDA-ХП майже до рівня щурів, які отримували SPS.

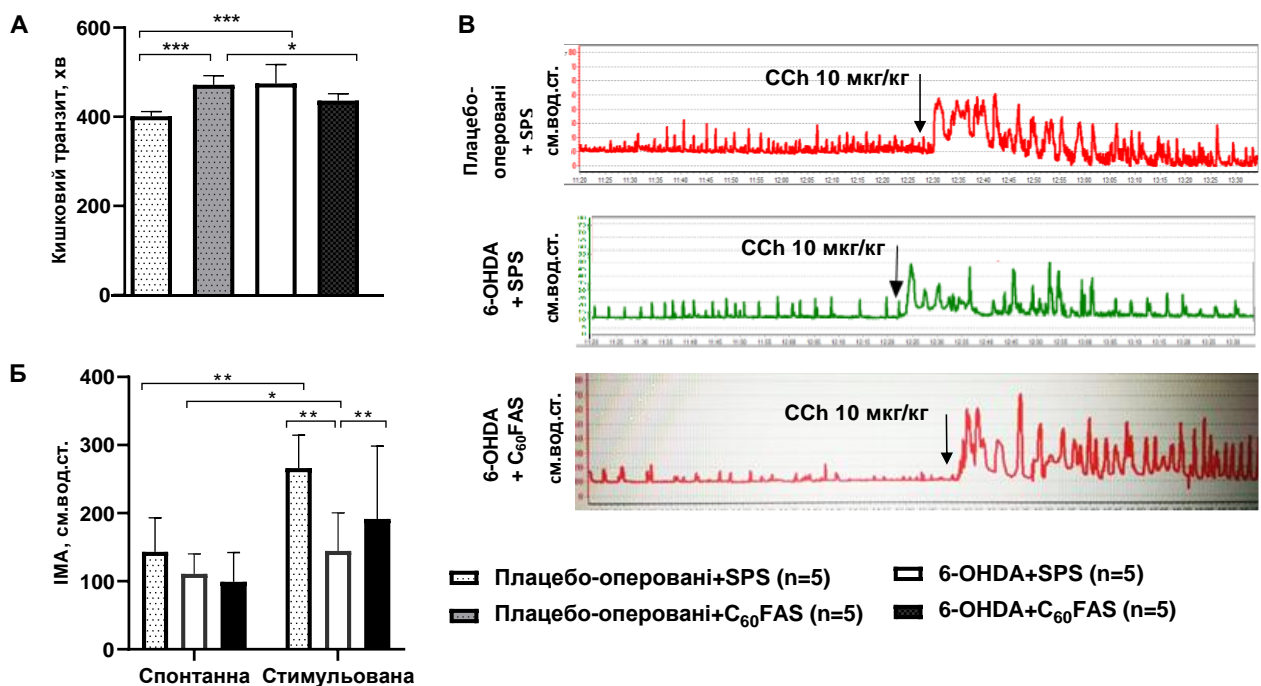


Рис. 5.4. Вплив  $C_{60}FAS$  на моторну активність і час проходження ШКТ товстої кишки у щурів із 6-OHDA-ХП: А – загальний час проходження 0,5 мл 3% кармінового червоного через ШКТ, Б – індекс моторної активності (ІМА) спонтанної та стимульованої моторики товстої кишки щурів, см.вод.ст.; В – типовий запис спонтанної та стимульованої рухової активності товстої кишки щурів, зареєстрований баланографічним методом. ↓ – ін'єкція карбахоліну (CCh, 10 мкг/кг, *i.p.*).  $n=20$ . Достовірність відмінностей між вибірками оцінювали за допомогою однофакторного дисперсійного аналізу (ANOVA) з використанням критерію Turkey ( $M \pm SD$ ). \* -  $P < 0,05$ , \*\* -  $P < 0,01$ , \*\*\* -  $P < 0,001$

Цікаво, що плацебо-оперовані щурі, які отримували  $C_{60}FAS$ , мали затримку часу проходження через ШКТ на тому ж рівні, що й щурі, які отримували 6-OHDA-ХП.

За даними Носке та ін. [186] спонтанні деполяризаційні та реполяризаційні скорочення м'язів є фазою I моторики ШКТ і тривають до 60 хв. У нашому дослідженні ІМА товстої кишки за спонтанної моторики товстої кишки був знижений на 30% ( $100,51 \pm 34,63$  см.вод.ст.) у щурів із 6-OHDA-індукованою ХП порівняно з плацебо-оперованими щурами ( $142,3 \pm 49,8$  см.вод.ст.), однак ці зміни не досягли статистичної значущості. Лікування  $C_{60}FAS$  збільшило ІМА у щурів із 6-OHDA-ХП порівняно з щурами, які отримували 6-OHDA+SPS, на 23% ( $100,51 \pm 34,63$  та  $123,05 \pm 32,29$  см.вод.ст. відповідно) (Рис. 5.4.Б).

Стимульовану моторику модулювали *i.p.* ін'єкцією агоніста ацетилхолінових рецепторів - карбахоліну (10 мкг/кг). Карбахолін збільшив ІМА товстої кишки вдвічі (від  $142,3 \pm 49,8$  до  $266,05 \pm 48,57$  см.вод.ст.) у плацебо-оперованих щурів. У 6-OHDA-ХП, ІМА товстої кишки, стимульованої карбахоліном, була вдвічі ( $P < 0,05$ ) меншою ( $131,05 \pm 60,97$  см.вод.ст.) порівняно зі щурами з плацебо-операціями ( $266,05 \pm 48,57$  см.вод.ст.). Стимульована карбахоліном моторика відповідає III фазі моторної активності кишкового тракту. Фаза III є найсильнішою, і повільні хвилі супроводжуються сплеском [186], який ми можемо бачити на Рис. 5.4.В. Лікування  $C_{60}FAS$  підвищувало рівень

стимульованої моторної активності товстої кишки у щурів 6-OHDA-XII порівняно із щурами з 6-OHDA-XII + SPS ( $P < 0,01$ ).

Однією з причин зниження карбахолін-стимульованої моторики товстої кишки у щурів із 6-OHDA+C<sub>60</sub>FAS у порівнянні з плацебо-оперованими тваринами може бути запалення кишечника у щурів із XII та накопичення C<sub>60</sub> фулерену в черевній порожнині, оскільки C<sub>60</sub>FAS вводили *i.p.* Hendrickson та ін. [187] показали, що після перорального введення C<sub>60</sub> фулерен виявляється переважно в шлунку, тонкій кишці, печінці, нирках і селезінці тварин і виводиться з фекаліями. У нашому дослідженні ми спостерігали локальне накопичення великої кількості C<sub>60</sub>FAS у підшлунковій залозі. Такі ж результати спостерігали Кузнецова та ін. [188].

#### 5.5. Зміни фагоцитарної активності перитонеальних макрофагів щурів з 6-OHDA-індукованим паркінсонізмом за дії C<sub>60</sub> фулерену

Широкому спектру клітин організму властива цитотоксична дія, яка реалізується за рахунок продукції АФК. Серед таких клітин особливе значення мають макрофаги, які локалізовані переважно в тканинах. У відповідь на фагоцитоз патогенів або на контакт з розчинними патоген-асоційованими молекулами, а також прозапальними цитокінінами, у макрофагів розвивається система реакцій, яка має загальну назву «кисневий вибух», і в результаті якої утворюється моновалентне похідне молекулярного кисню – супероксид-аніон. Наслідком таких реакцій є утворення токсичних метаболітів, таких як перекис водню, гіпохлориста кислота, гідроксил-радикал і синглетний кисень [189,190].

Для контролю запалення та прогресування захворювання необхідна активація макрофагів. Таким чином, у нашому дослідженні відсоток спонтанної NADPH-оксидазної активності перитонеальних макрофагів продемонстрував зниження активності в 1,5 рази у плацебо-оперованих щурів + C<sub>60</sub>FAS і

збільшення в 1,3 раза у 6-OHDA+SPS порівняно зі щурами з плацебо-оперованими + SPS (Рис. 5.5.).

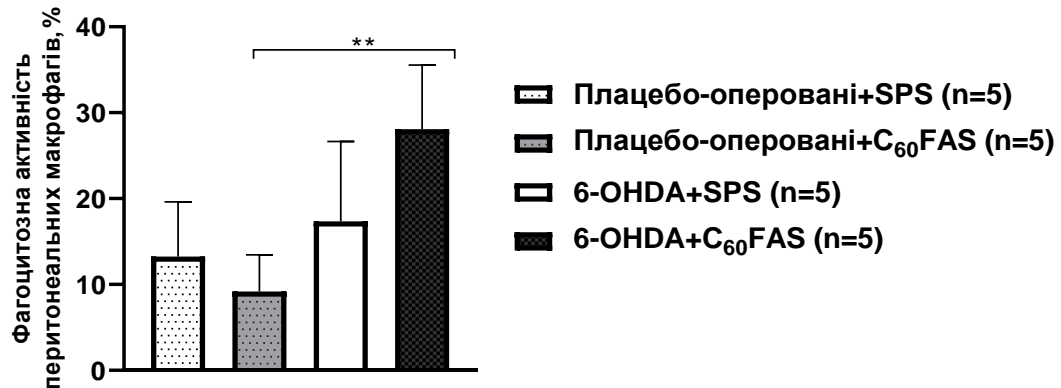


Рис. 5.5. Вплив C<sub>60</sub>FAS на перитонеальні макрофаги у щурів з 6-OHDA-ХП. Фагоцитозна активність перитонеальних макрофагів (%) у щурів з плацебо ураженням та OHDA-ХП на 21-й день після лікування C<sub>60</sub>FAS, n=20. Достовірність відмінностей між вибірками оцінювали за допомогою однофакторного дисперсійного аналізу (ANOVA) з використанням критерію Turkey (M±SD). \*\*P<0,01.

Показано, що лікування C<sub>60</sub>FAS щурів з 6-OHDA-індукованою ХП підвищує активність НАДФН-оксидази перитонеальних макрофагів у 3,6 раза порівняно зі щурами з плацебо-операціями + C<sub>60</sub>FAS (P<0,05) і майже в 2 рази порівняно з 6-OHDA-індукованою ХП.

5.6. Дослідження оксидантно-антиоксидантної системи в мозку щурів з 6-OHDA-індукованим паркінсонізмом за дії C<sub>60</sub> фулерену

Ми вивчали вплив C<sub>60</sub>FAS на оксидантно-антиоксидантну систему в мозку щурів з 6-OHDA-ХП (Рис. 5.6.А-Е). Лікування C<sub>60</sub>FAS достовірно збільшило в 1,5 рази (P<0,01) активність каталази та в 3,6 рази (P<0,01) рівень GSH, не впливаючи на інші маркери OS. Розвиток 6-OHDA-ХП був пов'язаний з легкими змінами маркерів OS лише зі значним 1,4-кратним (P<0,05) підвищенням

активності GP. Лікування  $C_{60}FAS$  у щурів з 6-OHDA-ХП значно підвищило рівень GSH ( $P<0,05$ ) і знизило активність GP ( $P<0,01$ ) порівняно з 6-OHDA+SPS щурами.

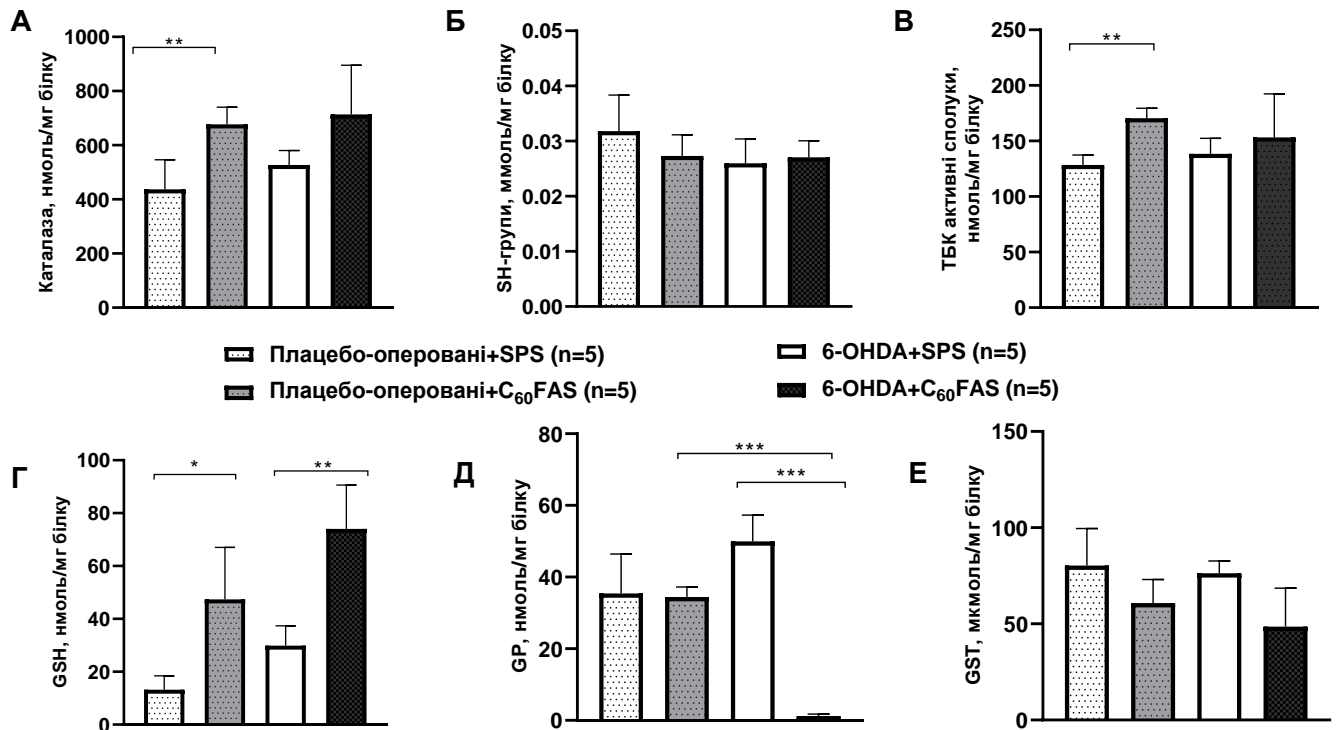


Рис. 5.6. Вплив  $C_{60}FAS$  на оксидантну систему у мозку плацебо-оперованих щурів та щурів з 6-OHDA-ХП: А-Е - зміни антиоксидантної системи в головному мозку щурів з плацебо-операціями і з 6-OHDA-ХП після введення  $C_{60}FAS$  ( $n=20$ ): А - активність каталази, нмоль/мг, Б - вміст тіолових (SH) груп білка, нмоль/мг, В - рівень реактивних речовин тіобарбітурової кислоти (ТБК-активні сполуки), нмоль/мг, Г - рівень відновленого глутатіону (GSH), нмоль/мг, Д - рівень активності глутатіонпероксидази (GP), нмоль/мг, Е - загальна активність глутатіон-S-трансферази (GST), мкмоль/мг. Достовірність відмінностей між вибірками оцінювали за допомогою однофакторного дисперсійного аналізу (ANOVA) з використанням критерію Turkey ( $M\pm SD$ ). \* -  $P<0,05$ , \*\* -  $P<0,01$ , \*\*\* -  $P<0,001$

Крім того, ми спостерігали 1,3-кратне збільшення активності каталази після лікування  $C_{60}FAS$ , але різниця не досягла статистичної значущості порівняно зі 6-OHDA+SPS щурами.

У нашому дослідженні рівень GSH збільшився у щурів, які отримували C<sub>60</sub>FAS. Так, C<sub>60</sub>FAS підвищував лише рівень каталази та GSH, рівні інших ферментів знижувався або не змінювалися.

Розвиток 6-OHDA-індукованої ХП у щурів не впливав суттєво на маркери оксидантно-антиоксидантної системи в мозку порівняно з плацебо-ураженими щурами. У той час, як лікування C<sub>60</sub>FAS спричинило легкий зсув у антиоксидантно-прооксидантній системі в мозку щурів, які отримували 6-OHDA-ХП, порівняно з SPS, із більш глибоким негативним впливом на систему глутатіону, що може бути ознакою його токсичного ефекту.

### Висновки до розділу

1. Отримані дані підтвердили потенційну терапевтичну ефективність C<sub>60</sub>FAS у патогенезі ХП, хоча є підстави для обережного використання через його системну легку токсичну дію.
2. C<sub>60</sub>FAS збільшує інтенсивність забарвлення ТН-позитивних клітин у середньому мозку, покращує моторику товстої кишки та стимулює фагоцитарну активність перитонеальних макрофагів порівняно зі щурами, які отримували 6-OHDA+SPS.
3. Лікування C<sub>60</sub>FAS не покращило споживання води та зміни маси тіла у щурів, які отримували 6-OHDA-ХП, і викликало легкий зсув у антиоксидантно-прооксидантній системі в мозку щурів, які отримували 6-OHDA-ХП, порівняно з SPS, із більш глибоким негативним впливом на систему глутатіону, що може бути ознакою його токсичної дії.
4. Отримані результати на моделі 6-OHDA-індукованої ХП у щурів можна пояснити високою антиоксидантною активністю C<sub>60</sub>FAS та нейтралізацією надлишку АФК у клітинах. Можливо, через їхню агресивну антиоксидантну дію C<sub>60</sub>FAS не можуть бути використані як експериментальна основа для лікування ранніх немоторних симптомів 6-OHDA моделі ХП.

## УЗАГАЛЬНЕННЯ

Ми вперше дослідили взаємозв'язок між ступенем нейродегенерації (рівень та локалізація TH в SNpc, апоморфіновий тест, поведінкові та локомоторні реакції) та розвитком порушень з боку ШКТ, які є характерними для хворих на ХП (моторика товстої кишки, зміни мікробіоти) на моделі 6-OHDA-, LPS-індукованої ХП у щурів та ротенон-індукованої у мишей.

Існує досить багато експериментальних тваринних моделей ХП, але жодна з них не відтворює всі можливі симптоми ХП. Загалом було проведено декілька порівняльних досліджень 6-OHDA та LPS моделей ХП, як на клітинних культурах, так і в умовах *in vivo* [191,192]. Крім того, усі порівняння зосереджені на диференціальних ефектах обох моделей [193], змінах в SNpc, змінах в морфології мікроглії [194], але жодна з них не вивчала порушення з боку ШКТ. Тому наша робота зосереджена на патології ШКТ при ХП.

Доцільним було підібрати тваринну модель ХП, яка найбільш повно відтворює премоторні симптоми ШКТ у пацієнтів із цим захворюванням. Для цього було обрано 2 щурині (6-OHDA та LPS моделі) та одну мишину ротеноніву модель ХП. Однією з позитивних рис моделі 6-OHDA-ХП є можливість оцінити втрату DA нейронів та відповідні функціональні зміни в ураженій півкулі, залишаючи іншу півкулю (без пошкоджень) для контролю [149]. 6-OHDA модель ХП викликає прямий OS в організмі, внаслідок чого відбувається нейродегенерація [149]. Тоді як LPS модель індукує OS шляхом значної активації мікроглії та селективній втраті DA нейронів у нігтростріальній системі [150]. Ротенон є інгібітором МК-I [163].

У нашому дослідженні було показано, що щури з LPS-ХП мають менш виражену обертальну поведінку в апоморфіновому тесті в порівнянні з 6-OHDA-моделлю ХП. Це може бути пов'язано з тим фактом, що порівняно з прямим нейротоксичним ефектом 6-OHDA на DA нейрони, нейротоксичні ефекти LPS опосередковані активацією мікроглії. LPS індукує активацію мікроглії, яка спричиняє загибель DA нейронів принаймні частково через вивільнення NO

[195]. Aono та ін. [195] виявили помітне накопичення активованих мікрогліальних клітин у 6-OHDA-індукованій моделі ХП у мозку щурів у *SN pars reticulata* (SNr), але не в SNpc. Подібні ефекти також спостерігалися на моделях 6-OHDA- та LPS-ХП [196] і показали, що зниження рівня DA нейронів у поперечно-смугастому мозку корелює з рівнем мРНК TH у вентральному середньому мозку, рівнем DA нейронів і цілком може відобразити кількість життєздатних нейронів у SNpc. Вони також припустили, що тест на апоморфін може діагностувати модель хвороби лише на останніх стадіях. Але ми припускаємо, що апоморфіновий тест більш сприйнятливий до моделі 6-OHDA і може також використовуватися на ранніх стадіях ХП, оскільки ураження *medial forebrain bundle* дають можливість отримати майже повну втрату DA нейронів SNpc - 95–99% та втрату іннервації неостріатальних DA нейронів [149].

Для подальшого дослідження рівня дегенерації DA нейронів ми провели імуногістохімічні дослідження інтенсивності забарвлення TH у середньому мозку. Імуногістохімічно ми спостерігали знижену інтенсивність TH як в 6-OHDA, так і в LPS моделях. Також ми спостерігали знижену інтенсивність забарвлення TH в LPS контрольній групі у порівнянні з 6-OHDA контрольною групою. Дані результати можуть бути пояснено різними координатами стереотаксу. Зокрема, LPS вводили безпосередньо в SNpc, що призводить до прямого механічного руйнування нейронів. Крім того, Олійник та ін. [197] нещодавно опублікували ретельний порівняльний аналіз профілю макрофагів і рівня нейрозапалення у плацебо-оперованих щурів даних моделей ХП і було показано, що плацебо-операція викликає довготривалий системний прозапальний ефект.

Miyaniishi та ін. [196] у своїх дослідженнях поведінки на 6-OHDA та LPS-індукованих моделях ХП показали, що загальна пройдена дистанція, швидкість руху та частота руху суттєво не змінюються у Open field тесті навіть у щурів із суттєвим зниженням рівня дофаміну в смугастому тілі. У нашому дослідженні, за латентним періодом виходу з центру поля і кількістю відвідувань центру поля з периферії, ми спостерігали підвищення рівня тривожності у щурів LPS-ХП і

протилежний ефект у 6-OHDA-ХП щурів. Щури з LPS-ХП мали тенденцію проводити більшу частину часу в безпосередній близькості від стін на периферії, дане явище називають тигмотаксисом. За 6-OHDA-ХП щури більше часу перебували в центрі поля на початку експерименту (до 20 с), а увесь інший час проводили на периферії. Збільшення проведення часу в центральній зоні може свідчити про зниження рівня тривожності [198]. У щурів з 6-OHDA-ХП, на відміну від щурів з LPS-ХП, зменшилась кількість і тривалість вставань на задні лапи (маркери локомоторної та дослідницької активності), що говорить про зміни поведінкових функцій, емоційну нестабільність і розбалансованість обробки інформації та зниження локомоторної активності. Аналогічно, у щурів з 6-OHDA-ХП спостерігалось значне зниження часу грумінгу порівняно з контрольною 6-OHDA групою. Грумінг – це загальний час умивання щурами, догляд за своїм хутром впродовж тестового періоду. Rojas-Carvajal та ін. [199] припускають, що догляд за хутром можна вважати важливим індексом звикання, тобто, чим довше відбувається догляд, тим швидше відбувається обробка новизни та зменшується настороженість у тварин.

Підтвердження вдалого моделювання ротенонової моделі ХП у мишей проводили за допомогою Pole тесту. У тесті оцінюється здатність миші хапатися за дерев'яну жердину і маневрувати на ній, щоб спуститися до клітки з тирсою, в якій вона постійно проживає. Для оцінки моторної функції тварин з порушеннями функціонування базальних гангліїв та/або нігро-стіатального шляху проводили визначення -  $T_{total}$  та  $T_{turn}$  у Pole тесті. Було показано іншими науковими групами [200], що у поведінковому Pole тесті мишам з МРТР-моделлю ХП, потрібно більше часу, щоб повернутись і спуститися зі стовпа, крім того, ці порушення можуть бути усунені за допомогою L-DOPA. Також згідно літературних джерел миші з ХП витрачають на оберт та спуск по дерев'яній жердині у Pole тесті більше часу, ніж група плацебо [125]. Наші дані підтвердили ці факти.

Супутні захворювання, пов'язані із втратою ваги та недоїданням, можуть вплинути на прогресування ХП, спричиняючи дискінезію, зниження когнітивних

функцій та ортостатичну гіпотензію, і навіть призводячи до інвалідності та смертності [153]. У нашому дослідженні було показано зниження маси тіла у 6-OHDA-моделі та ротеноновій моделі ХП, тоді як у LPS групі змін не спостерігалось.

Цікаво відзначити, що моніторинг клінічних показників стану щурів, свідчить про характерний паттерн закрепів у щурів з 6-OHDA моделлю, а у щурів з LPS моделлю навпаки – паттерн діареї. При цьому, кількість води у фекаліях щурів з LPS-індукованою ХП була аналогічною до щурів з 6-OHDA моделлю. Ми припустили, що за LPS моделі розвиток діареї може мати прозапальну етіологію і бути пов'язаним з прямим впливом LPS (який в організмі є продуктом кишкових грамнегативних бактерій) на *muscularis macrophages* (MMs), які в свою чергу продукують кістковий морфогенетичний білок (BMP2), яка стимулює перистальтику кишечника через активацію кишкових нервових клітин [201].

Також було показано, що обсяг споживання води та їжі 6-OHDA-щурями асоціюється з вираженістю закрепу та зниженням вмісту води у фекаліях на 21-й день експерименту. Закреп є найпоширенішим шлунково-кишковим симптомом при ХП, який зустрічається у 80-90% випадків. Це класична премоторна симптоматика, яка виникає внаслідок порушення шлунково-кишкового транзиту та дисфункції дефекації. Хронічний закреп негативно впливає на повсякденне життя пацієнта, перешкоджає ефективному всмоктуванню протипаркінсонічних препаратів і впливає на розвиток моторних симптомів. Симптоми дисфункції ШКТ можуть проявлятися під час продромальної фази, і було показано, що закреп пов'язаний із підвищеним ризиком розвитку ХП [4].

У нашому дослідженні було показано, що час кишкового транзиту вздовж усього травного каналу у щурів (моторна-евакуаторна функція) у щурів з 6-OHDA-ХП сповільнився на 26%, тоді як у групі LPS-ХП прискорився на 15% порівняно з контрольною групою. Проте, зниження моторної активності товстої кишки спостерігалось лише у щурів 6-OHDA-ХП. У LPS моделі змін моторики

товстої кишки не спостерігалось. Згідно літературних джерел, за ротенонової моделі ХП, порушення роботи ШКТ були досліджені після тривалого системного введення речовини головним чином у щурів. Щури демонстрували або лише зміну кишкового транзиту або порушення моторики ШКТ, яке пов'язане з кишковими  $\alpha$ -синуклеїновими нейрональними включеннями в залежності від того, чи дослідження проводили одразу після відміни чи через 6 місяців після відміни ротенону [124]. Ми проводили дослідження затримки шлункового вмісту методом Charcoal і було показано, що у мишей з ротеноновою моделлю ХП, у порівнянні з тваринами групи плацебо, спостерігалось затримка моторно-евакуаторної функції ШКТ на 19%.

Зміни в моториці ШКТ можуть бути наслідком змін мікробіоти [202]: 1) через вивільнення бактеріальних метаболітів або кінцевих продуктів бактеріальної ферментації, 2) через кишкові нейроендокринні фактори та 3) опосередковано через вплив медіаторів в результаті імунної відповіді в кишечнику. Іншою причиною можуть бути резидентні макрофаги ГМ, які впливають на м'язові клітини ШКТ, модулюючи моторику ШКТ [203]. Цікаво, що в LPS моделі транзит барвника кармінового червоного через травний канал зменшився, а гіпотетично моторика товстої кишки повинна була збільшитися, але цього не сталося. Раніше [204,205] було виявлено, що LPS вибірково активує резидентні макрофаги ГМ, індукуючи гени циклооксигенази-2 (COX-2) та індукованого NOS (iNOS), що призводить до порушення моторики через виробництво NO.

У нашому дослідженні було показано, що більш суттєві зміни мікробіоти спостерігалися у щурів з LPS-індукованим паркінсонізмом у порівнянні з 6-OHDA моделлю ХП. Проте, наше дослідження має низку обмежень, оскільки, використований метод бактеріологічного посіву дозволяє ідентифікувати лише 10% мікроорганізмів, здатних культивуватися в стандартних умовах. Тому для більш точного визначення представників мікробіоти необхідно проводити молекулярно-генетичну ідентифікацію за допомогою секвенування гена 16S рРНК.

Таким чином, 6-OHDA та LPS моделі ХП відображають зміни в ШКТ при ХП, проте патологічні порушення при 6-OHDA моделі більш подібні до клінічної картини ХП, зокрема у щурів з 6-OHDA-ХП спостерігалось пригнічення моторної функції товстої кишки, а також швидкості загального транзиту вздовж травного каналу. Тому, саме 6-OHDA модель може бути використана як експериментальна основа для вивчення ранніх НМС. Крім того, ротенонова модель ХП на мишах також відтворює клінічні зміни ШКТ при ХП і може бути використана, як експериментальна модель в доклінічних дослідженнях.

ХП найбільш поширена у людей віком старше 65 років [166]. Довгострокові наслідки ХП досліджені на моделях з пероральним введенням  $\beta$ -ситостерол d-глюкозиду (BSSG) [167]; після ін'єкції  $\alpha$ -синуклеїну PFF [168]; після застосування резерпіну [169]. Але довгострокові зміни ШКТ у щурів з 6-OHDA-моделлю ХП досі не досліджені.

Ми вперше повідомили про віддалені зміни в моторно-евакуаторній функції кишечника за 6-OHDA-індукованої ХП *in vivo* на 7-й місяць експерименту. Ми виявили, що час проходження ШКТ у 7-місячних щурів з часом подвоюється, як у тварин із 6-OHDA моделлю так і в плацебо-оперованих. Крім того, зміни часу проходження ШКТ у щурів із ХП є більшими, внаслідок чого спостерігаються закрепи у щурів із ХП. Також у щурів із 6-OHDA-ХП спостерігалися зміни поведінкових функцій, емоційної нестабільності, збільшення обробки інформації та збільшення настороженості на 1-й і 7-й місяць експерименту. Віддалені наслідки ХП відображаються у таких показниках, як латентний період покидання центру поля та час грумінгу. Зміни в ШКТ щурів з 6-OHDA-ХП на 7-й місяць експерименту супроводжувалися збільшенням споживання питної води та їжі та збільшенням кількості води у фекаліях порівняно з 1-м місяцем експерименту. У щурів із 6-OHDA-індукованим паркінсонізмом спостерігалися незначні зміни мікробіоти ШКТ, які прогресували з часом до 2-го місяця експерименту.

У віддалені терміни 6-OHDA-індукованої ХП через 7 місяців, спостерігається поява якісних змін глікопротеїнів слизу, що може

супроводжуватися подовженням вуглеводних ланцюгів глікопротеїнів. Зміни вуглеводного складу поверхневого слизу товстої кишки можуть призводити до порушення в'язкості слизу, взаємодії з бактеріями кишкової мікробіоти, електролітами, у результаті чого порушується бар'єрна функція епітеліального шару кишечника. Приблизно 30% O-гліканів включають у свій склад основний залишок манози, яка синтезується з глікопротеїнів, включаючи  $\alpha$ -дистроглікан, який часто поділяється шляхом додавання N-ацетилглюкозаміну, галактози, фукози та сіалової кислоти [206,207]. Збільшення рівня сіалізації муцинів характерне при ЗЗК [208]. Вміст сіалової кислоти, фукози в поверхневому слизі товстої кишки збільшився у плацебо-оперованих щурів і в групі 6-OHDA-ХП через 7 місяців експерименту. Рівень сіалової кислоти в поверхневому шарі слизу товстої кишки щурів з ХП зменшувався на 7-й місяць досліду. Зниження сіалілювання та збільшення фукозилування в триантенарних гліканах було виявлено в сироваткових N-гліканах у хворих на ХП [209], а в N-гліканах IgG спостерігалось зменшення олігоманозних структур і збільшення фукозильованих моногалактозильованих структур [210].

Зміни з боку ШКТ в патогенезі ХП можуть бути обумовлені молекулярними змінами в кишечнику. Тому, наступним етапом нашого експерименту було дослідження молекулярних механізмів порушення функції ШКТ у різні терміни 6-OHDA-індукованого паркінсонізму у щурів.

Одним з етапів роботи було дослідити роль TRPV4 та TRPM8 іонних каналів у ШКТ щурів з 6-OHDA-ХП. Першим завданням було охарактеризувати експресію та локалізацію TRPV4 та TRPM8 іонних каналів у кишечнику за умов 6-OHDA-експериментального паркінсонізму.

Для початку було досліджено рівень TH у товстій кишці щурів з ХП, який показав зниження рівня експресії TH у щурів з 6-OHDA-ХП. Jeanette M Shultz та ін. [211] показали, що мавпи, які отримували 6-OHDA, мали знижений TH-ir і AADC-ir у проксимальному відділі м'єнтерального сплетіння товстої кишки через 3 місяці після застосування нейротоксину. Зменшення рівня TH у кишечнику вибірково обумовлено зникненням DA нейронів, як у

мієнтеральному, так і переважно в підслизовому сплетінні кишечника, тоді як у стравоході та шлунку змін не виявляється. ТН є ключовим ферментом, який бере участь у синтезі дофаміну. Втрата DA нейронів була описана в мієнтеральному сплетінні пацієнтів із ХП [212].

Також нами було показано вдвічі збільшення рівня експресії TRPV4 іонних каналів у слизовій оболонці товстої кишки у щурів з 6-OHDA-ХП. За літературними даними TRPV4 іонні канали були виявлені в тонких нервових волокнах, пов'язаних із кровоносними судинами підслизової та серозної оболонок шлунка, тонкої та товстої кишок [213], у мезентеріальних та тазових аферентних нейронах, на базолатеральній поверхні епітеліальних клітин ШКТ [101], а також на поверхні MMs ШКТ [72]. При активації вони здатні підвищувати внутрішньоклітинний рівень  $Ca^{2+}$ , що може позитивно впливати на моторику ШКТ. Крім того, порушення гомеостазу  $Ca^{2+}$  у нейронах призводить до втрати цих клітин або їх функцій і розвитку нейродегенеративних захворювань, таких як ХП [95]. Підвищення експресії TRPV4 іонних каналів в ендотеліальних клітинах судин сприяє розвитку запальних процесів у товстій кишці внаслідок підвищення проникності судин.

Також наше дослідження показало майже повне зникнення рівня експресії TRPM8 іонних каналів у слизовій оболонці товстої кишки у щурів з 6-OHDA-ХП.

Повідомлялося про експресію TRPM8 іонних каналів в аферентних нейронах, мієнтеральному сплетінні та дистальних епітеліальних клітинах товстої кишки миші [41], у ГМ шлунка та товстої кишки щурів [87].

У нашому дослідженні було показано, що ТН-позитивні клітини, TRPV4 та TRPM8 іонні канали локалізовані апікально на епітеліоцитах слизової оболонки товстої кишки щурів.

Також одним із завдань роботи було встановлення ролі TRPV4 та TRPM8 іонних каналів у механізмах секретомоторної функцій товстої кишки за 6-OHDA моделі ХП.

Рухливість ШКТ є результатом скоординованих скорочень м'язової оболонки ШКТ [214]. GSK1016790A є селективним і потужним агоністом TRPV4, який широко використовується для вивчення фізіологічної функції TRPV4 *in vitro* та *in vivo* [215]. Fichna та ін. [216] показали, що агоніст TRPV4 іонних каналів GSK1016790A знижує скорочувальну здатність товстої кишки та посилює інгібіторну нейротрансмісію *in vitro*. *In vivo* активація TRPV4 уповільнювала моторику ШКТ та зменшувала кількість дефекації у мишей.

У нашому дослідженні на 1-й місяць експерименту у щурів з 6-OHDA-XII на фоні дії карбахоліну агоніст TRPV4 каналів мав тенденцію до зниження відсотку максимального піку скорочення по відношенню до піку скорочення карбахоліну, а також спостерігалось зменшення площі скорочення за дії GSK1016790A. Для додаткового підтвердження даного ефекту ми також дослідили скоротливу активність ГМ товстої кишки методом тензометрії, стимулятором якої виступав KCl. У гладеньком'язовій тканині KCl-індуковане скорочення використовується для вивчення зв'язку збудження-скорочення та як стандартна реакція скорочення для оцінки впливу різних речовин на скорочувальну здатність ГМ [217]. KCl-індуковане скорочення викликає сильну деполяризацію мембрани, відкриття L-типу потенціалзалежних  $Ca^{2+}$  каналів, приплив  $Ca^{2+}$  і, зрештою, активацію  $Ca^{2+}$ -залежної кінази легкого ланцюга міозину (MLC), що призводить до фосфорилування MLC [218]. Регуляторний легкий ланцюг (RLC) міозину ініціює скорочення ГМ, який визначається активністю кінази MLC і фосфатаз, які фосфорилують і дефосфорилують RLC відповідно [219]. Xiao-Lin Xiu та ін. [220] показали, що максимальна амплітуда фазового скорочення, індукованого карбахоліном, у ГМ шлунка щурів із 6-OHDA була знижена приблизно на 60% порівняно з контролем.

Активація TRPV4 селективним агоністом GSK1016790A (0,3 мкМ) призводила до вірогідного зниження максимального піку скорочення та зменшення площі скорочення ізольованої ділянки товстої кишки. Цей пригнічувальний ефект GSK1016790A був навіть більш виразним у щурів з 6-OHDA-XII у порівнянні з контрольною групою. Для підтвердження даного

ефекту ролі TRPV4 іонних каналів у регуляції моторної функції товстої шурів з 6-OHDA-ХП, ми застосували метод тензометричного визначення скоротливої активності ізольованих гладеньком'язових препаратів товстої кишки. Додавання GSK1016790A призводило до більш глибокого пригнічення КСІ-стимульованої скоротливої активності гладеньком'язових препаратів товстої кишки шурів з 6-OHDA-ХП у порівнянні з групою плацебо.

Bain і Mowat [221] і De Schepper та ін. [222] продемонстрували взаємодію між ГМ та ММs, і що ця взаємодія може регулювати моторику ШКТ. ММs можуть регулювати моторику ШКТ під час запалення через секрецію прозапальних цитокінів [223,224]. ММs можуть регулювати моторику ШКТ завдяки фактору росту кісткового морфогенетичного білку (BMP2), коли відсутнє запалення у кишечнику. Але роль BMP2 у регулюванні моторики ШКТ під час запалення ще належить визначити [201]. Luo та ін. показали, що ММs - специфічна експресія TRPV4 безпосередньо регулює функцію кишкових ГМ для контролю моторики ШКТ [72]. Крім того, зниження перистальтики кишечника може бути пов'язане з синтезом простагландинів. NO та простагландин E2 (PGE2) є основними медіаторами запалення, що вивільнюються активованими ММs, які регулюють моторику ШКТ [225]. Простагландин F2 $\alpha$  (PGF2 $\alpha$ ) є фактором скорочення ендотелію (EDCF), індукованим активацією TRPV4 [226]. Було також показано, що GSK1016790A або ацетилхолін викликають вивільнення PGF2 $\alpha$  (простагландин F2 $\alpha$ ), який знижується інгібуванням РКС або ERK1/2 [227].

Amato та ін. [17] показали, що рецептори TRPM8 іонних каналів експресуються в дистальному відділі товстої кишки людини і що ліганд-залежна активація TRPM8 здатна зменшувати спонтанну рухливість товстої кишки, ймовірно, шляхом відкриття Ca<sup>2+</sup>-залежних K<sup>+</sup>-каналів з великою провідністю. Також вже доведено взаємозв'язок між М3-мускариновими рецепторами і TRPM8 каналами. Було показано, що стимуляція М3-мускаринових рецепторів за допомогою неспецифічного агоніста Охо-М викликає пригнічення TRPM8 через сигнальний шлях, який включає Gq- і Ca<sup>2+</sup>-незалежну стимуляція cPLA2 і

генерацію арахідонової кислоти, що в свою чергу діє як прямий інгібітор каналів [228].

У нашому дослідженні було показано, що активація TRPM8 каналів ментолом на фоні дії карбахоліну призводила до зниження площі скорочення ізольованої ділянки товстої кишки у плацебо-оперованих щурів (метод баланографії *in vitro*), тоді як у щурів з 6-OHDA моделлю змін не спостерігалось. Цікаво, що за реєстрації ізометричного скорочення смужок ГМ товстої кишки методом тензометрії, коли в якості стимулятора скоротливої активності був використаний KCl, а не агоніст холінорецепторів карбахолін, відбувалося зниження скорочень у щурів з 6-OHDA моделлю за активації TRPM8 каналів ментолом.

Також ми встановили роль TRPV4 та TRPM8 іонних каналів у механізмах секреторної функцій товстої кишки за 6-OHDA моделі ХП.

Внутрішнім захисним шаром кишечника є шар епітеліальних клітин, об'єднаних у єдиний функціональний шар за допомогою міжклітинних сполук. Цей шар є напівпроникною мембраною між двома середовищами, безпосередньо беручи участь у формуванні та підтримці сталості внутрішнього середовища, регуляції транспорту іонів, води та молекул між зовнішнім та внутрішнім середовищем і запобігає транслокації патогенних організмів у кров та органи. Показано, що порушення проникності епітеліального шару може призводити до розвитку запальних процесів і алергій [229].

Дослідження Yamawaki та ін. [101] показали, що TRPV4 іонні канали можуть регулювати трансепітеліальний транспорт речовин у травному тракті. Застосування агоністів TRPV4 каналів спричиняє значне зниження трансепітеліальної резистентності в культурі клітин IEC-6 (Intestinal Epithelial Cells) і, як наслідок, викликає їх гіперпроникність, що спостерігається в патогенезі ХП [230].

У щурів з 6-OHDA-ХП спостерігалось нижчий рівень секреції іонів у відповідь на стимулювальний ефект карбахоліну (50 мкМ) у порівнянні з групою плацебо, а також тенденцію до підвищення трансепітеліальної проникності.

Активация TRPV4 каналів селективним агоністом GSK1016790A (0,3 мкМ) призводила до зниження базального струму короткого замикання, який зумовлений електрогенним транспортом іонів, переважно секрецією іонів Cl<sup>-</sup>. Проте у щурів з 6-OHDA-ХП GSK1016790A (0,3 мкМ) не впливав на базальний електрогенний транспорт іонів, проте пригнічував стимулювальний ефект карбахоліну. Отримані дані свідчать про порушення TRPV4-опосередкованої регуляції транспорту іонів через епітелій товстої кишки щурів за 6-OHDA-ХП. Цікаво, що активация TRPV4 іонних каналів збільшувала рівень трансепітеліальної проникності у щурів з 6-OHDA-ХП.

На відміну від TRPV4 іонних каналів, введення агоністу TRPM8 іонних каналів ментолу (100 мкМ) не викликало змін у показниках базального струму короткого замикання в обох досліджуваних групах, плацебо-оперованих та щурів з 6-OHDA-ХП. Хоча, у щурів групи плацебо, попереднє введення ментолу, призводило до пригнічення стимулювального ефекту карбахоліну. У щурів з 6-OHDA-ХП такого ж ефекту ми не спостерігали. Відсутність ефекту ментолу у щурів з 6-OHDA-ХП може бути пояснена з одного боку суттєвим зниженням рівня TRPM8 протеїну в слизовій оболонці товстої кишки щурів, а з іншого порушенням TRPM8-опосередкованої регуляції в патогенезі 6-OHDA-ХП.

Нами було показано, що у 6-OHDA моделі ХП знижується карбахолін-стимульований транспорт іонів, який опосередковується переважно секрецією іонів Cl<sup>-</sup>. Основним механізмом розвитку діареї є збільшення електрогенної секреції іонів Cl<sup>-</sup> через апікальні трансмембранні канали CFTR епітеліальних клітин. Дані CFTR канали є інгібіторами електрогенного та електронейтрального всмоктування іонів Na<sup>+</sup> через ENaC канали і можуть пригнічувати всмоктування води через епітелій [231]. Таким чином, порушення електрогенного транспорту іонів та карбахолін-стимульованої секреції через епітелій товстої кишки щурів з 6-OHDA моделлю ХП можуть бути причиною розвитку закрепів у даній моделі ХП. За LPS моделі дані зміни ми не досліджували, але можливо дана гіпотеза також підтвердилася.

Також ми вперше повідомили про токсичний ефект лікування C<sub>60</sub>FAS на нейродегенеративні зміни та ранні НМС на шурячій моделі 6-OHDA-індукованої ХП *in vivo*.

Серія досліджень *in vitro* виявила, що різні похідні C<sub>60</sub> фулерену мають нейропротекторний ефект [232,233]. Оскільки однією з можливих причин розвитку ХП залишається OS, а антиоксидантна терапія, включаючи розробку нових нанорозмірних поглиначів вільних радикалів, залишається привабливою стратегією [64], тому ми припустили, що первинні водні C<sub>60</sub> фулерени (C<sub>60</sub>FAS) можуть бути перспективними нанопрепаратами в терапії ХП, включаючи НМС, такі як затримка моторики товстої кишки.

Апоморфіновий тест показав ефективність C<sub>60</sub>FAS лише в період лікування (1-й тиждень після операції). У той час, як через 3 дні після відміни C<sub>60</sub>FAS не було різниці в апоморфін-індукованій ротаційній поведінці між C<sub>60</sub>FAS і щурами з 6-OHDA+SPS. Апоморфіновий тест є непрямим маркером дегенерації DA нейронів, оскільки раніше була виявлена позитивна кореляція між інтенсивністю індукованих апоморфіном обертів в бік, контралатерально обробленій токсином півкулі, і відсотком зруйнованих DA нейронів [122]. Ми припустили, що збільшення кількості обертів у апоморфіновому тесті може бути викликано C<sub>60</sub>FAS-індукованою нейронною пластичністю та збільшенням кількості DA нейронів у головному мозку щурів.

Також було показано, що C<sub>60</sub>FAS збільшує інтенсивність забарвлення TH у середньому мозку, покращує моторику товстої кишки та стимулює фагоцитозну активність перитонеальних макрофагів у щурів з 6-OHDA-ХП у порівнянні із щурами, які не отримували лікування C<sub>60</sub> фулеренами.

Нове середовище, в якому знаходяться щури, призводить до двох протилежних поведінкових тенденцій: страху перед новим середовищем і бажанням його випробувати. Ці дві тенденції характеризуються різним часовим ходом і різними просторовими перевагами. Найбільш значущими показниками для оцінки рівня тривожності щурів є рухова активність і час перебування в центрі та на периферії. Як правило, щури воліють ходити близько до стінок поля

(тигмотаксис), щоб уникнути невідомого, стресового середовища. У тесті Open field ми виявили, що щурі з 6-OHDA-ХП збільшили латентний період покидання центру поля, кількість квадратів, перехрещених у центрі після повторного переходу з периферії (маркери емоційної стабільності), у той час, як зменшилась загальна кількість перетинів квадратів за досліджуваний період, кількість і тривалість вставань на задні лапи (маркери локомоторної та пошукової активності). Це підтвердило наявність у щурів із модельованим паркінсонізмом змін вегетативної функцій ЦНС, емоційної нестабільності, розбалансованості обробки інформації та зниження рухової активності. Лікування C<sub>60</sub>FAS покращувало емоційний стан щурів, але не впливало на рухову та пошукову активність.

Подібні дані були отримані в подвійному сліпому плацебо-контрольованому дослідженні на мавпах *macaca fascicularis* з МРТР-індукованою ХП. У цьому дослідженні лікування протягом 2 місяців водорозчинним карбоксифулереном зменшило пошкодження смугастого тіла та покращило поведінкову рухову функцію [234].

Одночасно зі змінами поведінки щурів із 6-OHDA-ХП ми виявили зниження споживання ними води. Кількість споживання води співвідноситься із тяжкістю закрепів. Зменшення споживання води передуює закрепу в більшості випадків. Як зміни у споживанні води, так і закреп є поширеними НМС ХП. Цікаво, що пацієнти з ХП зазвичай не відчують спраги, тому у них немає бажання пити воду, що також може призвести до закрепів [153].

Останнім часом зміни маси тіла стають важливим клінічним маркером прогресування ХП і загострення захворювання, що представляє собою порушення функції ШКТ і метаболічну дисфункцію [153]. Крім того, Chen та ін. [235] спостерігали, що в пацієнтів з ХП зменшується маса тіла за 10 років до початку захворювання. Галенова та ін. [236] показали, що C<sub>60</sub>FAS нормалізує метаболічні параметри та частково знижує індекс маси тіла у щурів з ожирінням, викликаним дієтою.

Лікування C<sub>60</sub>FAS не покращило споживання води та зміни маси тіла у щурів, які отримували 6-OHDA-ХП, і викликало легкий зсув у антиоксидантно-прооксидантній системі в мозку щурів, які отримували 6-OHDA-ХП, порівняно з SPS, із більш глибоким негативним впливом на систему глутатіону, що може бути ознакою його токсичної дії. Отримані результати на моделі 6-OHDA-індукованої ХП у щурів можна пояснити високою антиоксидантною активністю C<sub>60</sub>FAS та нейтралізацією надлишку АФК у клітинах. Тому, через їхню агресивну антиоксидантну дію, C<sub>60</sub>FAS мають бути використані з обережністю, як експериментальна основа для лікування ранніх НМС у 6-OHDA моделі ХП.

Запалення характеризується значною інфільтрацією макрофагів, лімфоцитів, еозинофілів і плазматичних клітин. Лімфоцити мобілізуються та стимулюються контактом з антигеном продукуючи лімфокіни, які активують макрофаги [237]. У нашому дослідженні C<sub>60</sub>FAS модулював функції фагоцитів, стимулював фагоцитарну активність перитонеальних макрофагів. Сківка та ін. [238] підтверджують, що C<sub>60</sub>FAS може проявляти пряму цитотоксичну дію на фагоцити, більш виражену у випадку злоякісних клітин. І цей цитотоксичний ефект пов'язаний з енергійною індукцією внутрішньоклітинної генерації АФК. При низькій разовій терапевтичній дозі (5 мг/кг) C<sub>60</sub>FAS може викликати протипухлинну імунну відповідь без прямої цитотоксичності. Крім цього, C<sub>60</sub>FAS значно зменшує кількість пухлин і загальну площу ураження на моделі колоректального раку у щурів [121]. Eun-Jung Park та ін. [239] показали, що «макрофаги, активовані класичним шляхом, виявляють зміни в експресії генів, метаболічних шляхах і своїх морфологічних і функціональних характеристиках». Ці зміни відповідають за підвищення фагоцитарної здатності, обробки та презентації антигенів, лізису пухлинних клітин, продукції АФК та лізосомальних ферментів.

Дослідження показали, що втрата нейронів у SN у пацієнтів з ХП внаслідок дії АФК, пов'язана з мітохондріальною дисфункцією МК-I, пов'язаною з цією хворобою [240]. Мозок споживає велику кількість кисню і особливо чутливий до пошкоджень, опосередкованих АФК. Каталаза є антиоксидантним ферментом,

який відіграє активну роль у клітинах, руйнуючи АФК. Еом та ін. показали, що PEP-1-каталаза трансдукується в клітини SH-SY5Y, захищаючи їх від смерті, спричиненої MPP<sup>+</sup>, шляхом зниження АФК і регулювання клітинних сигналів виживання, включаючи Akt, Вах, Bcl-2 і p38. Імуногістохімічний аналіз показав, що трансдукована PEP-1-каталаза помітно захищала від загибелі нейрональних клітин у SN у тваринній моделі ХП [241]. При ХП активність пероксидази та каталази була знижена в SN, *nucleus caudatus* та *putamen* [242].

Порушення оксидантно-антиоксидантного балансу може активувати різні окисно-відновні сигнальні шляхи шляхом окислення цистеїнових SH-груп білкових молекул. Виявлено незначне зниження рівня відновлених білкових SH-груп у всіх щурів досліду. ТБК-активні сполуки підвищувалися лише у плацебо-оперованих щурів, які отримували лікування C<sub>60</sub>FAS, але не вплинуло на групу щурів з 6-OHDA-ХП + C<sub>60</sub>FAS.

Тканина мозку характеризується низькою або помірною активністю супероксиддисмутази, каталази та GP порівняно з нирками або печінкою. Переконливі докази зміненого метаболізму глутатіону, як важливого фактора, що сприяє патогенезу нейродегенеративного захворювання, були знайдені при ХП [243].

Введення 6-OHDA може пригнічувати розвиток захисних ендогенних механізмів клітин, зокрема активацію компонентів антиоксидантної системи у вигляді GSH і глутатіонзалежних ферментів антиоксидантного захисту - GP і GST. Такі антиоксиданти, як GP, можуть діяти як компенсаторний механізм у боротьбі з токсичною дією 6-OHDA і запобігати дегенерації DA [122]. Інші дослідження показали зниження GSH, підвищення вмісту заліза та активацію NFκB [244]. Але в нашому дослідженні рівень GSH збільшився у щурів, які отримували C<sub>60</sub>FAS. Так, C<sub>60</sub>FAS підвищував лише рівень каталази та GSH, рівні інших ферментів знижувалися або не змінювалися.

Розвиток 6-OHDA-індукованої ХП у щурів не впливав суттєво на маркери оксидантно-антиоксидантної системи в мозку порівняно із плацебо-оперованими щурами. У той час, як лікування C<sub>60</sub>FAS спричинило легкий зсув у

антиоксидантно-прооксидантній системі в мозку щурів, які отримували 6-OHDA-ХП та негативним впливом на систему глутатіону, що може бути ознакою його токсичного ефекту порівняно з відповідною контрольною групою.

Кузнєцова та ін. [188] показали, що незважаючи на кумулятивні ефекти  $C_{60}$ FAS у нирках і підшлунковій залозі, він відновлює печінку, послаблює дистрофічні процеси в гепатоцитах, прояви апоптозу і некрозу та нормалізує значення більшості функціональних біохімічних маркерів печінки. Автори пояснили це явище терапевтичними ефектами фулерену  $C_{60}$  та його здатністю поглинати вільні радикали [245] і впливати на експресію EGFR. У нашому дослідженні ми спостерігали високий антиоксидантний захист і помірну токсичну дію на ЦНС і ПНС, що супроводжувалося запаленням у кишечнику щурів із ХП.

## ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі доведено релевантність 6-OHDA моделі хвороби Паркінсона у щурів для дослідження розладів у шлунково-кишковому тракті в патогенезі даної хвороби, навіть через 7 місяців після моделювання. Дані розлади на молекулярному рівні супроводжувалися зниженням рівня дофамін-секретувальних клітин, збільшенням TRPV4 та майже повним зникненням TRPM8 іонних каналів у товстій кишці щурів. Доведено роль TRPV4 та TRPM8 іонних каналів у розладі секретомоторних функції товстої кишки та порушенні інтегративної цілісності її епітеліального бар'єру в патогенезі хвороби Паркінсона. Встановлено, що C<sub>60</sub>FAS є перспективним для подальшого застосування в комплексній терапії центральних розладів та порушенні секретомоторних функцій травного каналу за 6-OHDA хвороби Паркінсона у щурів.

1. Вперше показано, що за LPS- і 6-OHDA-модельованої хвороби Паркінсона у щурів та ротенонової моделі у мишей, спостерігаються функціональні розлади секретомоторної функції шлунково-кишковому тракті, проте напрям розладів саме за 6-OHDA моделі у щурів та ротенонової моделі у мишей відповідає клінічному перебігу хвороби Паркінсона з боку шлунково-кишкового тракту, а саме збільшення часу транзиту вздовж травного каналу, зниженням рівня стимульованої моторики товстої кишки. Навпаки у щурів з LPS хворобою Паркінсона спостерігали пришвидшення часу кишкового транзиту, збільшення рівня стимульованої моторики товстої кишки, а також підвищення кількості умовно-патогенних ентеробактерій і зниження числа *Bifidobacterium spp.* та *Lactobacillus spp.* у просвітній мікробіоті.

2. Уперше встановлено, що за 6-OHDA-індукованої хвороби Паркінсона у щурів, розлади з боку шлунково-кишкового тракту (зменшення споживання води, уповільнення швидкості кишкового транзиту, якісні зміни глікопротеїнів слизу та просвітної кишкової мікробіоти) відтворюються навіть у віддаленні терміни після моделювання захворювання (на 7 місяць експерименту), хоча ставали менш виразними в порівнянні з показниками на 1-й місяць після введення 6-OHDA.

3. Встановлено, що зменшення інтенсивності забарвлення TH в середньому мозку щурів асоційоване з 2-кратним зменшенням TH у товстій кишці, зникненням TRPM8 іонних каналів і 2-кратним збільшенням експресії TRPV4 іонних каналів у товстій кишці за 6-OHDA хвороби Паркінсона. Причому у віддалені терміни через 7 місяців після моделювання 6-OHDA хвороби Паркінсона ці показники не відновлювалися. Імуногістохімічно доведена локалізація TRPV4 та TRPM8 іонних каналів на апікальній мембрані епітеліоцитів товстої кишки щурів.

4. Встановлено, що фармакологічна активація TRPV4 іонних каналів селективним агоністом GSK1016790A (0,3 мкМ) знижує карбахолін-стимульовану скоротливу активність ізольованого відрізка товстої кишки щурів. Цей пригнічувальний ефект GSK1016790A був більш виразним у щурів з 6-OHDA хворобою Паркінсона у порівнянні з контрольною групою. Активація TRPM8 каналів ментолом (100 мкМ) на фоні дії карбахоліну не призводила до змін у максимальному піку скорочення, а також площі під кривою, що репрезентує індекс моторної активності у групі плацебо-оперованих та щурів з 6-OHDA хворобою Паркінсона. За реєстрації ізометричного скорочення смужок гладеньких м'язів товстої кишки щурів методом тензометрії, GSK1016790A та в меншій мірі ментол пригнічували амплітуди KCl-стимульованих скорочень у щурів з 6-OHDA хвороби Паркінсона.

5. У щурів з 6-OHDA хворобою Паркінсона спостерігався нижчий рівень секреції іонів у відповідь на стимулювальний ефект карбахоліну (50 мкМ) у порівнянні з групою плацебо, а також тенденція до підвищення трансепітеліальної проникності. Активація TRPV4 каналів селективним агоністом GSK1016790A (0,3 мкМ) призводила до зниження базального струму короткого замикання та рівня відповіді на стимулювальну дію карбахоліну в плацебо-оперованих щурів. У щурів з 6-OHDA хворобою Паркінсона GSK1016790A (0,3 мкМ) не впливав на базальний електрогенний транспорт іонів, проте пригнічував стимулювальний ефект карбахоліну та зумовлював підвищення рівня трансепітеліальної проникності. Агоніст TRPM8 іонних каналів ментол (100 мкМ) не викликав змін у показниках базального струму короткого замикання через епітелій товстої кишки, проте

пригнічував стимулювальний ефект карбахоліну у плацебо-оперованих щурів. Ефект агоністу TRPM8 іонних каналів ментолу був відсутній у щурів з 6-OHDA хворобою Паркінсона.

6. Введення первинного водного розчину  $C_{60}$  фулерену ( $C_{60}$ FAS) впродовж 10 днів (0,65 мг/кг, *i.p.*) попереджало 6-OHDA-зумовлене руйнування дофамінергічних нейронів у середньому мозку, знижувало рівень тривожності у щурів з 6-OHDA хворобою Паркінсона; покращувало харчову поведінку. Ці позитивні зміни щодо перебігу 6-OHDA хвороби Паркінсона, асоціювалися із відновленням швидкості транзиту вздовж травного каналу та рівня стимульованої карбахоліном моторної активності товстої кишки щурів з 6-OHDA хворобою Паркінсона відносно групи, яка отримувала фізіологічний розчин. Проте введення  $C_{60}$ FAS мало помірний токсичний вплив (підвищення фагоцитарної активності перитонеальних макрофагів, зсув у антиоксидантно-прооксидантній системі мозку), що повинно бути враховано при проведенні подальших досліджень щодо застосування  $C_{60}$ FAS для лікування хвороби Паркінсона.

**СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ**

1. Ascherio A, Schwarzschild MA. The epidemiology of Parkinson's disease: risk factors and prevention. *Lancet. Neurol.* 2016;15:1257–1272.
2. Карабань ІМ. Хвороба Паркінсона: патогенетичні аспекти медикаментозної терапії та клінічного перебігу. 2014.
3. Pfeiffer RF. Gastrointestinal dysfunction in Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat. Disord.* 2011;17:10–15.
4. Kalia LV, Lang AE. Parkinson's disease. *Lancet.* 2015;386:896–912.
5. Georgescu D, Ancusa OE, Georgescu LA, Ionita I, Reisz D. Nonmotor gastrointestinal disorders in older patients with Parkinson's disease: is there hope? *Clin. Interv. Aging.* 2016;11:1601–1608.
6. Pellegrini C, Antonioli L, Colucci R. et al. Gastric motor dysfunctions in Parkinson's disease: Current pre-clinical evidence. *Park. Relat. Disord.* 2015;21:1407–1414.
7. Lubomski M, Davis RL, Sue CM. Gastrointestinal dysfunction in Parkinson's disease. *J. Neurol.* 2020;267:1377–1388.
8. Hardoff R, Sula M, Tamir A. et al. Gastric emptying time and gastric motility in patients with Parkinson's disease. *Mov. Disord.* 2001;16:1041–1047.
9. Van Ijzendoorn SCD, Derkinderen P. The Intestinal Barrier in Parkinson's Disease: Current State of Knowledge. *J. Parkinsons. Dis.* 2019;9:S323–S329.
10. Samanta A, Hughes TET, Moiseenkova-Bell VY. Transient receptor potential (TRP) channels. In *Subcellular Biochemistry*. Springer New York. 2018; 87:141–165.
11. Zhao Y, McVeigh BM, Moiseenkova-Bell VY. Structural Pharmacology of TRP Channels. *J. Mol. Biol.* 2021;433:166914.
12. Lee K, Jo YY, Chung G. et al. Functional Importance of Transient Receptor Potential (TRP) Channels in Neurological Disorders. *Front. Cell Dev. Biol.* 2021;9:410.
13. de Petrocellis L, Orlando P, Moriello AS. et al. Cannabinoid actions at TRPV

- channels: Effects on TRPV3 and TRPV4 and their potential relevance to gastrointestinal inflammation. *Acta Physiol.* 2012;204:255–266.
14. Michalick L, Kuebler WM. TRPV4—A Missing Link Between Mechanosensation and Immunity. *Front. Immunol.* 2020;11:413.
  15. Earley S, Heppner TJ, Nelson MT, Brayden JE. TRPV4 forms a novel Ca<sup>2+</sup> signaling complex with ryanodine receptors and BKCa channels. *Circ. Res.* 2005;97: 1270–1279.
  16. Fichna J, Poole DP, Veldhuis N et al. Transient receptor potential vanilloid 4 inhibits mouse colonic motility by activating NO-dependent enteric neurotransmission. *J. Mol. Med.* 2015;93:1297–1309.
  17. Amato A, Terzo S, Lentini et al. TRPM8 Channel Activation Reduces the Spontaneous Contractions in Human Distal Colon. *Int. J. Mol. Sci.* 2020;21:1–14.
  18. Guibert C, Ducret T, Savineau JP. Expression and physiological roles of TRP channels in smooth muscle cells. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2011;704:687–706.
  19. Tanner CM, Goldman SM. Epidemiology of Parkinson's disease. *Neurol. Clin.* 1996;14:317–335.
  20. Guttmacher AE, Collins FS, Nussbaum RL, Ellis CE. Alzheimer's disease and Parkinson's disease. *N. Engl. J. Med.* 2003;348:1356–1364.
  21. Postuma RB, Aarsland D, Barone P. et al. Identifying prodromal Parkinson's disease: pre-motor disorders in Parkinson's disease. *Mov. Disord.* 2012;27;617–626.
  22. Katzenschlager R, Head J, Schrag A. et al. Fourteen-year final report of the randomized PDRG-UK trial comparing three initial treatments in PD. *Neurology.* 2008;71:474–480.
  23. Kouli A, Torsney KM, Kuan W.-L. Parkinson's Disease: Etiology, Neuropathology, and Pathogenesis. *Park. Dis. Pathog. Clin. Asp.* 2018:3–26.
  24. Deng H, Wang P, Jankovic J. The genetics of Parkinson disease. *Ageing Res. Rev.* 2018;42:72–85.
  25. Schulte C, Gasser T. Genetic basis of Parkinson's disease: inheritance, penetrance, and expression. *Appl. Clin. Genet.* 2011;4:67–80.

26. Nichols WC, Pankratz N, Marek DK. et al. Mutations in GBA are associated with familial Parkinson disease susceptibility and age at onset. *Neurology*. 2009;72:310–316.
27. Xu K, Xu Y, Brown-Jermyn D. et al. Estrogen prevents neuroprotection by caffeine in the mouse 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine model of Parkinson's disease. *J. Neurosci*. 2006;26:535–541.
28. Betarbet R, Sherer TB, MacKenzie G. et al. Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson's disease. *Nat. Neurosci*. 2000;3:1301–1306.
29. Jankovic J, Tan EK. Parkinson's disease: Etiopathogenesis and treatment. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*. 2020;91:795–808.
30. Schrag A, Horsfall L, Walters K. et al. Prediagnostic presentations of Parkinson's disease in primary care: a case-control study. *Lancet. Neurol*. 2015;14:57–64.
31. Kim N, Yun M, Oh YJ, Choi HJ. Mind-altering with the gut: Modulation of the gut-brain axis with probiotics. *J. Microbiol*. 2018;56:172–182.
32. Yuan T.-F., Machado S, Arias-Carrion O. Gut microbiota and brain function: a new target for brain diseases? *CNS Neurol. Disord. Drug Targets*. 2014;13:733–735.
33. Соболев КВ, Белостоцкая ГБ. Ферментированный продукт лактобактерий индуцирует изменение динамики внутриклеточного кальция в нейронах головного мозга крысы. *Биологические мембраны. Журнал мембранной и клеточной биологии*. 2015;32:399–408.
34. Sun F, Deng Y, Han, X. et al. A secret that underlies Parkinson's disease: The damaging cycle. *Neurochem. Int*. 2019;129:104484.
35. Trist BG, Hare DJ, Double KL. Oxidative stress in the aging substantia nigra and the etiology of Parkinson's disease. *Aging Cell*. 2019;18:e13031.
36. Elbaz A, Clavel J, Rathouz PJ. et al. Professional exposure to pesticides and Parkinson disease. *Ann. Neurol*. 2009;66:494–504.
37. Hattori N, Mizuno Y. Mitochondrial Dysfunction in Parkinson's Disease. *Exp. Neurobiol*. 2015;24:406–411.
38. Pickrell AM, Youle RJ. The roles of PINK1, parkin, and mitochondrial fidelity in

- Parkinson's disease. *Neuron*. 2015;85:257–273.
39. Luth ES, Stavrovskaya IG, Bartels T. et al. Soluble, prefibrillar  $\alpha$ -synuclein oligomers promote complex I-dependent,  $\text{Ca}^{2+}$ -induced mitochondrial dysfunction. *J. Biol. Chem.* 2014;289:21490–21507.
  40. Blandini F, Armentero MT. Animal models of Parkinson's disease. *FEBS J.* 2012;279:1156–1166.
  41. Chiba K, Trevor A, Castagnoli N. Metabolism of the neurotoxic tertiary amine, MPTP, by brain monoamine oxidase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1984;120:574–578.
  42. Harrison JF, Hollensworth SB, Spitz DR. et al. Oxidative stress-induced apoptosis in neurons correlates with mitochondrial DNA base excision repair pathway imbalance. *Nucleic Acids Res.* 2005;33:4660.
  43. Innos J, Hickey MA. Using Rotenone to Model Parkinson's Disease in Mice: A Review of the Role of Pharmacokinetics. *Chem. Res. Toxicol.* 2021;34:1223–1239.
  44. Hirsch EC, Hunot S. Neuroinflammation in Parkinson's disease: a target for neuroprotection? *Lancet. Neurol.* 2009;8:382–397.
  45. Nagatsu T, Mogi M, Ichinose H, Togari A. Changes in cytokines and neurotrophins in Parkinson's disease. *J. Neural Transm. Suppl.* 2000:277–290.
  46. Terada T, Yokokura M, Yoshikawa E. et al. Extrastriatal spreading of microglial activation in Parkinson's disease: a positron emission tomography study. *Ann. Nucl. Med.* 2016;30:579–587.
  47. Edison P, Ahmed I, Fan Z. et al. Microglia, Amyloid, and Glucose Metabolism in Parkinson's Disease with and without Dementia. *Neuropsychopharmacology.* 2013;38:938.
  48. Su X, Maguire-Zeiss KA, Giuliano R. et al. Synuclein activates microglia in a model of Parkinson's disease. *Neurobiol. Aging.* 2008;29:1690–1701.
  49. Williams-Gray CH, Wijeyekoon R, Yarnall AJ. et al. Serum immune markers and disease progression in an incident Parkinson's disease cohort (ICICLE-PD). *Mov. Disord.* 2016;31:995–1003.

50. Hirsch EC, Standaert DG. Ten Unsolved Questions About Neuroinflammation in Parkinson's Disease. *Mov. Disord.* 2021;36:16–24.
51. Junhee Seok H., Shaw Warren Alex G.C. et al. Genomic responses in mouse models poorly mimic human inflammatory diseases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2013; 110:3507–3512.
52. Carvey PM, Chang Q, Lipton JW, Ling Z. Prenatal exposure to the bacteriotoxin lipopolysaccharide leads to long-term losses of dopamine neurons in offspring: A potential, new model of Parkinson's disease. *Front. Biosci.* 2003;8.
53. Stewart I, Schluter PJ, Shaw GR. Cyanobacterial lipopolysaccharides and human health - A review. *Environ. Heal. A Glob. Access Sci. Source.* 2006;5:1–23.
54. Xing B, Xin T, Hunter R.L, Bing G. Pioglitazone inhibition of lipopolysaccharide-induced nitric oxide synthase is associated with altered activity of p38 MAP kinase and PI3K/ Akt. *J. Neuroinflammation.* 2008;5:1–11.
55. Qin L, Liu Y, Wang T. et al. NADPH oxidase mediates lipopolysaccharide-induced neurotoxicity and proinflammatory gene expression in activated microglia. *J. Biol. Chem.* 2004;279:1415–1421.
56. Zhang FX, Xu RS. Juglanin ameliorates LPS-induced neuroinflammation in animal models of Parkinson's disease and cell culture via inactivating TLR4/NF- $\kappa$ B pathway. *Biomed. Pharmacother.* 2018;97:1011–1019.
57. Anlauf M, Schäfer MKH, Eiden L, Weihe E. Chemical coding of the human gastrointestinal nervous system: cholinergic, VIPergic, and catecholaminergic phenotypes. *J. Comp. Neurol.* 2003;459:90–111.
58. Halliday GM, Li YW, Blumbergs PC. et al. Neuropathology of immunohistochemically identified brainstem neurons in Parkinson's disease. *Ann. Neurol.* 1990;27:373–385.
59. Braak H, De Vos RAI, Bohl J, Del Tredici K. Gastric alpha-synuclein immunoreactive inclusions in Meissner's and Auerbach's plexuses in cases staged for Parkinson's disease-related brain pathology. *Neurosci. Lett.* 2006;396:67–72.
60. Del Tredici K, Rüb U, De Vos RAI. et al. Where does parkinson disease pathology begin in the brain? *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 2002;61:413–426.

61. Pedrosa Carrasco AJ, Timmermann L, Pedrosa DJ. Management of constipation in patients with Parkinson's disease. *npj Park. Dis.* 2018;4:6.
62. Pfeiffer RF. Non-motor symptoms in Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat. Disord.* 2016;22:S119–S122.
63. Amani H, Habibey R, Hajmiresmail SJ. et al. Antioxidant nanomaterials in advanced diagnoses and treatments of ischemia reperfusion injuries. *J. Mater. Chem. B* 2017;5:9452–9476.
64. Ferreira CA, Ni D, Rosenkrans ZT, Cai W. Scavenging of reactive oxygen and nitrogen species with nanomaterials. *Nano Res.* 2018;11:4955–4984.
65. Pirtošek Z, Bajenaru O, Kovács N. et al. Update on the Management of Parkinson's Disease for General Neurologists. *Parkinsons. Dis.* 2020.
66. Hardoff R, Sula M, Tamir A. et al. Gastric Emptying Time and Gastric Motility in Patients with Parkinson's Disease. 2001.
67. Kim J.-S, Sung H.-Y. Gastrointestinal Autonomic Dysfunction in Patients with Parkinson's Disease. *J. Mov. Disord.* 2015;8:76.
68. Forsyth CB, Shannon KM, Kordower JH. et al. Increased intestinal permeability correlates with sigmoid mucosa alpha-synuclein staining and endotoxin exposure markers in early Parkinson's disease. *PLoS One.* 2011;6.
69. Oleskin AV, El'-Registan GI, Shenderov BA. Role of neuromediators in the functioning of the human microbiota: "Business talks" among microorganisms and the microbiota-host dialogue. *Microbiology.* 2016;85:1–22.
70. Scheperjans F. Can microbiota research change our understanding of neurodegenerative diseases? *Neurodegener. Dis. Manag.* 2016;6:81–85.
71. Moore C, Gupta R, Jordt SE. et al. Regulation of Pain and Itch by TRP Channels. *Neurosci. Bull.* 2018;34:120–142.
72. Luo J, Qian A, Oetjen LK. et al. TRPV4 Channel Signaling in Macrophages Promotes Gastrointestinal Motility via Direct Effects on Smooth Muscle Cells. *Immunity.* 2018;49:107-119.e4.
73. Cenac N, Bautzova T, Le Faouder P. et al. Quantification and potential functions of endogenous agonists of transient receptor potential channels in patients with

- irritable bowel syndrome. *Gastroenterology*. 2015;149:433-444.e7.
74. Neuberger A, Nadezhdin KD, Sobolevsky AI. TRPV3 expression and purification for structure determination by Cryo-EM. *Methods Enzymol*. 2021;652:31–48.
  75. Ito S, Kume H, Naruse K. et al. A novel Ca<sup>2+</sup> influx pathway activated by mechanical stretch in human airway smooth muscle cells. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol*. 2008;38:407–413.
  76. Baratchi S, Keov P, Darby WG. et al. The TRPV4 agonist GSK1016790A regulates the membrane expression of TRPV4 channels. *Front. Pharmacol*. 2019;9.
  77. Дринь ДО, Мельник МІ, Кізуб ІВ. та ін. Роль TRPV4-каналів у регуляції фенілефрин-індукованого скорочення легеневих артерій щурів. 2016:576.
  78. Matsumoto K, Yamaba R, Inoue K. et al. Transient receptor potential vanilloid 4 channel regulates vascular endothelial permeability during colonic inflammation in dextran sulphate sodium-induced murine colitis. *Br. J. Pharmacol*. 2018;175:84–99.
  79. Jie P, Lu Z, Hong Z. et al. Activation of Transient Receptor Potential Vanilloid 4 is Involved in Neuronal Injury in Middle Cerebral Artery Occlusion in Mice. *Mol. Neurobiol*. 2016;53:8–17.
  80. Hamanaka Y, Park D, Yin P. et al. Transcriptional Orchestration of the Regulated Secretory Pathway in Neurons by the bHLH protein DIMM. *Curr. Biol*. 2010;20:9–18.
  81. Kraft R, Harteneck C. The mammalian melastatin-related transient receptor potential cation channels: an overview. *Pflugers Arch*. 2005;451:204–211.
  82. Hashimoto A, Kambe T, Mg Zn and Cu. Transport Proteins: A Brief Overview from Physiological and Molecular Perspectives. *J. Nutr. Sci. Vitaminol. (Tokyo)*. 2015;61:S116–S118.
  83. Liu Z, Wu H, Wei Z. et al. TRPM8: a potential target for cancer treatment. *J. Cancer Res. Clin. Oncol*. 2016;142:1871–1881.
  84. Zholos A, Johnson C, Burdyga T, Melanaphy D. TRPM channels in the vasculature. In *Proceedings of the Advances in Experimental Medicine and*

- Biology. *Adv Exp Med Biol.* 2011;704:707–729.
85. Ramachandran R, Hyun E, Zhao L. et al. TRPM8 activation attenuates inflammatory responses in mouse models of colitis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2013;110:7476–7481.
  86. Harrington AM, Hughes PA, Martin CM. et al. A novel role for TRPM8 in visceral afferent function. *Pain.* 2011;152:1459–1468.
  87. Mustafa S, Oriowo MA. Cooling-induced contraction of the rat gastric fundus: mediation via transient receptor potential (TRP) cation channel TRPM8 receptor and Rho-kinase activation. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 2005;32:832–838.
  88. Joshi V, Strege P.R, Farrugia G, Beyder A. Mechanotransduction in gastrointestinal smooth muscle cells: Role of mechanosensitive ion channels. *Am. J. Physiol. - Gastrointest. Liver Physiol.* 2021;320:G897–G906.
  89. House S.J, Potier M, Bisailon J. et al. The non-excitabile smooth muscle: calcium signaling and phenotypic switching during vascular disease. *Pflugers Arch.* 2008;456:769–785.
  90. Fry CH, Sui G, Wu C. T-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels in non-vascular smooth muscles. *Cell Calcium* 2006;40:231–239.
  91. Zholos AV, Bolton TB. Muscarinic receptor subtypes controlling the cationic current in guinea-pig ileal smooth muscle. *Br. J. Pharmacol.* 1997;122:885–893.
  92. Yamazawa T, Iino M. Simultaneous imaging of  $\text{Ca}^{2+}$  signals in interstitial cells of Cajal and longitudinal smooth muscle cells during rhythmic activity in mouse ileum. *J. Physiol.* 2002;538:823–835.
  93. Perrino BA. Regulation of gastrointestinal motility by  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulin-stimulated protein kinase II. *Arch. Biochem. Biophys.* 2011;510:174–181.
  94. Bollimuntha S, Pani B, Singh BB. Neurological and motor disorders: Neuronal store-operated  $\text{Ca}^{2+}$  signaling: An overview and its function. In *Advances in Experimental Medicine and Biology*; Springer New York LLC. 2017;993:535–556.
  95. Sukumaran P, Sun Y, Schaar A. et al. TRPC channels and Parkinson's disease. In *Advances in Experimental Medicine and Biology*; Springer New York LLC.

- 2017;976:85–94.
96. Cali T, Ottolini D, Brini M. Mitochondria, calcium, and endoplasmic reticulum stress in Parkinson's disease. *BioFactors*. 2011;37:228–240.
  97. Weber EW, Muller WA. Roles of transient receptor potential channels in regulation of vascular and epithelial barriers. *Tissue Barriers*. 2017;5.
  98. Cong X, Zhang Y, Shi L. et al. Activation of transient receptor potential vanilloid subtype 1 increases expression and permeability of tight junction in normal and hyposalivatory submandibular gland. *Lab. Invest*. 2012;92:753–768.
  99. Matsumoto K, Kato S. Physiological and pathophysiological roles of trpv4 channel in gastrointestinal tract. *Folia Pharmacol. Jpn*. 2019;154:92–96.
  100. Grace MS, Bonvini SJ, Belvisi MG, McIntyre P. Modulation of the TRPV4 ion channel as a therapeutic target for disease. *Pharmacol. Ther*. 2017;177:9–22.
  101. Yamawaki H, Mihara H, Suzuki N. et al. Role of transient receptor potential vanilloid 4 activation in indomethacin-induced intestinal damage. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol*. 2014;307.
  102. Wan H, Chen XY, Zhang F. et al. Capsaicin inhibits intestinal Cl<sup>-</sup> secretion and promotes Na<sup>+</sup> absorption by blocking TRPV4 channels in healthy and colitic mice. *J. Biol. Chem*. 2022;298:101847.
  103. De Jong PR, Takahashi N, Peiris M. et al. TRPM8 on mucosal sensory nerves regulates colitogenic responses by innate immune cells via CGRP. *Mucosal Immunol*. 2015;8:491–504.
  104. Henström M, Hadizadeh F, Beyder A. et al. TRPM8 polymorphisms associated with increased risk of IBS-C and IBS-M. *Gut* 2017;66:1725–1727.
  105. Wang IC, Tai LA, Lee DD. et al. C60 and water-soluble fullerene derivatives as antioxidants against radical-initiated lipid peroxidation. *J. Med. Chem*. 1999;42:4614–4620.
  106. Dragojevic-Simic V, Jacevic V, Dobric S. et al. Anti-inflammatory activity of fulleranol C60(OH)<sub>24</sub> nano-particles in a model of acute inflammation in rats. *Dig. J. Nanomater. Biostructures* 2011;6:819–827.
  107. Yudoh K, Karasawa R, Masuko K, Kato T. Water-soluble fullerene (C60) inhibits

- the development of arthritis in the rat model of arthritis. *Int. J. Nanomedicine* 2009;4:217–225.
108. Gharbi N, Pressac M, Hadchouel M. et al. [ 60 ] Fullerene is an in vivo Powerful Antioxidant With no Acute or Sub-acute Toxicity. *New York*. 2005;5:4–7.
  109. Halenova TI, Vareniuk IM, Roslova NM. et al. Hepatoprotective effect of orally applied water-soluble pristine C60 fullerene against CCl4-induced acute liver injury in rats. *RSC Adv.* 2016;6:100046–100055.
  110. Vereshchaka IV, Bulgakova NV, Maznychenko AV. et al. C60 fullerenes diminish muscle fatigue in rats comparable to N-acetylcysteine or  $\beta$ -Alanine. *Front. Physiol.* 2018;9:1–12.
  111. Gonchar OO, Maznychenko AV, Bulgakova, NV. et al. C 60 fullerene prevents restraint stress-induced oxidative disorders in rat tissues: Possible involvement of the Nrf2/ARE-antioxidant pathway. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2018.
  112. Baldrighi M, Trusel M, Tonini R, Giordani S. Carbon nanomaterials interfacing with neurons: An in vivo perspective. *Front. Neurosci.* 2016;10:1–27.
  113. Zha Y ying, Yang B, Tang M. liang. et al. Concentration-dependent effects of fullerenol on cultured hippocampal neuron viability. *Int. J. Nanomedicine* 2012, 7, 3099–3109.
  114. Dugan LL, Lovett EG, Quick KL. et al. Fullerene-based antioxidants and neurodegenerative disorders. In *Proceedings of the Parkinsonism and Related Disorders*; Elsevier. 2001;7:243–246.
  115. Tsvilovskyy VV, Zholos AV, Aberle T. et al. Deletion of TRPC4 and TRPC6 in Mice Impairs Smooth Muscle Contraction and Intestinal Motility In Vivo. *Gastroenterology.* 2009;137:1415–1424.
  116. Ehlert FJ, Pak KJ, Griffin MT. Muscarinic agonists and antagonists: Effects on gastrointestinal function. *Handb. Exp. Pharmacol.* 2012;208:343–374.
  117. Dryn DO, Melnyk MI, Al Kury LT. et al. C 60 fullerenes disrupt cellular signalling leading to TRPC4 and TRPC6 channels opening by the activation of muscarinic receptors and G-proteins in small intestinal smooth muscles. *Cell. Signal.* 2018;43:40–46.

118. Melnyk MI, Ivanova IV, Dryn DO. et al. C60 fullerenes selectively inhibit BKCa but not Kv channels in pulmonary artery smooth muscle cells. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* 2019;19:1–118.
119. Braak H, Del Tredici K, Rüb U. et al. Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiol. Aging* 2003;24:197–211.
120. Ritter U, Prylutsky YI, Evstigneev MP. et al. Structural features of highly stable reproducible C60 fullerene aqueous colloid solution probed by various techniques. *Fullerenes Nanotub. Carbon Nanostructures.* 2015;23:530–534.
121. Prylutska SV, Grebinyk AG, Lynchak OV. et al. In vitro and in vivo toxicity of pristine C60 fullerene aqueous colloid solution. *Fullerenes Nanotub. Carbon Nanostructures.* 2019:1–14.
122. Talanov SA, Oleshko NN, Tkachenko MN, Sagach VF. Pharmacoprotective Influences on Different Links of the Mechanism Underlying 6-Hydroxydopamine-Induced Degeneration of Nigro-Striatal Dopaminergic Neurons. 2006;38.
123. Hoban DB, Connaughton E, Connaughton C. et al. Further characterisation of the LPS model of Parkinson's disease: A comparison of intra-nigral and intra-striatal lipopolysaccharide administration on motor function, microgliosis and nigrostriatal neurodegeneration in the rat. *Brain. Behav. Immun.* 2013;27:91–100.
124. Miyazaki I, Isooka N, Imafuku F. et al. Chronic systemic exposure to low-dose rotenone induced central and peripheral neuropathology and motor deficits in mice: reproducible animal model of parkinson's disease. *Int. J. Mol. Sci.* 2020;214.
125. Mann A, Chesselet MF. *Techniques for Motor Assessment in Rodents.* Second Edi. Elsevier Inc. 2015.
126. Yano JM, Yu K, Mazmanian SK. et al. Indigenous Bacteria from the Gut Microbiota Regulate Host Serotonin Biosynthesis Article Indigenous Bacteria from the Gut Microbiota Regulate Host Serotonin Biosynthesis. *Cell.* 2015;161:264–276.
127. Prior H, Ewart L, Bright J, Valentin JP. Refinement of the charcoal meal study by

- reduction of the fasting period. *ATLA Altern. to Lab. Anim.* 2012;40:99–107.
128. Wald A. Motility disorders of the colon and rectum. *Curr. Opin. Gastroenterol.* 2012;28:52–56.
129. Kisser B, Mangelsen E, Wingolf C. et al. The Ussing Chamber Assay to Study Drug Metabolism and Transport in the Human Intestine. *Curr. Protoc. Pharmacol.* 2017;77.
130. Стецька В, Шуставецька Н, Сергійчук Т. та ін. Кількісний та якісний склад мікробіоти дистального відділу товстої кишки щурів у різні терміни експериментального 6-ОНДА-викликаного паркінсонізму (пілотні дослідження). *Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченка.* 2018;76:26–29.
131. Королюк МА, Иванова ЛИ, Майорова ИГ. Метод определения активности каталазы. *Лабораторное дело.* 1988;1:16-18.
132. Голота ЮВ. Дисертація “Біохімічні показники стану кишкового бар’єру у віддалені терміни після введення цефтриаксону”. Київ. 2017.
133. Орехович ВН. Современные методы в биохимии. *Медицина.* 1977:62-68.
134. Ellman GL. Tissue sulfhydryl groups. *Arch. Biochem. Biophys.* 1959;82:70–77.
135. Tipple TE, Rogers LK. Methods for the determination of plasma or tissue glutathione levels. *Methods Mol. Biol.* 2012;889:315–324.
136. Faraji B, Kang HK. Methods compared for determining glutathione peroxidase activity in blood. *Clin. Chem.* 1987;33:539–543.
137. Nilsson LO, Gustafsson A, Mannervik B. Redesign of substrate-selectivity determining modules of glutathione transferase A1-1 installs high catalytic efficiency with toxic alkenal products of lipid peroxidation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2000; 97:9408–9412.
138. Колб ВГ, Камышников ВС. *Справочник по клинической химии.* Минск, Беларусь. 1982:366.
139. Dische Z, Shettles LB. A specific color reaction of methylpentoses and a spectrophotometric micromethod for their determination. *J. Biol. Chem.* 1948;175:595–603.

140. Романенко ЕГ, Кленина ИА. Метод определения гексоаминов в слюне. Вісник пробл. біол. і мед. 2013;2(1):215-217.
141. Lau D, Mollnau H, Eiserich JP. et al. Myeloperoxidase mediates neutrophil activation by association with CD11b/CD18 integrins. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2005;102:431–436.
142. Pietrangeli CE, Skamene E, Edelson PJ, Kongshavn PAL. Measurement of 5'-nucleotidase in mouse peritoneal macrophages in listeriosis. Infect. Immun. 1981;32:1206–1210.
143. Faivre F, Joshi A, Bezard E, Barrot M. The hidden side of Parkinson's disease: Studying pain, anxiety and depression in animal models. Neurosci. Biobehav. Rev. 2019;96:335–352.
144. Duty S, Jenner P. Animal models of Parkinson's disease: a source of novel treatments and clues to the cause of the disease. Br. J. Pharmacol. 2011;164:1357–1391.
145. Akiyama H, McGeer PL. Microglial response to 6-hydroxydopamine-induced substantia nigra lesions. Brain Res. 1989;489:247–2533.
146. Castaño A, Herrera AJ, Cano J, Machado A. Lipopolysaccharide intranigral injection induces inflammatory reaction and damage in nigrostriatal dopaminergic system. J. Neurochem. 1998;70:1584–1592.
147. Walsh S, Finn DP, Dowd E. Time-course of nigrostriatal neurodegeneration and neuroinflammation in the 6-hydroxydopamine-induced axonal and terminal lesion models of Parkinson's disease in the rat. Neuroscience. 2011;175:251–261.
148. Flores-Martinez YM, Fernandez-Parrilla MA, Ayala-Davila J. et al. Acute Neuroinflammatory Response in the Substantia Nigra Pars Compacta of Rats after a Local Injection of Lipopolysaccharide. J. Immunol. Res. 2018.
149. Björklund A, Dunnett SB. The Amphetamine Induced Rotation Test: A Re-Assessment of Its Use as a Tool to Monitor Motor Impairment and Functional Recovery in Rodent Models of Parkinson's Disease. J. Parkinsons. Dis. 2019;9:17.
150. Bing G, Liu M. Lipopolysaccharide animal models for Parkinson's disease.

- Parkinsons. Dis. 2011.
151. Ungerstedt U. Postsynaptic supersensitivity after 6-hydroxy-dopamine induced degeneration of the nigro-striatal dopamine system. *Acta Physiol. Scand. Suppl.* 1971;367:69–93.
  152. Marshall JF, Ungerstedt U. Striatal efferent fibers play a role in maintaining rotational behavior in the rat. *Science.* 1977;198:62–64.
  153. Ma K, Xiong N, Shen Y, Han C. et al. Weight Loss and Malnutrition in Patients with Parkinson’s Disease: Current Knowledge and Future Prospects. *Front. Aging Neurosci.* 2018;10:1.
  154. Cho I, Blaser MJ. The human microbiome: at the interface of health and disease. *Nat. Rev. Genet.* 2012;13:260–270.
  155. Bell JS, Spencer JJ, Yates RL. et al. Invited Review: From nose to gut - the role of the microbiome in neurological disease. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 2019;45:195–215.
  156. Lubomski M, Tan AH, Lim SY. et al. Parkinson’s disease and the gastrointestinal microbiome. *J. Neurol.* 2020;267:2507–2523.
  157. Sampson T. The impact of indigenous microbes on Parkinson’s disease. *Neurobiol. Dis.* 2020;135.
  158. Lila R, De E, Fernández P. Pathophysiological mechanisms of non-motor features and their role on the pathogenic process in Parkinson’s disease. 2019.
  159. Mittal R, Debs LH, Patel AP. et al. Neurotransmitters: The Critical Modulators Regulating Gut–Brain Axis. *J. Cell. Physiol.* 2017;232:2359–2372.
  160. Rhee KJ, Wu S, Wu X. et al. Induction of persistent colitis by a human commensal, enterotoxigenic *Bacteroides fragilis*, in wild-type C57BL/6 mice. *Infect. Immun.* 2009;77:1708–1718.
  161. Quigley EMM. Microflora Modulation of Motility. *J. Neurogastroenterol. Motil.* 2011;17:140.
  162. van Kessel SP, Bullock A, van Dijk G, El Aidy S. Parkinson’s Disease Medication Alters Small Intestinal Motility and Microbiota Composition in Healthy Rats. *mSystems.* 2022.

163. Tasselli M, Chaumette T, Paillusson S. et al. Effects of oral administration of rotenone on gastrointestinal functions in mice. *Neurogastroenterol. Motil.* 2013;25.
164. Sereniki A, Linard-Medeiros CFB, Silva SN. et al. Schinus terebinthifolius administration prevented behavioral and biochemical alterations in a rotenone model of Parkinson's disease. *Rev. Bras. Farmacogn.* 2016;26:240–245.
165. Maurer A. et al. Appropriate Use Criteria for Gastrointestinal Transit Scintigraphy. *J. Nucl.Med.* 2020.
166. Williams-gray CH. Parkinson's disease Key points. *Medicine (Baltimore).* 2016;44:542–546.
167. Van Kampen JM, Baranowski DC, Robertson HA. et al. The Progressive BSSG Rat Model of Parkinson's: Recapitulating Multiple Key Features of the Human Disease. *PLoS One* 2015;10:e0139694.
168. Lama J, Buhidma Y, Fletcher EJR, Duty S. Animal models of Parkinson's disease: a guide to selecting the optimal model for your research. *Neuronal Signal.* 2021; 5:20210026.
169. Lima AC, Meurer YSR, Bioni VS, Cunha DMG. et al. Female Rats Are Resistant to Cognitive, Motor and Dopaminergic Deficits in the Reserpine-Induced Progressive Model of Parkinson's Disease. *Front. Aging Neurosci.* 2021;13:693.
170. Stetska VO, Moroz OF, Dovbynychuk TV. et al. The Role of TRPV4 Cation Channels in Smooth Muscle Contractile Activity in Rats. *Український журнал медицини, біології та спорту.* 2020;5(6):28.
171. Graff J, Brinch K, Madsen JL. Gastrointestinal mean transit times in young and middle-aged healthy subjects. *Clin. Physiol.* 2001;21:253–259.
172. Loesche WJ. Effect of bacterial contamination on cecal size and cecal contents of gnotobiotic rodents. *J. Bacteriol.* 1969;99:520–526.
173. Killinger B, Labrie V. The Appendix in Parkinson's Disease: From Vestigial Remnant to Vital Organ? *J. Parkinsons. Dis.* 2019;9:S345–S358.
174. Stetska VO, Dovbynychuk TV, Dziubenko NV. et al. Changes in the expression of TRPV4 and TRPM8 channels in the colon of rats with 6-OHDA-induced

- Parkinson's disease. *Ukr. Biochem. J.* 2022;94:57–65.
175. Evans ML, Chorell E, Taylor JD, Åden J. et al. The bacterial curli system possesses a potent and selective inhibitor of amyloid formation. *Mol. Cell.* 2015;57:445–455.
176. Keshavarzian A, Green SJ, Engen PA. et al. Colonic bacterial composition in Parkinson's disease. *Mov. Disord.* 2015;30:1351–1360.
177. Herath M, Hosie S, Bornstein JC. et al. The Role of the Gastrointestinal Mucus System in Intestinal Homeostasis: Implications for Neurological Disorders. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2020;10.
178. Davies HS, Singh P, Deckert-Gaudig T. et al. Secondary structure and glycosylation of mucus glycoproteins by raman spectroscopies. *Anal. Chem.* 2016;88: 11609–11615.
179. Bansil R, Turner BS. The biology of mucus: Composition, synthesis and organization. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2018;124:3–15.
180. Corfield AP, Wagner SA, Clamp JR. et al. Mucin degradation in the human colon: production of sialidase, sialate O-acetyltransferase, N-acetylneuraminidase, arylesterase, and glycosulfatase activities by strains of fecal bacteria. *Infect. Immun.* 1992;60:3971–3978.
181. Liu X, Du ZR, Wang X. et al. Colonic Dopaminergic Neurons Changed Reversely With Those in the Midbrain via Gut Microbiota-Mediated Autophagy in a Chronic Parkinson's Disease Mice Model. *Front. Aging Neurosci.* 2021;13.
182. Aillon KL, Xie Y, El-Gendy N. et al. Effects of nanomaterial physicochemical properties on in vivo toxicity. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2009;61:457–466.
183. Emelyantsev S, Prazdnova E, Chistyakov V, Alperovich I. Biological effects of C60 fullerene revealed with bacterial biosensor—toxic or rather antioxidant? *Biosensors.* 2019;9.
184. Kolosnjaj J, Szwarc H, Moussa F. Toxicity studies of fullerenes and derivatives. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2007;620:168–180.
185. Moussa F, Trivin F, Céolin R. et al. Early effects of C60 administration in Swiss mice: A preliminary account for in vivo C60 toxicity. *Fuller. Sci. Technol.* 1996;

- 4:21–29.
186. Hocke M, Schöne U, Richert H. et al. Every slow-wave impulse is associated with motor activity of the human stomach. *Am. J. Physiol. Liver Physiol.* 2009;296: G709–G716.
  187. Hendrickson OD, Morozova OV, Zherdev AV. et al. Study of distribution and biological effects of fullerene C60 after Single and Multiple Intra-gastrical Administrations to Rats. *Fullerenes Nanotub. Carbon Nanostructures* 2015;23:658–668.
  188. Kuznietsova H, Dziubenko N, Hurmach V. et al. Water-Soluble Pristine C60 Fullerenes Inhibit Liver Fibrotic Alteration and Prevent Liver Cirrhosis in Rats. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2020.
  189. Wynn TA, Chawla A, Pollard JW. Macrophage biology in development, homeostasis and disease. *Nat.* 2013;496:445–455.
  190. Mosser DM, Edwards JP. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat. Rev. Immunol.* 2008;8:958–969.
  191. Bronstein DM, Perez-Otano I, Sun V. et al. Glia-dependent neurotoxicity and neuroprotection in mesencephalic cultures. *Brain Res.* 1995;704:112–116.
  192. Ariza D, Lima MMS, Moreira CG. et al. Intranigral LPS administration produces dopamine, glutathione but not behavioral impairment in comparison to MPTP and 6-OHDA neurotoxin models of Parkinson's disease. *Neurochem. Res.* 2010;35: 1620–1627.
  193. Santiago RM, Barbieiro J, Lima MMS. et al. Depressive-like behaviors alterations induced by intranigral MPTP, 6-OHDA, LPS and rotenone models of Parkinson's disease are predominantly associated with serotonin and dopamine. *Prog. Neuro-Psychopharmacology Biol. Psychiatry.* 2010;34:1104–1114.
  194. Parra I, Martínez I, Ramírez-García G. et al. Differential Effects of LPS and 6-OHDA on Microglia's Morphology in Rats: Implications for Inflammatory Model of Parkinson's Disease. *Neurotox. Res.* 2020;37.
  195. Aono H, Choudhury ME, Higaki H. et al. Microglia may compensate for dopaminergic neuron loss in experimental Parkinsonism through selective

- elimination of glutamatergic synapses from the subthalamic nucleus. *Glia*. 2017;65:1833–1847.
196. Miyanishi K, Choudhury ME, Watanabe M. et al. Behavioral tests predicting striatal dopamine level in a rat hemi-Parkinson's disease model. *Neurochem. Int.* 2019.
197. Oliynyk Zh, Rudyk M, Kalachniuk L. et al. Long-term effects of sham surgery on phagocyte functions in rats. *Biotechnol. Acta*. 2022;15:37-46.
198. Gould TD, Dao DT, Kovacsics CE. Mood and Anxiety Related Phenotypes in Mice. *Neuromethods* 2009;42:1–20.
199. Rojas-Carvajal M, Fornaguera J, Mora-Gallegos A, Brenes JC. Testing experience and environmental enrichment potentiated open-field habituation and grooming behaviour in rats. *Anim. Behav.* 2018;137:225–235.
200. Matsuura K, Kabuto H, Makino H, Ogawa N. Pole test is a useful method for evaluating the mouse movement disorder caused by striatal dopamine depletion. *J. Neurosci. Methods*. 1997;73:45–48.
201. Muller PA, Koscsó B, Rajani GM, Stevanovic K. et al. Crosstalk between muscularis macrophages and enteric neurons regulates gastrointestinal motility. *Cell* 2014;158:300–313.
202. Barbara G, Stanghellini V, Brandi G. et al. Interactions between commensal bacteria and gut sensorimotor function in health and disease. *Am. J. Gastroenterol.* 2005;100:2560–2568.
203. Mikawa S, Ohta Y, Kaji, N. et al. Time-dependent changes in inhibitory action of lipopolysaccharide on intestinal motility in rat. *J. Vet. Med. Sci.* 2015;77:1443.
204. Torihashi S, Ozaki H, Hori M. et al. Resident macrophages activated by lipopolysaccharide suppress muscle tension and initiate inflammatory response in the gastrointestinal muscle layer. *Histochem. Cell Biol.* 2000;113:73–80.
205. Hori M, Kita M, Torihashi S. et al. Upregulation of iNOS by COX-2 in muscularis resident macrophage of rat intestine stimulated with LPS. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 2001;280.
206. Meng C, Sasmal A, Zhang Y. et al. Chemoenzymatic Assembly of Mammalian

- O-Mannose Glycans. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 2018;57:9003–9007.
207. Breloy I, Pacharra S, Aust C, Hanisch FG. A sensitive gel-based global O-glycomics approach reveals high levels of mannosyl glycans in the high mass region of the mouse brain proteome. *Biol. Chem.* 2012;393:709–717.
208. Sun J, Shen X, Li Y, Guo Z. et al. Therapeutic Potential to Modify the Mucus Barrier in Inflammatory Bowel Disease. *Nutrients.* 2016;8.  
Disease: A Novel Approach for Potential Alterations. *Molecules.* 2019;24.
210. Russell AC, Šimurina M, Garcia MT. et al. The N-glycosylation of immunoglobulin G as a novel biomarker of Parkinson's disease. *Glycobiology.* 2017;27: 501–510.
211. Shultz JM, Resnikoff H, Bondarenko V. et al. Neurotoxin-Induced Catecholaminergic Loss in the Colonic Myenteric Plexus of Rhesus Monkeys. *J. Alzheimer's Dis. Park.* 2016;6.
212. Singaram C, Gaumnitz EA, Torbey C. et al. Dopaminergic defect of enteric nervous system in Parkinson's disease patients with chronic constipation. *Lancet (London, England).* 1995;346:861–864.
213. Holzer P. TRP Channels in the Digestive System. *Curr. Pharm. Biotechnol.* 2011;12(1):24-34.
214. Sanders KM, Koh SD, Ro S, Ward SM. Regulation of gastrointestinal motility—insights from smooth muscle biology. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 2012; 9:633–645.
215. Baratchi S, Keov P, Darby WG. et al. The TRPV4 Agonist GSK1016790A Regulates the Membrane Expression of TRPV4 Channels. *Front. Pharmacol.* 2019;10:6.
216. Fichna J, Poole DP, Veldhuis N. et al. Transient receptor potential vanilloid 4 inhibits mouse colonic motility by activating NO-dependent enteric neurotransmission. *J. Mol. Med.* 2015;93:1297–1309.
217. Karaki H, Urakawa N, Kutsky P. Potassium-induced contraction in smooth muscle. *Japanese J. Smooth Muscle Res.* 1984;20:427–444.
218. Ratz PH, Berg KM, Urban NH, Miner AS. Regulation of smooth muscle calcium

- sensitivity: KCl as a calcium-sensitizing stimulus. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2005;288.
219. Malmqvist U, Arner A. Kinetics of contraction in depolarized smooth muscle from guinea-pig taenia coli after photodestruction of nifedipine. *J. Physiol.* 1999;519: 213–221.
220. Xiu XL, Zheng LF, Liu XY. et al. Gastric smooth muscle cells manifest an abnormal phenotype in Parkinson's disease rats with gastric dysmotility. *Cell Tissue Res.* 2020;381:217–227.
221. Bain CC, Mowat AM. Macrophages in intestinal homeostasis and inflammation. *Immunol. Rev.* 2014;260:102–117.
222. De Schepper S, Verheijden S, Aguilera-Lizarraga J. et al. Self-Maintaining Gut Macrophages Are Essential for Intestinal Homeostasis Article Self-Maintaining Gut Macrophages Are Essential for Intestinal Homeostasis. *Cell.* 2018;175:400–415.
223. Van Der Zanden EP, Boeckxstaens GE, De Jonge WJ. The vagus nerve as a modulator of intestinal inflammation. *Neurogastroenterol. Motil.* 2009;21:6–17.
224. Mikkelsen HB. Interstitial cells of Cajal, macrophages and mast cells in the gut musculature: morphology, distribution, spatial and possible functional interactions. *J. Cell. Mol. Med.* 2010;14:818–832.
225. Mori D, Watanabe N, Kaminuma O. et al. IL-17A induces hypo-contraction of intestinal smooth muscle via induction of iNOS in muscularis macrophages. *J. Pharmacol. Sci.* 2014;125:394–405.
226. Zhang P, Sun C, Li H. et al. TRPV4 (Transient Receptor Potential Vanilloid 4) Mediates Endothelium-Dependent Contractions in the Aortas of Hypertensive Mice. *Hypertension* 2018;71:134–142.
227. Li H, Kan H, He C. et al. TRPV4 activates cytosolic phospholipase A<sub>2</sub> via Ca<sup>2+</sup>-dependent PKC/ERK1/2 signalling in controlling hypertensive contraction. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 2018;45:908–915.
228. Bavencoffe A, Kondratskyi A, Gkika D. et al. Complex regulation of the TRPM8 cold receptor channel: Role of arachidonic acid release following M3 muscarinic

- receptor stimulation. *J. Biol. Chem.* 2011;286:9849–9855.
229. Tolstanova G, Holota Y, Dovbynychuk T. et al. The long-term consequences of antibiotic therapy: role of colonic short-chain fatty acids (SCFA) system and intestinal barrier integrity. *PLoS One.* 2019;14(8):e0220642.
230. D'Aldebert E, Cenac N, Rousset P. et al. Transient receptor potential vanilloid 4 activated inflammatory signals by intestinal epithelial cells and colitis in mice. *Gastroenterology.* 2011;140:275-285.e3.
231. Moon C, Zhang W, Sundaram N. et al. Drug-induced secretory diarrhea: A role for CFTR. *Pharmacol. Res.* 2015;102:107.
232. Ye S, Zhou T, Pan D. et al. Fullerene C60 derivatives attenuated microglia-mediated prion peptide neurotoxicity. *J. Biomed. Nanotechnol.* 2016;12:1820–1833.
233. Lu TY, Kao PF, Lee CM. et al. C60 fullerene nanoparticle prevents  $\beta$ -amyloid peptide induced cytotoxicity in neuro 2A cells. *J. Food Drug Anal.* 2011;19:151–158.
234. Dugan LL, Tian LL, Quick KL. et al. Carboxyfullerene neuroprotection postinjury in parkinsonian nonhuman primates. *Ann. Neurol.* 2014;76:393–402.
235. Chen H, Zhang SM, Hernán MA. et al. Weight loss in Parkinson's disease. *Ann. Neurol.* 2003;53:676–679.
236. Halenova T, Raksha N, Vovk T. et al. Effect of C 60 fullerene nanoparticles on the diet-induced obesity in rats. *Int. J. Obes.* 2018;42:1987–1998.
237. Viola A, Munari F, Sánchez-Rodríguez R. et al. The metabolic signature of macrophage responses. *Front. Immunol.* 2019;10.
238. Skivka L,M, Prylutska SV, Rudyk MP. et al. C60 fullerene and its nanocomplexes with anticancer drugs modulate circulating phagocyte functions and dramatically increase ROS generation in transformed monocytes. *Cancer Nanotechnol.* 2018;9.
239. Park EJ, Roh J, Kim Y, Park K. Induction of inflammatory responses by carbon fullerene (C60) in cultured RAW264.7 cells and in intraperitoneally injected mice. *Toxicol. Res.* 2013;26:267–273.
240. Mortiboys HJ, Schaefer J, Reichmann H, Jackson S. Mitochondrial dysfunction

- in Parkinson's disease - Revisited. *Neurol. Neurochir. Pol.* 2007;41:150–159.
241. Eom SA, Kim DW, Shin MJ, Ahn EH. et al. Protective effects of PEP-1-Catalase on stress-induced cellular toxicity and MPTP-induced Parkinson's disease. *BMB Rep.* 2015;48:395–400.
242. Ambani LM, Van Woert MH, Murphy S. Brain Peroxidase and Catalase in Parkinson Disease. *Arch. Neurol.* 1975;32:114–118.
243. Dringen R, Gutterer JM, Hirrlinger J. Glutathione metabolism in brain: Metabolic interaction between astrocytes and neurons in the defense against reactive oxygen species. *Eur. J. Biochem.* 2000;267:4912–4916.
244. Bharath S, Hsu M, Kaur D. et al. Glutathione, iron and Parkinson's disease. *Biochem. Pharmacol.* 2002;64:1037–1048.
245. Prylutska SV, Burlaka AP, Klymenko PP. et al. Using water-soluble C60 fullerenes in anticancer therapy. *Cancer Nanotechnol.* 2011;2:105–110.

**Перелік опублікованих праць та відомості про апробацію досліджень****Праці, в яких опубліковані основні наукові результати дисертації:**

1. **Стецька В.**, Шуставецька Н., Сергійчук Т., Довбинчук Т., Толстанова Г. Кількісний та якісний склад мікробіоти дистального відділу товстої кишки щурів у різні терміни експериментального 6-OHDA-викликаного паркінсонізму (пілотні дослідження). Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченка. Біологія. 2018; №2 (76): 26-29. *(особистий внесок здобувача - інформаційний пошук, експериментальні дослідження, статистичне опрацювання результатів, а також графічна підготовка результатів до опублікування і написання першої версії статі).*
2. **Stetska V.O.**, Moroz O.F., Dovbynchuk T.V., Tolstanova G.M., Zholos A.V. The role of TRPV4 cation channels in smooth muscle contractile activity in rats. Український журнал медицини, біології та спорту. 2020; №5 (6): 370–377. *(особистий внесок здобувача - інформаційний пошук, експериментальні дослідження, статистичне опрацювання результатів, а також графічна підготовка результатів до опублікування і написання першої версії статі).*
3. **Stetska V.O.**, Dovbynchuk T.V., Makedon Y.S., Dziubenko N.V. The effect of water-soluble pristine C60 fullerene on 6-OHDA-induced Parkinson's disease in rats. Regulatory Mechanisms in Biosystems. 2021; 12 (4): 599-607. *(особистий внесок здобувача - інформаційний пошук, експериментальні дослідження, статистичне опрацювання результатів, а також графічна підготовка результатів до опублікування і написання першої версії статі).*
4. **Stetska V.O.**, Dovbynchuk T.V., Dziubenko N.V., Zholos A.V., Tolstanova G.M. Time-dependent changes in the expression of TRPV4 and TRPM8 channels in the colon of rats with 6-OHDA-induced Parkinson's disease. Ukrainian Biochemical Journal. 2022; 94 (2): 57-65. *(особистий внесок здобувача - інформаційний пошук, експериментальні дослідження, статистичне опрацювання результатів, а*

також графічна підготовка результатів до опублікування і написання першої версії статі).

### Опубліковані праці апробаційного характеру:

1. **Стецька В.О.**, Македон Є.С., Довбинчук Т.В., Сергійчук Т.М., Толстановна Г.М. Порівняльна характеристика 6-OHDA та LPS моделей паркінсонізму. *V Всеукраїнська науково-практична конференція студентів, аспірантів та молодих вчених «Об'єднані наукою: перспективи міждисциплінарних досліджень»* 8-9 листопада, Київ, 2018. - С. 102-104.
2. **Stetska V.**, Makhotkina A., Makedon Ye., Gonchar S., Dziubenko N., Dovbynychuk T., Serhiychuk T., Tolstanova G. The early non-motor symptoms in rats with LPS-model of Parkinson's disease. *5<sup>th</sup> International Conference of Cell Biology* May 1-12, Kraków, Poland, 2019. - P. 187.
3. **Stetska V.**, Makhotkina A., Dovbynychuk T., Dziubenko N., Mahmoudi Dehcheshmeh Z., Tolstanova G. The comparative study of the earlier non-motor GI symptoms in rats with LPS- and 6-OHDA-Parkinson's disease. *EMBO Young Scientists Forum* June 27-28, Prague, Czech Republic, 2019. - P. 86.
4. Македон Є.С., **Стецька В.О.**, Довбинчук Т.В., Дзюбенко Н.В., Толстановна Г.М. Порівняльна характеристика стану кишечника щурів при 6-OHDA та LPS-модельованому паркінсонізмі. *Матеріали Міжнародної науково-практичної конференції студентів і молодих вчених «Biomed Talks - 2019»* 15-17 жовтня, Київ. - С. 82-83.
5. Makedon Ye., **Stetska V.**, Dovbynychuk T., Dziubenko N., Prylutskyu Yu., Tolstanova G. The effect of pristine C<sub>60</sub> fullerene on colonic motility in rats with 6-OHDA-induced Parkinson's disease. *63<sup>rd</sup> International conference for students of physics and natural sciences: Open Readings* March 17-20, Vilnius, Lithuania, 2020. – P. 101.

6. Tsymbaluk A., **Stetska V.**, Dovbynychuk T., Makedon Ye., Dziubenko N., Prylutskyi Yu., Tolstanova G. The effect of pristine C<sub>60</sub> fullerene on cognitive dysfunctions in 6-OHDA-induced model of Parkinson's disease in rats. *63<sup>rd</sup> International conference for students of physics and natural sciences: Open Readings March 17-20, Vilnius, Lithuania, 2020.* – P. 550.
7. **Стецька В.О.**, Довбинчук Т.В., Македон Є. А., Дзюбенко Н.В., Мотузюк О.П., Гарманчук Л.В., Прилуцький Ю.І., Толстанова Г.М. Ефект C<sub>60</sub> фулерену на 6-ОНДА-індуковану хворобу Паркінсона у щурів. *VII Всеукраїнська науково-практична конференція студентів, аспірантів та молодих вчених «Об'єднати наукою: перспективи міждисциплінарних досліджень» 12-13 листопада, Київ, 2020.* - С. 156-158.
8. Tsymbaliuk A., **Stetska V.**, Dovbynychuk T., Gorbach O., Tolstanova G., Zholos A. The role of TRPV4 cation channels in smooth muscle contractile activity in rats with Parkinson's disease. *64<sup>th</sup> International conference for students of physics and natural sciences: Open Readings March 16-19, Vilnius, Lithuania, 2021.* – P. 497.

**Документ підписано у сервісі Вчасно (продовження)**  
ДИСЕРТАЦІЯ\_Стецька В.О..pdf

Документ відправлено: 08:00 21.12.2022

**Власник документу**

**Електронний підпис**

08:00 21.12.2022

Ідентифікаційний код: ТТ043776

СТЕЦЬКА ВІКТОРІЯ ОЛЕКСАНДРІВНА

Власник ключа: СТЕЦЬКА ВІКТОРІЯ ОЛЕКСАНДРІВНА

Час перевірки КЕП/ЕЦП: 08:00 21.12.2022

Статус перевірки сертифікату: Сертифікат діє

Серійний номер: 248197DDFAB977E5040000007AEE000A1FDC403

Тип підпису: удосконалений