

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ
РАБОТЫ

УДК 615.015.45

**АФОБАЗОЛ ВОССТАНАВЛИВАЕТ СОДЕРЖАНИЕ ДОФАМИНА
ПРИ МОДЕЛИРОВАНИИ БОЛЕЗНИ ПАРКИНСОНА
6-ГИДРОКСИДОФАМИНОМ**

© 2019 г. М. В. Воронин¹, И. А. Кадников¹*, С. Б. Середенин¹

¹Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
“Научно-исследовательский институт фармакологии имени В.В. Закусова”, Москва, Россия

Поступила в редакцию 19.04.2018 г.

После доработки 08.06.2018 г.

Принята к публикации 18.06.2018 г.

Изучено содержание моноаминов стриатума мышей при введении афобазола в дозе 2.5 мг/кг в/б в течение 14 дней с началом курса через 30 мин после унилатерального интратриатного введения 5 мкг 6-гидроксидофамина (6-OHDA). Афобазол предотвращал падение содержания дофамина в поврежденном 6-OHDA стриатуме опытных животных и не влиял на уровень норадреналина, серотонина и его метаболита в стриатуме как контрольных, так и получавших 6-OHDA мышей.

Ключевые слова: 6-гидроксидофамин, афобазол, стриатум, моноамины

DOI: 10.1134/S1027813319010187

ВВЕДЕНИЕ

Эпидемиологические данные по болезни Паркинсона и отсутствие достаточно эффективной фармакотерапии заболевания определяют актуальность поиска новых фармакологических средств, обладающих нейропротекторным действием [1]. Значимым фактором патогенеза нейродегенеративных болезней, включая болезнь Паркинсона, рассматривается ошибочный фолдинг белков (protein misfolding disorders, conformational diseases), что обуславливает запуск сигнальных каскадов ЭПР стресса, повреждение митохондрий и избыточную генерацию активных форм кислорода (АФК) [2, 3]. Поэтому аргументированной представляется нейропротекторная стратегия, основанная на регуляции функций шаперонов [4–6].

Моделирование *in vivo* болезни Паркинсона традиционно основано на индукции избирательной гибели дофаминергических нейронов черной субстанции (*Substantia nigra*), опосредованной как минимум тремя патологическими процессами: дисфункцией митохондрий, окислительным стрессом и воспалением [4, 7–9]. Однако исследование последних лет внесли в эту триаду важный связующий компонент – нарушение фолдинга и деградации белков [5, 10].

Одним из наиболее распространенных способов моделирования болезни Паркинсона служит ретроградное токсическое воздействие 6-гидроксидофамина (6-OHDA) на нейроны черной субстанции при интратриатном введении [11–13]. Запущенный 6-OHDA окислительный стресс усиливает дофаминергическую токсичность, что способствует накоплению в полости ЭПР агрегатов белков с нарушенной конформацией [14–17]. В условиях сниженной активности энергозависимых процессов протеосомальной деградации нейроны переходят в состояние ЭПР стресса [18, 19], что вызывает универсальный клеточный ответ в виде активации специфичной сигнальной сети (UPR, unfolded protein response) [14, 15]. В адаптивной фазе ответа ингибируется трансляция и активируется экспрессия генов, отвечающих за синтез шаперонов, фолдаз, компонентов системы контроля качества и деградации незрелых белков [20]. Процессы UPR инициируются активацией белковых сенсоров ЭПР стресса (протеинкиназами IRE1 α , PERK и фактором транскрипции

Список сокращений: 5-ОИУК – 5-гидроксииндолуксусная кислота; 5-ОТ – серотонин; АТФ – аденозин трифосфат; АФК – активные формы кислорода; ГВК – гомованилиновая кислота; ГМ – головной мозг; ДА – дофамин; ДОФУК – дигидроксифенилуксусная кислота; НА – норадреналин; ЭПР – эндоплазматический ретикулум; BDNF – нейротрофический фактор мозга; DAQ – дофамин хинон; DAT – дофаминовый транспортер; DHBA – 3,4-дигидроксibenзиламин; GDNF – glial cell-derived neurotrophic factor; L-ДОФА – L-дигидроксифенилаланин; MT₃ рецептор – мелатониновый рецептор третьего типа; NO – оксид азота(II); NOS – синтаза оксида азота; NQO2 – хинон редуктаза 2; SigmaR1 – сигма-1 рецептор; TH – tyrosine hydroxylase.

* Адресат для корреспонденции: 125315 Россия, Москва, ул. Балтийская, 8; e-mail: ikadnikov@gmail.com.

ATF6) [19]. Шаперон Sigma1R, регулируя активность сенсоров ЭПР стресса, основного шаперона ЭПР BiP (Binding-immunoglobulin protein, GRP78), кальциевых каналов в области контакта ЭПР и митохондрий, играет важную роль в адаптации клеток нервной системы к стрессовым воздействиям [21, 22]. Известно, что при лигандной активации Sigma1R в составе специфических липидных доменов способен к внутриклеточному перераспределению и шаперонной активности в отношении ионных каналов, рецепторов и ферментов цитоплазматической мембраны, что оказывает защитное действие на нейроны [23, 24].

В результате ферментативного катализа и автоокисления 6-ОНДА в нейроне образуются хиноновые производные ДА (DAQ) [25], способствующие развитию окислительного стресса [4, 11]. Активация свободнорадикальных процессов инициирует системное нарушение работы митохондрий [26, 27], снижение активности и окислительную модификацию ключевых белков дофаминергической системы, что вызывает нарушение обмена и депонирования ДА, триггерное усиление продукции DAQ [25, 27–30]. Восстановление DAQ NQO2 влечет за собой возобновление цитозольного окисления ДА с образованием супероксид анион радикала [31, 32], поэтому ингибирование NQO2 может приводить к снижению продукции АФК и радикалов *o*-семихинона [33].

Настоящая работа посвящена анализу нейропротекторного действия препарата афобазол на экспериментальной модели болезни Паркинсона с интратриатным введением 6-ОНДА. Афобазол (5-этоксид-2-[2-(морфолино)-этилтио] бензимидазола дигидрохлорид) разработан и фармакологически изучен в ФГБНУ “НИИ фармакологии имени В.В. Закусова” [34]. Среди мишеней препарата установлены шаперон SigmaR1 (sigma-1 рецептор; $IC_{50} = 7.1 \times 10^{-6}$ М) и мелатонинзависимый регуляторный сайт оксидоредуктазы NQO2 (MT₃ рецептор; $IC_{50} = 9.9 \times 10^{-7}$ М) [35]. В наших предыдущих исследованиях показано, что афобазол вызывает внутриклеточное перераспределение SigmaR1 [36, 37], соответствующее агонистическому влиянию [38]. В бесклеточной системе *in vitro* выявлено ингибирующее действие афобазола на NQO2 человека [39]. В различных экспериментальных моделях установлены нейропротекторные и цитопротекторные свойства афобазола, а применение селективных лигандов позволило *in vitro* установить вклад SigmaR1 и NQO2 в реализацию его защитного действия [40–42]. SigmaR1 зависимые механизмы развития протекции систематизированы в обзоре С.Б. Середина с соавторами [43]. Таким образом, имеются теоретические и экспериментальные предпосылки для гипотезы о том, что совместная регуляция SigmaR1 и NQO2 может быть эффективной для

терапии болезни Паркинсона, об эффективности которой можно судить по восстановлению содержания дофамина нигро-стриатной области [44]. Поэтому целью настоящей работы стало изучение влияния афобазола на содержание катехоламинов стриатума головного мозга мышей на модели болезни Паркинсона, вызванной унилатеральным введением 6-ОНДА.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Реактивы. При выполнении данной работы были использованы следующие реактивы: афобазол (5-этоксид-2-[2-(морфолино)-этилтио] бензимидазола дигидрохлорид; ФГБНУ “НИИ фармакологии имени В.В. Закусова”), 6-гидроксидофамина гидрохлорид (6-ОНДА), аскорбиновая кислота, NaCl, HClO₄, сахароза (Sigma-Aldrich), хлоралгидрат (Serva), 3,4-дигидроксидбензиламин (ДНВА), дофамин (ДА), дигидроксифенилуксусная кислота (ДОФУК), норадреналин (НА), серотонин (5-ОТ), гомованилиновая кислота (ГВК), 5-гидроксииндолуксусная кислота (5-ОИУК), KН₂РO₄, Н₃РO₄, лимонная кислота, EDTA-Na₂, октансульфоновая кислота, ацетонитрил (Fluka).

Животные. В работе были использованы мыши-самцы аутбредной линии CD-1 весом 25–30 г ($n = 31$). Животные были получены из НПП Питомника лабораторных животных ФИБХ. Мышей содержали в условиях вивария (20–22°C, относительная влажность 30–70%, 12-ч световой цикл) в пластиковых клетках со свободным доступом к пище и воде по 5–7 особей.

Все процедуры с животными в исследовании были рассмотрены и утверждены комиссией Института по уходу и использованию животных (IACUC) на предмет соответствия этическим принципам обращения с животными.

Моделирование болезни Паркинсона интратриатным введением 6-ОНДА. За 30 мин до операции животное анестезировали хлоралгидратом (400 мг/кг, внутривенно). Анестезированное животное помещали в стереотаксические рамки (Stoelting Motorized Stereotaxis, Stoelting Co., Великобритания), где 6-ОНДА однократно вводили в правый стриатум в координатах $A = 0.4$; $L = 1.8$; $V = -3.5$, относительно брегмы [12]. Концентрация 6-ОНДА составляла 5 мкг на 1 мкл раствора, содержащего 0.9% NaCl и 0.02% аскорбиновой кислоты. Опытным животным вводили 1 мкл раствора 6-ОНДА со скоростью 0.5 мкл/мин гамильтоновским шприцом с иглой из нержавеющей стали (30 gauge), спустя 2 мин после инъекции иглу извлекали. Ложно-оперированным животным вводили 1 мкл контрольного раствора, содержащего 0.9% NaCl и 0.02% аскорбиновой кислоты, в тех же координатах.

Схема введения афобазола. Афобазол в дозе 2.5 мг/кг в/б и плацебо (вода для инъекций) вводили ежедневно на протяжении 14 сут с началом курса через 30 минут после интратриатной инъекции 6-ОНДА или контрольного раствора. Животные были разделены на 4 группы: ложно-оперированные, получавшие плацебо ($n = 7$); ложно-оперированные, получавшие афобазол ($n = 5$); опытные, получавшие плацебо ($n = 12$); опытные, получавшие афобазол ($n = 7$).

Метод ВЭЖХ-ЭД. Моноамины и их метаболиты определяли в поврежденном и интактном стриатумах головного мозга мышей методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с электрохимической детекцией (ВЭЖХ-ЭД). Через 14 сут после введения 6-ОНДА мышам декапитировали и извлекали головной мозг. Левый и правый стриатумы выделяли при температуре тающего льда (0–4°C) на фильтровальной бумаге, смоченной 0.32 М раствором сахарозы. Каждый выделенный стриатум замораживали в жидком азоте (–196°C), взвешивали и хранили при температуре –80°C. Для определения содержания моноаминов и их метаболитов выделенный стриатум гомогенизировали в 0.1 М HClO₄ с добавлением в качестве внутреннего стандарта DHBA в концентрации 0.25 нмоль/мл в шаровом гомогенизаторе Tissue LyserLT (Quiagen, Германия) с частотой 45 ударов в минуту в течение 5 мин. Пробы центрифугировали при 10000 g в течение 10 мин при 4°C. Надосадочную жидкость в объеме 20 мкл наносили на аналитическую колонку Kromasil C-18 4.6 × 150 (Dr. Maisch, Германия) с помощью автосемплера SIL-20 АСНТ (Shimadzu, Япония). Моноамины и их метаболиты разделяли на колонке с использованием в качестве подвижной фазы 0.1 М цитратно-фосфатного буфера, содержащего 0.3 мМ октансульфоната натрия, 0.1 мМ ЭДТА и 8% ацетонитрила (pH 3.0). Определение моноаминов и их метаболитов осуществляли на хроматографической станции Shimadzu LC-20 Prominence (Shimadzu, Япония) с использованием электрохимической ячейки ESA 5011 (E1 = –175; E2 = +250) и электрохимического детектора Coulochem III (ESA, США). Скорость потока подвижной фазы составляла 1 мл/мин. Полученные результаты обрабатывали на ПК с использованием программно-аппаратного комплекса “Мультитром 1.5” (Ampersand, Россия).

Математическая обработка экспериментальных данных. Поскольку в биодеградации дофамина и серотонина принимают участие ферменты MAO и катехол-О-метилтрансфераза (КОМТ), были использованы метаболические соотношения 5-ОИУК/5-ОТ и ДОФУК/ДА, отражающие активность MAO, и ГВК/ДА, отражающее активность КОМТ, а также результирующее (ДОФУК + ГВК)/ДА [45]. Табличные данные представлены в виде медианы (25–75 квартиль) (Mdn (q25–75)).

Данные на рисунках представлены в виде медианы (минимум – максимум) (Mdn (min-max)). Оценку статистической значимости полученных результатов проводили с применением критерия Вилкоксона и одностороннего дисперсионного анализа Краскела–Уоллиса (Kruskal–Wallis test, Dunn’s post hoc). Статистическую обработку и визуализацию полученных данных осуществляли с помощью программного пакета GraphPad 5.0.2 (GraphPad Software, San Diego California USA, (www.graphpad.com)).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Через 14 сут после однократного введения контрольного раствора в правый стриатум ложно-оперированным мышам содержание моноаминов и их метаболитов количественно соответствовало интактному левому стриатуму этих животных (табл. 1, рис. 1–3). Однократное введение 6-ОНДА в группе плацебо через аналогичный временной интервал привело к статистически значимому снижению медианы содержания ДА в поврежденном стриатуме до 35.3 нмоль/мг ткани по сравнению с поврежденным стриатумом ложно-оперированных (74.7 нмоль/мг ткани) и интактным стриатумом опытных животных (79.4 нмоль/мг ткани) (рис. 1). Содержание основных метаболитов ДА – ДОФУК и ГВК в поврежденном стриатуме опытных животных уменьшилось до 2.8 и 5.3 нмоль/мг ткани соответственно в сравнении с поврежденным стриатумом ложно-оперированных мышам (5.5 и 10.0 нмоль/мг ткани) (рис. 2, 3). Внутригрупповое сравнение с интактным стриатумом опытных животных показало, что уровень ДОФУК снизился с 5.7 до 2.8 нмоль/мг ткани, а ГВК – с 9.7 до 5.3 нмоль/мг ткани (рис. 2, 3). В то же время отмечалось увеличение метаболических соотношений ГВК/ДА на 30.1% и (ДОФУК + ГВК)/ДА на 33% (табл. 1). Таким образом, в группе плацебо однократное интратриатное введение 6-ОНДА привело к статистически значимому снижению содержания ДА и его метаболитов ДОФУК и ГВК в поврежденном стриатуме и не влияло на содержание ДА и его метаболитов в интактном стриатуме.

Однократное интратриатное введение 6-ОНДА не оказало влияния на норадренергическую и серотонинергическую систему поврежденного и интактного стриатумов (табл. 1).

ВЭЖХ исследование показало, что введение афобазола мышам в дозе 2.5 мг/кг на протяжении 14 сут приводило к двукратному увеличению медианы содержания ДА в поврежденном стриатуме опытных животных до 69.8 нмоль/мг ткани по сравнению с поврежденным стриатумом опытных животных, получавших плацебо (рис. 1). Афобазол статистически значимо восстанавливал уровень ДА до значений, зарегистрированных как в поврежденном (74.7 нмоль/мг), так и интактном стриатумах (71.3 нмоль/мг) ложно-опе-

Таблица 1. Влияние 14-дневного введения афобазола в дозе 2.5 мг/кг на содержание моноаминов и их метаболизм в интактном и поврежденном стриатуме мышей линии CD-1

Группа	Плацебо						Афобазол						
	Л.О. n = 7			6-ОНДА n = 12			Л.О. n = 5			6-ОНДА n = 7			
	И	П	И	И	П	И	И	П	И	И	П		
НА (нмоль/г ткани)	1.24 (1.12–2.56)	1.04 (0.66–1.32)	0.83 (0.31–1.25)	0.29 (0.27–1.16)	1.04 (0.85–1.31)	1.12 (0.81–1.33)	0.94 (0.56–1.98)	0.68 (0.4–1.12)	6.44 (6.14–8.72)	5.16 (4.58–5.82)	4.88 (4.36–7.38)	4.08 (2.88–5.36) @ p = 0.04	4.58 (3.36–5.48)
5-ОТ (нмоль/г ткани)	3.22 (3.06–4.26)	3.06 (2.08–3.46)	2.65 (2.2–3.21)	2.46 (1.9–2.73)	2.42 (2.08–3.03)	2.0 (1.75–2.85)	2.06 (1.36–2.48) @ p = 0.011	2.04 (1.78–2.46)	0.51 (0.39–0.57)	0.67 (0.47–0.7)	0.56 (0.39–0.58)	0.44 (0.4–0.55)	0.48 (0.43–0.65)
ДОФУК/ДА	0.078 (0.069–0.091)	0.074 (0.062–0.1)	0.076 (0.062–0.088)	0.09 (0.073–0.13)	0.056 (0.05–0.082)	0.052 (0.044–0.062)	0.072 (0.062–0.072)	0.06 (0.045–0.064) * p = 0.026	0.15 (0.13–0.15)	0.13 (0.12–0.14)	0.13 (0.11–0.15)	0.11 (0.11–0.13)	0.11 (0.09–0.12) * p = 0.025
(ДОФУК + ГВК)/ДА	0.22 (0.2–0.25)	0.22 (0.18–0.23)	0.21 (0.18–0.23)	0.28 (0.22–0.46) ^ p = 0.012	0.17 (0.14–0.25)	0.15 (0.13–0.18)	0.18 (0.17–0.21)	0.17 (0.14–0.18) ** p = 0.0027	0.22 (0.2–0.25)	0.22 (0.18–0.23)	0.21 (0.18–0.23)	0.18 (0.17–0.21)	0.17 (0.14–0.18) ** p = 0.0027

Данные представлены в виде Mdn (q25–75). n – количество животных в группе. Л.О. – ложно-оперированные животные. 6-ОНДА – опытные животные. И – интактный стриатум (левый), П – поврежденный стриатум (правый). * Статистически значимые различия по сравнению с поврежденным стриатумом опытных животных, получавших плацебо ($p < 0.05$, Kruskal–Wallis test, Dunn's post hoc). ** Статистически значимые различия по сравнению с поврежденным стриатумом опытных животных, получавших плацебо ($p < 0.01$, Kruskal–Wallis test, Dunn's post hoc). ^ Статистически значимые различия по сравнению с интактным стриатумом опытных животных, получавших плацебо ($p < 0.05$, Wilcoxon test). @ Статистически значимые различия по сравнению с интактным стриатумом ложно оперированных животных, получавших плацебо ($p < 0.05$, Kruskal–Wallis test, Dunn's post hoc).

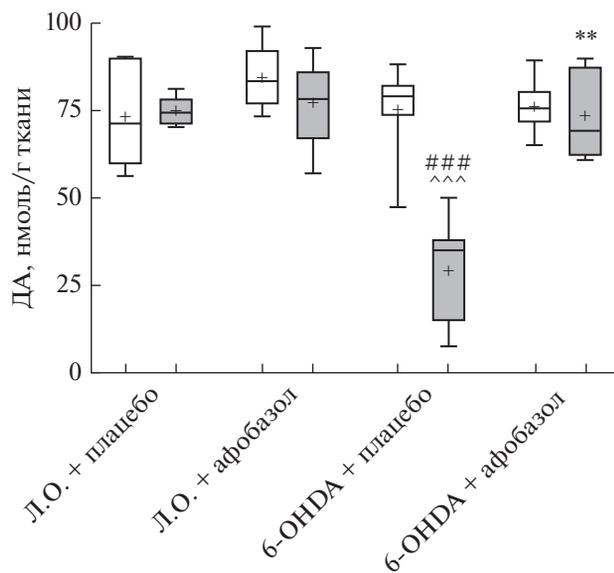


Рис. 1. Влияние 14-дневного введения афобазола в дозе 2,5 мг/кг на содержание дофамина в интактном и поврежденном 6-ОНДА стриатуме мышей линии CD-1. Данные представлены в виде Mdn (min–max). + Среднее значение. Л.О. – ложно-оперированные животные. 6-ОНДА – опытные животные. ** Статистически значимые различия по сравнению с поврежденным стриатумом опытных животных, получавших плацебо ($p < 0.01$, Kruskal–Wallis test, Dunn’s post hoc). ### Статистически значимые различия по сравнению с поврежденным стриатумом ложно-оперированных животных, получавших плацебо ($p < 0.001$, Kruskal–Wallis test, Dunn’s post hoc). ^^ Статистически значимые различия по сравнению с интактным стриатумом опытных животных, получавших плацебо ($p < 0.001$, Wilcoxon test). ○ Интактный стриатум, ● поврежденный стриатум.

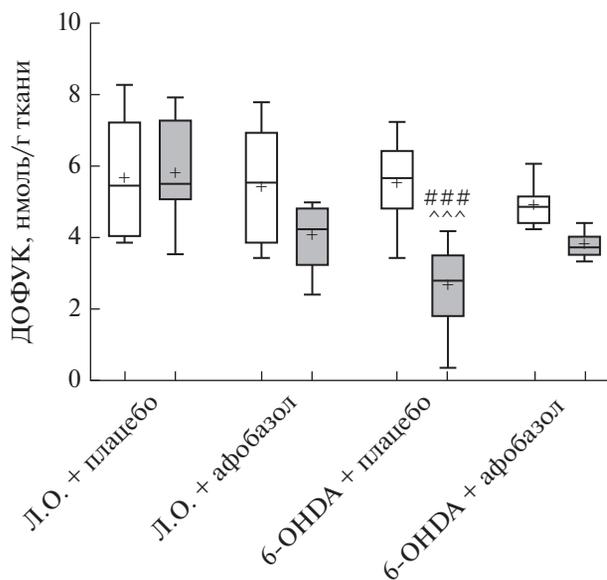


Рис. 2. Влияние 14-дневного введения афобазола в дозе 2.5 мг/кг на содержание дигидроксифенилуксусной кислоты в интактном и поврежденном 6-ОНДА стриатуме мышей линии CD-1. Обозначения как на рис. 1.

как в поврежденном, так и интактном стриатуме и его уровень не отличался от зарегистрированных значений у ложно-оперированных животных, получавших плацебо (табл. 1).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

рированных животных, получавших плацебо, таким образом обращая эффект однократного введения 6-ОНДА (рис. 1). В группе опытных животных афобазол оказывал незначительное влияние на содержание метаболитов ДА – ДОФУК и ГВК в поврежденном стриатуме, которое оставалось на уровне, определенном для опытных животных, получавших плацебо (рис. 2, 3). Сниженные значения метаболических отношений ДОФУК/ДА, ГВК/ДА и (ДОФУК + ГВК)/ДА (табл. 1) в поврежденном стриатуме опытных животных, получавших афобазол, в сравнении с группой плацебо соответствуют изменению содержания ДА и его метаболитов.

Введение афобазола опытным животным приводило к снижению содержания 5-ОТ и его метаболита 5-ОИУК в интактном стриатуме по сравнению с соответствующим стриатумом ложно-оперированных животных, получавших плацебо (табл. 1).

Введение афобазола ложно-оперированным и опытным животным не влияло на содержание НА

Зафиксированное в эксперименте снижение уровня ДА в поврежденном стриатуме опытных мышей согласуется с результатами нейрохимических исследований при моделировании болезни Паркинсона интратриатным унилатеральным введением 6-ОНДА [12, 46–48]. В работе Alvarez-Fischer, D. et al. введение 4 мкг 6-ОНДА в идентичный локус стриатума мышей приводило к значительному уменьшению содержания ДА в стриатуме и черной субстанции через 14 сут, наряду с двукратным снижением количества TH+ нейронов [12]. В том же исследовании показано, что стойкий негативный эффект однократного введения 6-ОНДА на уровень ДА стриатума развивается на третий день, и далее его содержание остается значимо сниженным в течение 56 сут [12]. В научной периодике отражены эффекты разных комбинаций доз 6-ОНДА и времени до нейрохимического исследования при моделировании болезни Паркинсона. Например, через 36 сут после введения 5 мкг 6-ОНДА содержание ДА стриатума уменьшалось приблизительно в два раза в сравнении с ложно-оперированными мышцами [47], что соответствовало кратности снижения ДА в настоящем исследовании. Однако введение 18 мкг 6-ОНДА

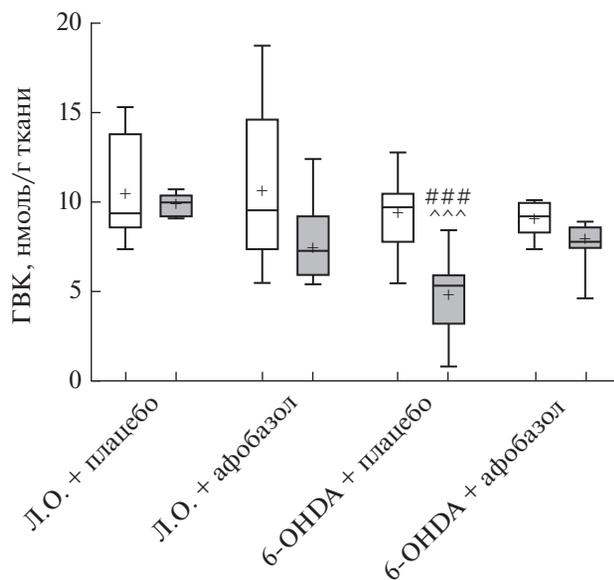


Рис. 3. Влияние 14-дневного введения афобазола в дозе 2.5 мг/кг на содержание гомованилиновой кислоты в интактном и поврежденном 6-ОНДА стриатуме мышей линии CD-1. Обозначения как на рис. 1.

приводило через 14 сут более чем к шестикратному снижению ДА стриатума, сочетавшемуся с повреждением TH+ терминалей стриатума и нейронов черной субстанции [46]. Аналогичные ответы дофаминергической системы на интрасстриатное унилатеральное введение 6-ОНДА зафиксированы на крысах. Так введение 12 и 8 мкг 6-ОНДА крысам соответственно в течение 14 и 28 сут вызывало пятикратное снижение уровня ДА в стриатуме [49, 50]. Зафиксированное в нашей работе увеличение метаболических отношений ГВК/ДА и (ДОФУК + ГВК)/ДА свидетельствует о характерном для использованной модели компенсаторном увеличении оборота ДА в период 2–4 нед после повреждения [51].

Анализ научной литературы показывает, что выявленная способность афобазола восстанавливать содержание ДА в поврежденном 6-ОНДА стриатуме мышей согласуется с нейропротекторным действием в данной модели болезни Паркинсона [46, 47, 49, 50, 52]. Соответствие увеличения содержания ДА в поврежденном 6-ОНДА стриатуме и нейропротекторной активности установлено для различных терапевтических воздействий. Повышение уровня ДА в стриатуме мышей, зафиксированное при пероральном введении хризина (5,7-dihydroxyflavone) в дозе 10 мг/кг в течение 28 дней, сопровождалось увеличением содержания нейротрофинов и количества TH+ нейронов [47]. Позитивное действие на уровень ДА и усиление окрашивания TH+ нейронов в поврежденном стриатуме крыс оказывало 14-суточное введение кофеина в дозе 10 мг/кг в/б [49] и 28-сут

введение производного имидазола (1,3-bisbenzylimidazolium bromide) в дозе 6 мг/кг в/б [50]. В условиях унилатерального повреждения стриатума мышей 6-ОНДА введение трансфицированных астроцитов, синтезирующих GDNF, увеличивало уровень ДА и плотность TH+ терминалей нейронов в стриатуме [46]. Инъекция в стриатум крыс трансформированных мезенхимальных стволовых клеток, продуцирующих нейротрофины, вызвала аналогичный эффект [52]. В приведенных публикациях был использован схожий с настоящей работой дизайн эксперимента, однако, содержание ДА не достигало уровня ложно-оперированной группы, в то время как афобазол, действуя в меньших дозах, приводил уровень ДА к контрольным значениям. Выраженное влияние препарата на содержание ДА в поврежденном стриатуме в сравнении с другими соединениями может быть объяснено с позиций мультитаргетного действия афобазола, в механизм которого включена регуляция как NQO2, так и SigmaR1 [35]. Такое сочетание может иметь следствием с одной стороны подавление патологических процессов, с другой – активацию компенсаторных и регенераторных механизмов [24, 53–55].

Гиперпродукция NQO2 положительно коррелирует с развитием идиопатической формы болезни Паркинсона [56] и болезни Альцгеймера [57], поэтому снижение активности фермента может оказывать нейропротекторное действие. Связываясь с мелатонинзависимым регуляторным сайтом NQO2 (MT₃ рецептор), афобазол ингибирует фермент [39], что препятствует двухэлектронному восстановлению DAQ в цитозоле, возобновлению цикла генерации супероксид анион-радикала и развитию окислительного стресса [33]. Ранее в модели менадионовой генотоксичности *in vitro* продемонстрирован вклад NQO2 в цитопротекторное действие афобазола, выражающееся в снижении окислительного повреждения геномной ДНК [40, 58]. Защитный эффект афобазола согласуется с нейропротекторной активностью ингибитора NQO2 NMDPEF, введение которого в черную субстанцию ГМ мышей в условиях нейродегенерации, вызванной паракватом, снижало содержание маркера перекисного окисления липидов малонового диальдегида в тканях мозга [59]. В более позднем исследовании того же авторского коллектива на модели нейродегенерации показана определяющая роль NQO2 в негативном влиянии длительного окислительного стресса на процесс аутофагии астроцитов. Снижение активности NQO2 приводило к восстановлению аутофагии [53]. Таким образом, ингибирование NQO2 афобазолом в условиях нейродегенерации, с одной стороны, может снижать продукцию АФК, предотвращая окислительную модификацию макромолекул [53], с другой – оказывать положительное влияние на компенса-

торные процессы аутофагии и активировать утилизацию белковых агрегатов и поврежденных оргanelл [60].

Увеличение содержания ДА в поврежденном стриатуме опытных животных при введении афобазола в сравнении с группой плацебо может быть обусловлено активацией шаперона SigmaR1 [61]. В экспериментах показано, что SigmaR1 включен в защитное действие афобазола, регулируя внутриклеточные процессы, имеющие важное значение для патогенеза болезни Паркинсона. В процессе нейродегенерации трансформируется специфичный паттерн кальциевых токов нейронов черной субстанции, что приводит к избыточному поступлению кальция в клетку и стимулирует развитие окислительного повреждения [62, 63]. Афобазол в экспериментах *in vitro* на модели бета-амилоидной нейротоксичности ($A\beta_{25-35}$) оказывал нейропротекторное действие, которое сопровождалось снижением концентрации внутриклеточного кальция в культуре кортикальных нейронов. В этих же исследованиях установлена способность афобазола уменьшать образование NO [41], которая позднее была подтверждена *in vivo* [64] и соответствует ингибирующему действию селективного агониста Sigma1R (+)-пентазоцина на NOS [65]. На различных моделях болезни Паркинсона показано, что увеличенный синтез NO усиливает повреждение нейронов, а ингибирование продукции NO в условиях эксайтотоксичности и повышения концентрации внутриклеточного кальция способствует выживаемости нейронов [66]. Важным фактором патогенеза болезни Паркинсона является активация микроглии с последующим высвобождением провоспалительных цитокинов и АФК [67]. Терапевтическое введение афобазола уменьшало число активированных клеток микроглии при ишемии на модели окклюзии средней мозговой артерии, наряду с увеличением их общего количества [64]. Известно, что при болезни Паркинсона снижается экспрессия гена BDNF на уровне мРНК и белка [68, 69]. Эти данные коррелируют со снижением ретроградного аксонального транспорта BDNF и ингибированием его сигнальных путей при накоплении α -синуклеина в нейронах [70]. Повышение уровня ДА в поврежденном стриатуме опытных животных при терапевтическом введении афобазола может быть следствием нейропротекторного действия препарата, в механизм которого включена SigmaR1 зависимая регуляция нейротрофинов и активация нейропластичности. Это предположение соответствует способности афобазола увеличивать содержание нейротрофинов в культуре нейронов и головном мозге мышей [71, 72], а также согласуется со стимулирующим действием агонистов SigmaR1 на секрецию BDNF в нейронах [73].

Позитивное влияние афобазола на содержание ДА в поврежденном стриатуме опытных животных схоже с действием селективного агониста SigmaR1 PRE-084, внутрибрюшинное введение которого мышам на модели болезни Паркинсона, вызванной токсическим действием 6-ОНДА, приводило к повышению числа дофаминергических волокон и уровня дофамина в денервированных областях стриатума [74]. Увеличение содержания ДА наряду с отсутствием статистически значимого изменения уровня ДОФУК и ГВК (табл. 1, рис. 1) при введении афобазола согласуется с ингибирующим действием агонистов SigmaR1 на высвобождение ДА в стриатуме [75]. Показано, что агонисты SigmaR1 вызывают изменение конформации DAT в стриатуме, приводя к повышению чувствительности к ингибиторным воздействиям [76]. Авторы исследования указывают на корреляцию полученных данных с изменением липидного микроокружения переносчика и связывают действие агонистов с активацией шаперонных функций SigmaR1 в отношении DAT.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящем исследовании при интрастриатном унилатеральном введении 6-ОНДА мышам установлено восстанавливающее влияние афобазола на содержание ДА в поврежденном стриатуме, что позволяет предположить наличие у препарата нейропротекторного действия в данной модели болезни Паркинсона. Анализ собственных данных и научной периодики показывает, что выявленный эффект может быть следствием регуляции афобазолом NQO2 и шаперона SigmaR1. Целесообразно дальнейшее изучение вклада каждой мишени препарата в нейропротекторное действие в различных моделях болезни Паркинсона.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена в рамках Госзадания и частично поддержана РФФИ, проект 13-04-01014 “Исследование роли Sigma-1 и MT_3 рецепторов в механизмах нейропротекции”.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Cacabelos R.* // Int. J. Mol. Sci. 2017. V. 18. № 3. P. E551.
2. *Moreno J.A., Tiffany-Castiglioni E.* // Neurochem. Res. 2015. V. 40. № 2. P. 329–335.
3. *Zeeshan H.M., Lee G.H., Kim H.R., Chae H.J.* // Int. J. Mol. Sci. 2016. V. 17. № 3. P. 327.
4. *Dias V., Junn E., Mouradian M.M.* // J. Parkinsons Dis. 2013. V. 3. № 4. P. 461–491.
5. *Ebrahimi-Fakhari D., Wahlster L., McLean P.J.* // J. Parkinsons Dis. 2011. V. 1. № 4. P. 299–320.

6. *Gorbatyuk M.S., Gorbatyuk O.S.* // J. Genet. Syndr. Gene Ther. 2013. V. 4. № 2. P. 128.
7. *Whitworth A.J., Pallanck L.J.* // SEB Exp. Biol. Ser. 2008. V. 60. P. 93–113.
8. *Hong J.S.* // Ann. N. Y. Acad. Sci. 2005. V. 1053. P. 151–152.
9. *Gluck M.R., Zeevalk G.D.* // J. Neurochem. 2004. V. 91. № 4. P. 788–795.
10. *Dimant H., Ebrahimi-Fakhari D., McLean P.J.* // Neuroscientist. 2012. V. 18. № 6. P. 589–601.
11. *Blum D., Torch S., Lambeng N., Nissou M., Benabid A.L., Sadoul R., Verna J.M.* // Prog. Neurobiol. 2001. V. 65. № 2. P. 135–172.
12. *Alvarez-Fischer D., Henze C., Strenzke C., Westrich J., Ferger B., Hoglinger G.U., Oertel W.H., Hartmann A.* // Exp. Neurol. 2008. V. 210. № 1. P. 182–193.
13. *Thiele S.L., Warre R., Nash J.E.* // J. Vis. Exp. 2012. № 60.
14. *Holtz W.A., Turetzky J.M., Jong Y.J., O'Malley K.L.* // J. Neurochem. 2006. V. 99. № 1. P. 54–69.
15. *Ryu E.J., Harding H.P., Angelastro J.M., Vitolo O.V., Ron D., Greene L.A.* // J. Neurosci. 2002. V. 22. № 24. P. 10690–10698.
16. *Braakman I., Hebert D.N.* // Cold Spring Harb. Perspect. Biol. 2013. V. 5. № 5. P. a013201.
17. *Peth A., Nathan J.A., Goldberg A.L.* // J. Biol. Chem. 2013. V. 288. № 40. P. 29215–29222.
18. *Mercado G., Castillo V., Vidal R., Hetz C.* // Front. Aging Neurosci. 2015. V. 7. P. 39.
19. *Mercado G., Valdes P., Hetz C.* // Trends Mol. Med. 2013. V. 19. № 3. P. 165–175.
20. *Mercado G., Castillo V., Soto P., Sidhu A.* // Brain Res. 2016. V. 1648. Pt B. P. 626–632.
21. *Hayashi T., Su T.P.* // Cell. 2007. V. 131. № 3. P. 596–610.
22. *Mori T., Hayashi T., Hayashi E., Su T.P.* // PLoS One. 2013. V. 8. № 10. P. e76941.
23. *Su T.P., Su T.C., Nakamura Y., Tsai S.Y.* // Trends Pharmacol. Sci. 2016. V. 37. № 4. P. 262–278.
24. *Ruscher K., Wieloch T.* // J. Pharmacol. Sci. 2015. V. 127. № 1. P. 30–35.
25. *LaVoie M.J., Hastings T.G.* // J. Neurosci. 1999. V. 19. № 4. P. 1484–1491.
26. *Glinka Y.Y., Youdim M.B.* // Eur. J. Pharmacol. 1995. V. 292. № 3–4. P. 329–332.
27. *Berman S.B., Hastings T.G.* // J. Neurochem. 1999. V. 73. № 3. P. 1127–1137.
28. *Kuhn D.M., Arthur R.E., Jr., Thomas D.M., Elferink L.A.* // J. Neurochem. 1999. V. 73. № 3. P. 1309–1317.
29. *Whitehead R.E., Ferrer J.V., Javitch J.A., Justice J.B.* // J. Neurochem. 2001. V. 76. № 4. P. 1242–1251.
30. *Terland O., Flatmark T., Tangeras A., Gronberg M.* // J. Mol. Cell. Cardiol. 1997. V. 29. № 6. P. 1731–1738.
31. *Vella F., Ferry G., Delagrang P., Boutin J.A.* // Biochem. Pharmacol. 2005. V. 71. № 1–2. P. 1–12.
32. *Reybiel K., Perio P., Ferry G., Bouajila J., Delagrang P., Boutin J.A., Nepveu F.* // Free Radic. Res. 2011. V. 45. № 10. P. 1184–1195.
33. *Segura-Aguilar J., Paris I., Munoz P., Ferrari E., Zecca L., Zucca F.A.* // J. Neurochem. 2014. V. 129. № 6. P. 898–915.
34. *Середенин С.Б., Воронина Т.А., Незнамов Г.Г., Бледнов Ю.А., Бадыштов Б.А., Виглинская И.В., Козловская М.М., Колотилинская Н.В., Яркова М.А., Савельев В.Л., Гарибова Т.Л., Вальдман Е.А.* // Вестник РАМН. 1998. Т. 11. С. 3–9.
35. *Середенин С.Б., Воронин М.В.* // Эксп. клин. фарм. 2009. Т. 72. № 1. С. 3–11.
36. *Seredenin S.B., Antipova T.A., Voronin M.V., Kurchashova S.Y., Kuimov A.N.* // Bull. Exp. Biol. Med. 2009. V. 148. № 1. P. 42–44.
37. *Абрамова Е.В., Воронин М.В., Середенин С.Б.* // Эксп. клин. фарм. 2017. Т. 80. № 2. С. 3–7.
38. *Hayashi T., Su T.P.* // J. Pharmacol. Exp. Ther. 2003. V. 306. № 2. P. 726–733.
39. *Kadnikov I.A., Voronin M.V., Seredenin S.B.* // Pharm. Chem. J. 2014. V. 47. № 10. P. 514–516.
40. *Voronin M.V., Kadnikov I.A.* // Pharmacol. Res. Perspect. 2016. V. 4. № 6. P. e00273.
41. *Behensky A.A., Yasny I.E., Shuster A.M., Seredenin S.B., Petrov A.V., Cuevas J.* // J. Pharmacol. Exp. Ther. 2013. V. 347. № 2. P. 468–477.
42. *Behensky A.A., Yasny I.E., Shuster A.M., Seredenin S.B., Petrov A.V., Cuevas J.* // J. Pharmacol. Exp. Ther. 2013. V. 347. № 2. P. 458–467.
43. *Середенин С.Б., Воронин М.В., Абрамова Е.В.* // Эксп. клин. фарм. 2017. Т. 80. № 9. С. 9–19.
44. *Poewe W., Seppi K., Tanner C.M., Halliday G.M., Brundin P., Volkman J., Schrag A.E., Lang A.E.* // Nat. Rev. Dis. Primers. 2017. V. 3. P. 17013.
45. *Roffler-Tarlov S., Sharman D.F., Tegerdine P.* // Br. J. Pharmacol. 1971. V. 42. № 3. P. 343–351.
46. *Cunningham L.A., Su C.* // Exp. Neurol. 2002. V. 174. № 2. P. 230–242.
47. *Goes A.T.R., Jesse C.R., Antunes M.S., Lobo Ladd F.V., Lobo Ladd A.A.B., Luchese C., Paroul N., Boeira S.P.* // Chem. Biol. Interact. 2018. V. 279. P. 111–120.
48. *Blandini F., Armentero M.T., Martignoni E.* // Parkinsonism Relat. Disord. 2008. V. 14 Suppl 2. P. S124–129.
49. *Aguiar L.M., Nobre H.V., Jr., Macedo D.S., Oliveira A.A., Freitas R.M., Vasconcelos S.M., Cunha G.M., Sousa F.C., Viana G.S.* // Pharmacol. Biochem. Behav. 2006. V. 84. № 3. P. 415–419.
50. *Chan H.H., Kumar S., Zhuo L.* // Eur. J. Pharmacol. 2013. V. 715. № 1–3. P. 405–413.
51. *Yuan H., Sarre S., Ebinger G., Michotte Y.* // Brain Res. 2004. V. 1026. № 1. P. 95–107.
52. *Sadan O., Bahat-Stromza M., Barhum Y., Levy Y.S., Pisnevsky A., Peretz H., Ilan A.B., Bulvik S., Shemesh N., Krepel D., Cohen Y., Melamed E., Offen D.* // Stem Cells Dev. 2009. V. 18. № 8. P. 1179–1190.
53. *Janda E., Lascala A., Carresi C., Parafati M., Aprigliano S., Russo V., Savoia C., Ziviani E., Musolino V., Morani F., Isidoro C., Mollace V.* // Autophagy. 2015. V. 11. № 7. P. 1063–1080.
54. *Nguyen L., Lucke-Wold B.P., Mookerjee S.A., Cavendish J.Z., Robson M.J., Scandinaro A.L., Matsumoto R.R.* // J. Pharmacol. Sci. 2015. V. 127. № 1. P. 17–29.
55. *Francardo V., Schmitz Y., Sulzer D., Cenci M.A.* // Exp. Neurol. 2017. V. 298. Pt B. P. 137–147.

56. Wang W., Le W.D., Pan T., Stringer J.L., Jaiswal A.K. // *J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.* 2008. V. 63. № 2. P. 127–134.
57. Hashimoto T., Nakai M. // *Neurosci. Lett.* 2011. V. 502. № 1. P. 10–12.
58. Kadnikov I.A., Voronin M.V., Seredenin S.B. // *Bull. Exp. Biol. Med.* 2015. V. 159. № 1. P. 44–47.
59. Janda E., Parafati M., Aprigliano S., Carresi C., Visalli V., Sacco I., Ventrice D., Mega T., Vadala N., Rinaldi S., Musolino V., Palma E., Grateri S., Rotiroli D., Mollace V. // *Br. J. Pharmacol.* 2013. V. 168. № 1. P. 46–59.
60. Ji C.H., Kwon Y.T. // *Mol. Cells.* 2017. V. 40. № 7. P. 441–449.
61. Francardo V. // *Neural Regen. Res.* 2014. V. 9. № 21. P. 1882–1883.
62. Surmeier D.J., Schumacker P.T., Guzman J.D., Ilijic E., Yang B., Zampese E. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2017. V. 483. № 4. P. 1013–1019.
63. Lautenschlager J., Stephens A.D., Fusco G., Strohl F., Curry N., Zacharopoulou M., Michel C.H., Laine R., Nespovityaya N., Fantham M., Pinotsi D., Zago W., Fraser P., Tandon A., St George-Hyslop P., Rees E., Phillips J.J., De Simone A., Kaminski C.F., Schierle G.S.K. // *Nat. Commun.* 2018. V. 9. № 1. P. 712.
64. Katnik C., Garcia A., Behensky A.A., Yasny I.E., Shuster A.M., Seredenin S.B., Petrov A.V., Cuevas J. // *J. Neurochem.* 2016. V. 139. № 3. P. 497–509.
65. Vagnerova K., Hurn P.D., Bhardwaj A., Kirsch J.R. // *Anesth. Analg.* 2006. V. 103. № 2. P. 430–434.
66. Zhang L., Dawson V.L., Dawson T.M. // *Pharmacol. Ther.* 2006. V. 109. № 1–2. P. 33–41.
67. Subramaniam S.R., Federoff H.J. // *Front. Aging Neurosci.* 2017. V. 9. P. 176.
68. Parain K., Murer M.G., Yan Q., Faucheux B., Agid Y., Hirsch E., Raisman-Vozari R. // *Neuroreport.* 1999. V. 10. № 3. P. 557–561.
69. Howells D.W., Porritt M.J., Wong J.Y., Batchelor P.E., Kalnins R., Hughes A.J., Donnan G.A. // *Exp. Neurol.* 2000. V. 166. № 1. P. 127–135.
70. Fang F., Yang W., Florio J.B., Rockenstein E., Spencer B., Orain X.M., Dong S.X., Li H., Chen X., Sung K., Rissman R.A., Masliah E., Ding J., Wu C. // *Sci. Rep.* 2017. V. 7. № 1. P. 3868.
71. Середенин С.Б., Мелкумян Д.С., Вальдман Е.А., Яркова М.А., Середенина Т.С., Воронин М.В., Лапцкая А.С. // *Эксп. клин. фарм.* 2006. V. 69. № 3. P. 3–6.
72. Антипова Т.А., Сапожникова Д.С., Бахтина Л.Ю., Середенин С.Б. // *Эксп. клин. фарм.* 2009. V. 72. № 1. P. 12–14.
73. Fujimoto M., Hayashi T., Urfer R., Mita S., Su T.P. // *Synapse.* 2012. V. 66. № 7. P. 630–639.
74. Francardo V., Bez F., Wieloch T., Nissbrandt H., Ruscher K., Cenci M.A. // *Brain.* 2014. V. 137. Pt 7. P. 1998–2014.
75. Gonzalez-Alvear G.M., Werling L.L. // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1994. V. 271. № 1. P. 212–219.
76. Hong W.C., Yano H., Hiranita T., Chin F.T., McCurdy C.R., Su T.P., Amara S.G., Katz J.L. // *J. Biol. Chem.* 2017. V. 292. № 27. P. 11250–11261.

Afobazol Restores the Dopamine Level in a 6-Hydroxydopamine Model of Parkinson's Disease

M. V. Voronin^a, I. A. Kadnikov^a, and S. B. Seredenin^a

^a*Zakusov Research Institute of Pharmacology, Moscow, Russia*

In this study, 5 µg of 6-hydroxydopamine (6-OHDA) were injected unilaterally into the striatum of mice. The mice were then treated intraperitoneally with afobazol at a dose of 2.5 mg/kg for 14 days starting 30 min after the 6-OHDA injection. The content of monoamines was studied in the striatum of the mice. Afobazol prevented decrease in the dopamine level in the 6-OHDA-damaged striatum of the experimental animals and did not affect the contents of norepinephrine, serotonin or its metabolites in the striatum of both control and 6-OHDA-treated mice.

Keywords: 6-hydroxydopamine, afobazol, striatum, monoamines