

УДК 616.858:612.83 +578.69

Влияние ротенона на нейрональные клетки спинного мозга при экспериментальном паркинсонизме у крыс линии Lewis

В. А. Княрян

Институт биохимии им. Г.Х. Бунятына НАН РА
0014, Ереван, ул. П.Севака, 5/1

Ключевые слова: ротенон, модель экспериментального паркинсонизма, спинной мозг, мотонейроны, нейродегенерация

Болезнь Паркинсона (БП) – это комплексное деструктивное нейродегенеративное заболевание, которое ежегодно диагностируется у 1% населения земного шара в возрасте старше 65 лет. Невропатология БП характеризуется прогрессирующим ухудшением контроля и регуляции двигательных функций, клинически проявляющихся в виде выраженных моторных флюктуаций, таких как тремор рук и ног в состоянии покоя, мышечная скованность (ригидность), дискинезия или замедленность движений (брадикинезия, акинезия), неустойчивость положений тела и нарушение равновесия. Двигательные нарушения возникают вследствие избирательной гибели нейромеланин-содержащих дофаминергических нейронов, находящихся в области черной субстанции среднего мозга (*substantia nigra pars compacta*), и ограничения дофаминергической нейротрансмиссии в полосатом теле (*corpus striatum*), где находятся окончания дофаминергических нейронов [6]. В оставшихся поврежденных клетках обнаруживаются протеиновые включения, состоящие из скоплений фибриллярного белка α -синуклеина, названные тельцами Леви, которые являются гистопатологическим маркером БП [27].

Установлено, что подавление активности комплекса I (НАД $\cdot$ H $_2$ – дегидрогеназа-убихинон-оксиодоредуктаза) в митохондриальной дыхательной цепи может стать причиной дегенерации дофаминергических нейронов и тем самым способствовать развитию патологии БП [14, 22]. Исходя из этого, подавление активности комплекса I специфическими ингибиторами стало одним из подходов для создания экспериментальных моделей и изучения механизмов возникновения и развития БП.

Несмотря на весьма внушительное число проводимых в мире

исследований, истинные этиологические причины развития БП остаются неясными. Данные экологических наблюдений указывают на то, что токсины окружающей среды, особенно пестициды и гербициды, широко используемые в сельском хозяйстве, провоцируют симптомы паркинсонизма у людей и животных с генетической предрасположенностью к БП [30]. Ротенон ($C_{23}H_{22}O_6$), один из липофильных пестицидов из семейства изофлавоноидов, известен как специфический ингибитор переноса электронов в комплексе I дыхательной цепи митохондрий [7]. Учитывая это, ротенон стали применять при моделировании экспериментального паркинсонизма у лабораторных животных, используя их для изучения биохимических, морфологических и нейрофизиологических аспектов развития данной патологии. Систематическое введение ротенона и подавление им активности митохондриального комплекса I вызывает избирательную дегенерацию дофаминергических нейронов нигростриатума и последующее ограничение дофаминергической нейротрансмиссии в головном мозге. У лабораторных крыс линии Lewis ротенон вызывает мышечную ригидность и гипокинезию [1, 2, 24]. В оставшихся поврежденных ротеноном клетках были обнаружены α -синуклеиновые цитоплазматические включения [2].

Несмотря на определенное мнение о том, что основные симптомы БП развиваются вследствие дегенерации дофаминергических нервных клеток среднего мозга, часть ученых полагает, что некоторые отделы ЦНС, а также периферическая и автономная вегетативная нервная система активно вовлекаются в процесс патогенеза БП [4, 32]. Особенно возрастает интерес к изучению роли спинного мозга (СМ) как важнейшей составляющей двигательной системы. Соединяя верхние отделы ЦНС с органами чувств и мышцами восходящими и нисходящими нервными волокнами, являясь местом локализации многочисленных нервных и мышечных центров, СМ выполняет важную функцию проводника возбуждения, рефлекторной деятельности и рефлекторного тонуса мышц. Последние в свою очередь обуславливают координацию мышечных сокращений при ходьбе, движении конечностей и сохранении положения тела.

Изучению СМ способствуют данные лабораторных исследований, указывающие на повреждение нейронов и присутствие в них телец Леви, содержащих α -синуклеин в СМ людей, страдавших БП (*post mortem*), и А53Т мутантных мышей, экспрессирующих мутантный ген α -синуклеина [3, 11, 31]. При экспериментальном паркинсонизме у линейных мышей и крыс, вызванном действием нейротоксина 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридина (МФТП) и ротенона, также наблюдалось существенное повреждение нейронов СМ [5, 18, 19].

Исходя из вышеизложенного, мы задались целью изучить влияние ротенона на состояние нейрональных клеток шейного и поясничного отделов СМ при экспериментальном паркинсонизме у крыс линии Lewis.

Материал и методы

В работе использованы зрелые крысы линии Lewis (масса 425г). Растворенный в диметилсульфоксиде (ДМСО, 1:1) и полиэтиленгликоле (ПЭГ-300) ротенон (Sigma) вводили в концентрации 2,5 мг/кг массы животных один раз в день по соответствующей схеме (25 мг/кг в течение 21 дня, подкожно). Контрольной группе животных вводили ДМСО и ПЭГ (1:1). Животных ежедневно взвешивали и наблюдали за их физиологической активностью. Крыс декапитировали, предварительно введя кетамин (80 мг/кг). СМ отделяли на льду, погружали в замораживающую среду Histo Prep (Fisher Scientific) и хранили при температуре -70°С. Для опытов препараты оттаивали до 18 °С и на криостате Leica CM1850 получали срезы толщиной 5 мкм. Срезы фиксировали в 95% этаноле (10 мин), ополаскивали (3-5 мин) в фосфатном буфере (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 11.9 mM фосфатов, pH 7.4), затем сохраняли при 4 °С, используя в опытах в течение недели.

Метод двойного иммунофлуоресцентного окрашивания in situ

Для оценки состояния нейронов применяли метод двойного иммунофлуоресцентного окрашивания с использованием соответствующих моноклональных антител к фенотипическим маркерам: NeuN (*anti-neuronal nuclei*) использовали для маркировки нейрональных ядер и нейронов; ChAT (*anti-choline acetyltransferase*) – для маркировки двигательных нейронов (мотонейронов). Двойное окрашивание проводили в сочетании с TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase recombinant (TdT)-mediated dUTP nick-end labeling) – специфическим маркером фрагментации ДНК и гибели клеток по ранее описанному методу [19]. Иммунореактивность (ИМР) проявляли нанесением IgG антител в конъюгации с флуоресцин изотиоцианатом (FITC) или Texas Red. Далее пробы исследовали с помощью флуоресцентного микроскопа Olympus BH-2 с интегрированной фотокамерой DAGE-MTI, при увеличении в 200 раз и разрешении 1280x1024 pixel. Микрофотографии сохраняли, затем данные обрабатывали с использованием компьютерных программ Fire Image Pro Plus, NIH image 1.6 и Adobe Photoshop.

Идентификация поврежденных клеток методом TUNEL иммунофлуоресценции

Участки локализации нейронов во всех изучаемых срезах СМ определяли по характерным флуоресцентным сигналам NeuN⁺-ИМР при 4, затем 20, 40 и 200-кратном увеличении. Параллельно те же срезы исследовали на TUNEL⁺-ИМР, наличие которой указывало на

фрагментацию ДНК и повреждение клеток. Затем методом компьютерного наложения изображений были получены комбинированные микрофотографии, которые сохраняли для дальнейшего анализа. На этих микрофотографиях поврежденные клетки распознавали по специфическим участкам колокализации NeuN⁺- или ChAT⁺-ИМР с TUNEL⁺-ИМР, которые под флуоресцентным микроскопом в данном случае высвечивались желтым цветом.

Результаты и обсуждение

Для оценки состояния нейрональных клеток СМ нами были изучены срезы, полученные из шейного и грудного отделов СМ экспериментальных животных, которым вводили ротенон в течение 21 дня. Эти данные сравнивали с результатами, полученными у контрольных животных. Используя флуоресцентный микроскоп и основываясь на данных иммунофлуоресцентных сигналов, поступающих от фенотипических иммуномаркеров NeuN и ChAT, маркирующих ядра нейронов и мотонейроны соответственно, были детально изучены и сфотографированы различного типа клетки в срезах шейного и поясничного отделов СМ.

При микроскопическом исследовании срезов СМ контрольных и экспериментальных животных в обеих группах было замечено множество ядер нейрональных клеток, обладающих NeuN⁺-ИМР. Так, по морфологическому признаку были идентифицированы относительно маленькие ядра сенсорных нейронов в дорзальном роге и более крупные ядра мотонейронов в вентральном роге срезов шейного и поясничного отделов СМ (рис.1, А). Дальнейшее исследование показало, что в срезах контрольной группы животных сигналы TUNEL⁺-ИМР отсутствуют. Соответственно в комбинированных снимках участки колокализации NeuN⁺-ИМР и TUNEL⁺-ИМР не были обнаружены ни в одном из исследуемых срезов (рис.1, А, контроль). В то же время микроскопическое исследование срезов СМ экспериментальных животных, которым вводили ротенон, показало наличие значительного количества поврежденных клеток. Судя по распределению TUNEL⁺-ИМР, в срезах шейного и поясничного отделов СМ были повреждены клетки как дорсального, так и вентрального рогов. На комбинированных снимках были видны выраженные участки колокализации нейронального маркера NeuN с маркером гибели клеток TUNEL (рис.1, А, ротенон). На рис. 1, Б представлены соответствующие гистограммы, отражающие значения интенсивности флуоресценции иммунореактивности (MFI) в обеих группах животных. Согласно этим показателям, интенсивность TUNEL⁺-ИМР в дорзальном роге повышалась у экспериментальных животных по сравнению с контрольными на 90 и 87% ($p < 0.05$, $n \geq 4$), а в вентральном роге на 97 и 89% ($p < 0.05$, $n \geq 4$) в шейном и поясничном

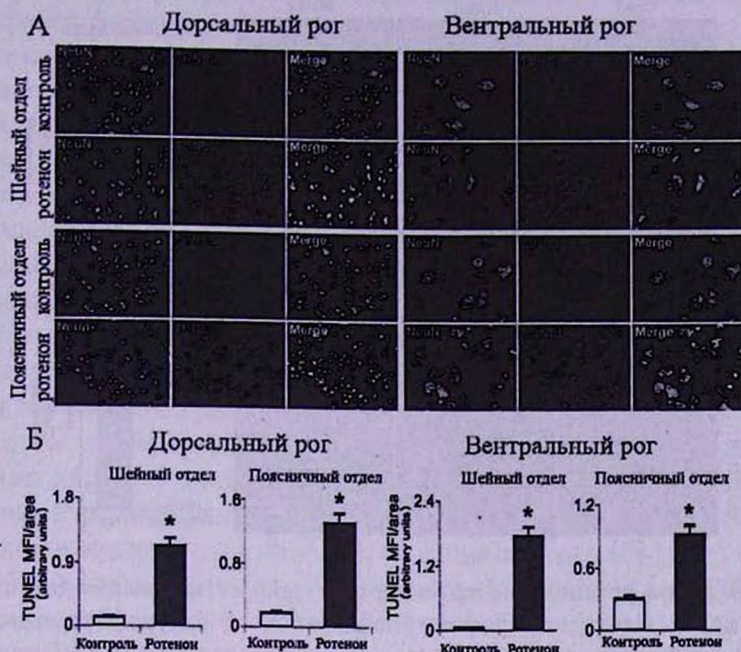


Рис. 1. Влияние ротенона на нейроны шейного и поясничного отделов спинного мозга: А – микрофотографии двойного иммунофлуоресцентного окрашивания срезов спинного мозга с использованием NeuN, маркера нейронов и их ядер в сочетании с TUNEL, маркером фрагментации ДНК и гибели клеток; X200.

Б – гистограммы значений интенсивности флуоресценции иммунореактивности (TUNEL MFI); $p < 0.05$, $n \geq 4$

отделах СМ соответственно. Полученные данные показали, что ротенон оказывает токсическое действие на нейроны как шейного, так и поясничного отделов СМ. В результате хронического токсического воздействия ротенона в течение 21 дня подавляющее большинство (около 90%) нейронов изученных отделов СМ подверглись необратимым дегенеративным изменениям. Следует заметить, что TUNEL метод, давая возможность обнаружить поврежденные клетки в различных структурах органов и тканей, не позволяет классифицировать эти клетки на некротические и/или апоптотические.

Далее, для идентификации мотонейронов, а также степени их повреждения, был использован иммуномаркер холинацетилтрансферазы ChAT в комбинации с TUNEL (рис. 2). При микроскопическом исследовании вентрального рога срезов шейного и поясничного отделов контрольных животных были видны целостные неповрежденные мотонейроны. Сигналы TUNEL⁺-ИМР, а также участки колокализации ChAT⁺-ИМР и TUNEL⁺-ИМР в этих срезах практически не были обнаружены

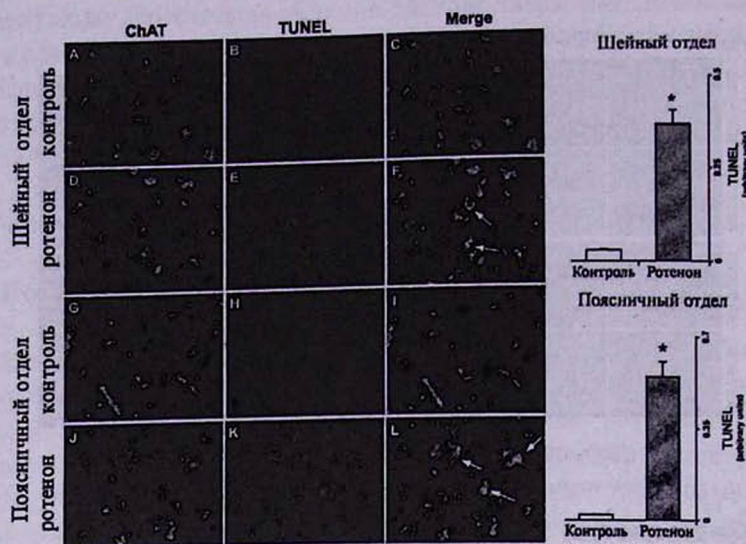


Рис. 2. Влияние ротенона на мотонейроны шейного и поясничного отделов спинного мозга. Слева – микрофотографии двойного иммунофлуоресцентного окрашивания срезов спинного мозга с использованием ChAT, маркера мотонейронов в сочетании с TUNEL, маркером фрагментации ДНК и гибели клеток; X200. Справа – гистограммы значений интенсивности флуоресценции иммунореактивности (TUNEL MFI); $p < 0.05$, $n \geq 4$.

(рис.2, A,B,C и G,H,I). Однако в срезах экспериментальных животных были замечены многочисленные участки колокализации ChAT⁺-ИМР и TUNEL⁺-ИМР, что указывало на наличие поврежденных мотонейронов в СМ животных, которым вводили ротенон (рис.2, D,E,F и J,K,L). Согласно распределению TUNEL⁺-ИМР, были повреждены мотонейроны как в срезах шейного, так и поясничного отделов СМ. На рис. 2, справа, представлены соответствующие гистограммы, отражающие значения MFI в обеих группах животных. Согласно этим показателям интенсивность TUNEL⁺-ИМР в шейном и поясничном отделах СМ повышалась у экспериментальных животных по сравнению с контрольными на 92 и 96% ($p < 0.05$, $n \geq 4$) соответственно. Эти данные демонстрируют высокую степень чувствительности мотонейронов вентрального рога к токсическому влиянию ротенона.

Таким образом, было показано, что ротенон, провоцирующий развитие идиопатической формы паркинсонизма, вызывает дегенерацию нейронов СМ при экспериментальном паркинсонизме. Важно отметить, что использованная здесь кумулятивная доза ротенона (25 мг/кг) соответствует той допустимой концентрации, которая, ингибируя активность комплекса I мозга в целом, специфически воздействует именно на дофаминергические нейроны головного мозга. В этой же серии опы-

тов наблюдалось умеренное (30-40%) снижение ИМР фенотипического маркерного фермента этих нейронов – тирозингидроксилазы в черной субстанции и полосатом теле мозга [19]. Наряду с этим, потеря массы и остановка роста у экспериментальных животных указывает на нарушение метаболизма в целом. Однако отклонений в двигательных функциях не наблюдалось, что позволяет рассматривать экспериментальных животных в состоянии пресимптоматической фазы развития паркинсонизма. Между тем, длительное введение ротенона крысам линии Lewis [2] вызывало характерные для БП двигательные расстройства, такие как гипокинезия, неустойчивое положение тела, ригидность и тремор. При этом применение агониста дофамина – апоморфина, восстанавливало двигательные функции экспериментальных животных. Следует учесть, что используемая нами концентрация ротенона составляет всего 27% дозы, используемой в составе микросфер [10], которая также вызывает характерные для БП симптомы. Кратковременное же введение ротенона в высоких дозах провоцирует системный сердечно-сосудистый токсикоз и неспецифические повреждения в мозге [8].

Механизм нейротоксического влияния ротенона в СМ можно объяснить тем, что, будучи липофильным соединением и обладая хорошей мембранной проницаемостью, это вещество проникает в СМ так же быстро, как и в головной мозг [2]. Ротенон аккумулируется в митохондриях мозга, где, нарушая перенос электронов в митохондриальной дыхательной цепи и ингибируя активность комплекса I, вызывает накопление свободных радикалов в клетках [2, 7, 29]. Вслед за этим развивается митохондриальная дисфункция и наступает состояние окислительного стресса [23, 28], изменение внутриклеточного баланса Ca^{2+} [26], уменьшение образования АТФ [9], нарушение процесса свертывания белков [15] и деполимеризация микротрубочек [16], которые впоследствии могут стать причиной серьезных повреждений нервных клеток и тканей, проявляющихся в форме апоптоза и/или некроза [13].

Обращает на себя внимание то, что, оказывая избирательно губительное воздействие на нервные клетки головного и СМ, ротенон не нарушает целостности белого вещества СМ [19]. Между тем, введение ротенона вызывает существенную активацию глиальных клеток, как астроцитов, так и олигодендроцитов [19], что, в свою очередь, указывает на возможное сопутствующее развитие воспалительного процесса при экспериментальном паркинсонизме.

Несмотря на немногочисленность, лабораторные и клинические исследования весьма убедительно указывают на важную роль СМ в патогенезе БП. Так, при экспериментальном паркинсонизме у мышей, вызванном классическим нейротоксином МФТП, наряду с избирательной гибелью дофаминергических нейронов головного мозга, наблюдалась выраженная дегенерация нейронов СМ [5, 18]. Обнаруженные в

СМ тельца Леви, характерные для БП гистологические маркеры, оказались идентичными таковым, обнаруженным в черной субстанции головного мозга [12, 20, 25]. Согласно результатам клинических исследований, формирование болевого синдрома при БП может быть связано с дегенеративными изменениями норадренергических и серотонинергических нейронов поясничного отдела СМ, ответственных за модуляцию боли и движений [17, 21].

В ходе микроскопических исследований срезов шейного и грудного отделов СМ поврежденные клетки обнаруживались как в дорсальном (90 и 87%), так и вентральном роге (97 и 89%), включая сенсорные, релейные, вставочные и двигательные нейроны. Использование иммуномаркера холинацетилтрансферазы выявило значительное повреждение мотонейронов как в шейном (92%), так и поясничном (96%) отделах СМ. В целом эти показатели указывают на высокую степень чувствительности нервных клеток СМ к губительному воздействию токсинов, вызывающих паркинсонизм.

Возможное вовлечение СМ в процесс патогенеза БП обусловлено его функциональной деятельностью. Проведение возбуждения от периферических к центральным отделам нервной системы и его рефлекторная деятельность являются основными функциями СМ. Анатомически в составе СМ проходят множественные восходящие чувствительные и нисходящие двигательные волокна, формирующие нервные тракты. Кортикоспинальный, а также руброспинальный и ретикулоспинальный тракты выполняют важную роль в организации и интеграции движений. Волокна в составе этих трактов проходят через двигательную кору, красное ядро и ядра ретикулярной формации и, в конечном счете, достигают вставочных нейронов и мотонейронов передних рогов СМ. Сложная координированная работа этих звеньев обуславливает нормальную физиологическую активность организма в целом.

Итак, СМ является местом организации общего конечного пути, где происходит интеграция рефлексов и замыкание рефлекторной дуги, что обеспечивает целостность двигательной функции организма. Следует ожидать, что специфическое повреждение структур СМ, включая нейроны и особенно мотонейроны, вызванное токсином окружающей среды ротеноном, может вызвать расстройства двигательных функций, а также спровоцировать развитие паркинсонизма или некоторых его форм, в частности БП.

Поступила 15.02.10

Ռոտենոնի ազդեցությունը ողնուղեղի նյարդային բջիջների վրա փորձարարական պարկինսոնիզմի ժամանակ Lewis գծային առնետների մոտ

Վ. Հ. Քնարյան

Ռոտենոնը հանդիսանում է միտոքոնդրիումների շնչառական շղթայի (կոմպլեքս I) դասական ինհիբիտոր, որն արգելակում է օքսիդատիվ ֆոսֆորիլացման համակարգի աշխատանքը և առաջացնում միտոքոնդրիումների ֆունկցիայի խանգարում: Ելնելով ռոտենոնի այս հատկությունից, այն օգտագործում են կենդանիների մոտ փորձարարական պարկինսոնիզմ առաջացնելու և հիվանդության նյարդաքիմիական մեխանիզմները բացահայտելու նպատակով: Տվյալ աշխատանքում ուսումնասիրվել է ռոտենոնի ազդեցությունը ողնուղեղի նյարդային բջիջների վրա՝ կիրառելով երկակի իմունաֆլուորեսցենտային նշան մեթոդը: Ցույց է տրվել, որ ռոտենոնի ներարկումից հետո վնասվում են ողնուղեղի վզային և գոտկային հատվածների նյարդային բջիջները, ինչպես առաջային, այնպես էլ հետին եղջյուրների շրջաններում: Վնասված նյարդային բջիջների մեծ մասը կազմում են շարժիչ նեյրոնները: Փորձարարական խմբի կենդանիների մոտ առողջ առնետների համեմատությամբ զգալիորեն փոփոխվում են բջիջների վնասվածքի ցուցանիշ՝ TUNEL⁺ իմունառեակտիվության ինտենսիվության արժեքները: Այսպես, TUNEL⁺ իմունառեակտիվության ինտենսիվության բարձրացումն ողնուղեղի վզային հատվածի առաջային և հետին եղջյուրներում կազմում է 90 և 87%, իսկ գոտկային հատվածում համապատասխանորեն՝ 92 և 96%:

Ստացված տվյալները ապացուցում են, որ ողնուղեղի նյարդային բջիջները և հատկապես շարժիչ նեյրոնները զգայուն են ռոտենոնի նկատմամբ: Հաշվի առնելով ողնուղեղի որոշիչ դերը շարժումների իրականացման գործընթացում՝ կարելի է ենթադրել, որ ողնուղեղի վնասումը կարող է նպաստել պարկինսոնիզմի և մասնավորապես Պարկինսոնի հիվանդության զարգացմանը:

Effect of rotenone on neuronal cells of the spinal cord at experimental parkinsonism in Lewis rats

V.H. Knaryan

The effect of rotenone on neuronal cells of the spinal cord was examined at experimental parkinsonism in Lewis rats. Exploring double immunofluorescent labeling combined with TUNEL (DNA fragmentation and cell death marker), a large number of damaged neurons were revealed in ventral and dorsal horns of cervical and lumbar sections of the spinal cord in the experimental group of animals as compared to the control. Dying neurons were identified as motoneurons with ChAT immunoreactivity. Computational analysis by NIH image 1,6 software program

showed that mean fluorescence intensity (MFI) of TUNEL⁺ immunoreactivity was increased by 90 and 87% in dorsal horn neurons, by 97 and 89% – in ventral horn neurons, and by 92 and 96% – in ventral motoneurons of cervical and lumbar sections of spinal cord respectively.

These data suggest the susceptibility of spinal neurons, and especially, motoneurons to mitochondrial complex I inhibitor and parkinsonian toxin rotenone.

It is supposed that the damaged spinal neurons and motoneurons may contribute to the development of parkinsonism, and particularly provoke Parkinson's disease.

Литература

1. Alam M., Schmidt W.J. Rotenone destroys dopaminergic neurons and induces parkinsonian symptoms in rats. *Behav. Brain Res.*, 2002, 136, p. 317-324.
2. Betarbet R., Sherer T.B., MacKenzie G., Garcia-Osuna M., Panov A.V., Greenamyre J.T. Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson's disease. *Nat. Neurosci.*, 2000, 3, p. 1301-1306.
3. Bloch A., Probst A., Bissig H., Adams H., Tolnay M. Alphasynuclein pathology of the spinal and peripheral autonomic nervous system in neurologically unimpaired elderly subjects. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.*, 2006, 32, p. 284-295.
4. Braak H., Del Tredici K., Rub U., de Vos R.A., Jansen Steur E.N., Braak E. Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiol. Aging*, 2003, 24, p. 197-211.
5. Chera B., Schaefer K.E., Rocchini A., Imam S.Z., Sribnick E.A., Ray S.K., Ali S.F., Banik N.L. Immunofluorescent labeling of increased calpain expression and neuronal death in the spinal cord of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-treated mice. *Brain Res.*, 2004, 1006, p. 150-156.
6. Damier P., Hirsch E.C., Agid Y., Graybiel A.M. The substantia nigra of the human brain. II. Patterns of loss of dopamine-containing neurons in Parkinson's disease. *Brain*, 1999, 122, p. 1437-1448.
7. DeGlia Esposti M. Inhibitors of NADH-ubiquinone reductase: an overview. *Biochim. Biophys. Acta*, 1998, 1364, p. 222-235.
8. Ferrante R.J., Schluz J.B., Kowall N.W., Beal M.F. Systemic administration of rotenone produces selective damage in the striatum and globus pallidus, but not the substantia nigra. *Brain Res.*, 1997, 753, p. 157-162.
9. Greenamyre J.T., MacKenzie G., Peng T.I., Stephens S.E. Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. *Biochem. Soc. Symp.*, 1999, 66, p. 85-97.
10. Huang J., Liu H., Gu W., Yan Z., Xu Z., Yang Y., Zhu X., Li Y. A delivery strategy for rotenone microspheres in an animal model of Parkinson's disease. *Biomaterials*, 2006, 27, p. 937-946.
11. Klos K.J., Josephs K.A., Parisi J.E., Dickson D.W. Alpha-synuclein immunohistochemistry in two cases of co-occurring idiopathic Parkinson's disease and motor neuron disease. *Mov. Disord.*, 2005, 20, p. 1515-1520.
12. Lelli S., Panizza M., Hallet M. Spinal cord inhibitory mechanisms in PD. *Neurology*, 1991, 41, p. 553-556.
13. Li N., Ragheb K., Lawler G., Sturgis J., Rajwa B., Melendez J.A., Robinson J.P. Mitochondrial complex I inhibitor rotenone induces apoptosis through enhancing mitochondrial reactive oxygen species production. *J. Biol. Chem.*, 2003, 278, p. 8516-8525.
14. Mizuno Y., Ohta S., Tanaka M., Takamiya S., Suzuki K., Sato T., Oya H., Ozawa T., Kagawa Y. Deficiencies in complex I subunits of the respiratory chain in Parkinson's disease. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1989, 163, p. 1450-1455.
15. Mytilineou C., McNaught K.S., Shashidharan P., Yabut J., Baptiste R.J., Parnandi A., Olanow C.W. Inhibition of proteasome activity sensitizes dopamine neurons to protein alterations and

- oxidative stress. *J. Neural. Transm.*, 2004, 111, p. 1237–1251.
16. Ren Y., Liu W., Jiang H., Jiang Q., Feng J. Selective vulnerability of dopaminergic neurons to microtubule depolymerization. *J. Biol. Chem.*, 2005, 280, p. 34105–34112.
17. Sage J.I., Kortis H.I., Sommer W. Evidence for the role of spinal cord systems in Parkinson's disease-associated pain. *Clin. Neuropharmacol.*, 1990, 13, p. 171–174.
18. Samantaray S., Knaryan V.H., Butler J.T., Ray S.K., Banik N.L. Spinal cord degeneration in C57BL/6N mice following induction of experimental parkinsonism with 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. *J. Neurochem.*, 2008, 104, p. 1309–1320.
19. Samantaray S., Knaryan V.H., Guyton M.K., Matzelle D.D., Ray S.K., Banik N.L. The parkinsonian neurotoxin rotenone activates calpain and caspase-3 leading to motoneuron degeneration in spinal cord of Lewis rats. *Neuroscience*, 2007, 146, p. 741–755.
20. Sandyk R., Iacono R.P. Spinal dopamine mechanisms and primary sensory symptoms in PD. *Int. J. Neurosci.*, 1987, 32, p. 927–931.
21. Scatton B., Dennis T., L'Heureux R., Monfort J.C., Duyckaerts C., Javoy-Agid F. Degeneration of noradrenergic and serotonergic but not dopaminergic neurons in the lumbar spinal cord of parkinsonian patients. *Brain Res.*, 1986, 380, p. 181–185.
22. Schapira A.H., Cooper J.M., Dexter D., Jenner P., Clark J.B., Marsden C.D. Mitochondrial complex I deficiency in Parkinson's disease. *Lancet*, 1989, 1, p. 1269.
23. Sherer T.B., Kim J.H., Betarbet R., Greenamyre J.T. Subcutaneous rotenone exposure causes highly selective dopaminergic degeneration and α -synuclein aggregation. *Exp. Neurol.*, 2003, 179, p. 9–16.
24. Sherer T.B., Betarbet R., Testa C.M., Seo B.B., Richardson J.R., Kim J.H., Miller G.W., Yagi T., Matsuno-Yagi A., Greenamyre J.T. Mechanism of toxicity in rotenone models of Parkinson's disease. *J. Neurosci.*, 2003b, 23, p. 10756–10764.
25. Sica R.E. & Sanz O.P. An electrophysiological study of the functional changes in the spinal motoneurons in Parkinson's disease. *Electromyogr. Clin. Neurophysiol.*, 1976, 16, p. 409–417.
26. Sousa S.C., Maciel E.N., Vercesi A.E., Castilho R.F. Ca^{2+} -induced oxidative stress in brain mitochondria treated with the respiratory chain inhibitor rotenone. *FEBS Lett.*, 2003 543, p. 179–183.
27. Spillantini M.G., Schmidt M.L., Lee V.M., Trojanowski J.Q., Jakes R., Goedert M. Alpha-synuclein in Lewy bodies. *Nature*, 1997, 388, p. 839–840.
28. Tada-Oikawa S., Hiraku Y., Kawanishi M., Kawanishi S. Mechanism for generation of hydrogen peroxide and change of mitochondrial membrane potential during rotenone-induced apoptosis. *Life Sci.*, 2003, 73, p. 3277–3288.
29. Talpade D.J., Greene J.G., Higgins D.S. Jr., Greenamyre J.T. In vivo labeling of mitochondrial complex I (NADH:ubiquinone oxidoreductase) in rat brain using [(3)H]dihydrorotenone. *J. Neurochem.*, 2000, 75, p. 2611–2621.
30. Uversky V.N. Neurotoxicant-induced animal models of Parkinson's disease: understanding the role of rotenone, maneb and paraquat in neurodegeneration. *Cell Tissue Res.*, 2004, 318, p. 225–241.
31. Wakabayashi K., Takahashi H. The intermediolateral nucleus and Clarke's column in Parkinson's disease. *Acta Neuropathol. (Berl.)*, 1997, 94, p. 287–289.
32. Yanagisawa N. Natural history of Parkinson's disease: From dopamine to multiple system involvement. *Parkinsonism Relat. Disord.*, 2006, 12 (Suppl. 2), p. S40–S46.