

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ
РАБОТЫ

УДК 615.015.45

АНАЛИЗ РОЛИ ХИНОНРЕДУКТАЗЫ 2 В МЕХАНИЗМЕ
ПРОТИВОПАРКИНСОНИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ АФОБАЗОЛА

© 2020 г. И. А. Кадников^{1, *}, Д. Н. Воронков², М. В. Воронин¹, С. Б. Середенин¹

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

²Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
“Научный центр неврологии”, Москва, Россия

Поступила в редакцию 21.06.2019 г.

После доработки 15.07.2019 г.

Принята к публикации 30.07.2019 г.

На экспериментальной модели болезни Паркинсона изучено содержание дофамина в стриатуме, плотность TH+ нейронов в черной субстанции и двигательная активность мышей при введении препарата афобазол, взаимодействующего с Sigma-1 и MT₁ рецепторами, а также регуляторными сайтами MAO A и хинонредуктазы 2 (NQO2, MT₃ рецептор), и его основного метаболита М-11, селективно взаимодействующего лишь с регуляторным сайтом NQO2. Препараты вводили внутривентрикулярно в течение 14 дней с началом курса через 30 мин после унилатерального интратриатного введения 5 мкг 6-гидроксидофамина (6-ОНДА). Афобазол и М-11 проявляли нейропротекторные свойства. Во всех экспериментах эффективная доза афобазола (2.5 мг/кг) оказалась значимо ниже в сравнении с М-11 (7.5 мг/кг). В использованной экспериментальной модели показан вклад NQO2 в противопаркинсоническое действие афобазола наряду с другими мишенями препарата.

Ключевые слова: 6-гидроксидофамин, афобазол, основной метаболит афобазола М-11, хинонредуктаза 2, стриатум, дофамин, черная субстанция, тирозингидроксилаза, вращающийся стержень

DOI: 10.31857/S1027813320010112

Список сокращений

- АФК – активные формы кислорода
ГВК – гомованилиновая кислота
ДА – дофамин
ДОФУК – дигидроксифенилуксуная кислота
М-11 – 2-[2-(3-оксоморфолин-4-ил)-этил-тио]-5-этоксibenзимидазола гидрохлорид
6-ОНДА – 6-гидроксидофамин
DAP1 – 4',6-диамидино-2-фенилиндол
DAQ – дофамин-хинон
ДНВА – 3,4-дигидроксibenзиламин
MT₃ рецептор – мелатониновый рецептор третьего типа
NQO2 – хинонредуктаза 2
Sigma1R – сигма-1 рецептор
SNc – компактная часть черной субстанции
TH – тирозингидроксилаза

ВВЕДЕНИЕ

Болезнь Паркинсона – распространенное нейродегенеративное заболевание, клинически проявляющееся брадикинезией, тремором в покое, мышечной ригидностью и постуральной неустойчивостью. Симптомы болезни Паркинсона обусловлены гибелью дофаминергических нейронов компактной части черной субстанции (*Substantia nigra pars compacta*, SNc) и их терминалей в стриатуме. К настоящему времени не существует эффективных способов медикаментозной терапии заболевания [1]. Поэтому чрезвычайно актуален поиск новых фармакологических мишеней, регуляция которых способна обеспечить защиту и восстановление функциональной активности нейронов nigростриатного пути.

Морфологические и нейрохимические особенности нейронов SNc обуславливают их восприимчивость к повреждающим влияниям как в наследственных, так и идиопатической формах болезни Паркинсона [2–5]. Основными механизмами повреждения нейронов хинонными производными дофамина (DAQ) считаются ковалентное связывание со свободным цистеином и тиольными группами белков [6], усиление продукции АФК в окисли-

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

тельно-восстановительных циклах [7], образование DA аддуктов с ДНК [8, 9]. В нейронах SNc дофамин (ДА) способен автоокисляться с образованием DAQ и АФК [10]. Поэтому важная роль в процессе повреждения клетки DAQ принадлежит хинонредуктазе 2 (NQO2, EC 1.10.5.1). Этот флавопротеин экспрессируется в головном мозге и обладает способностью восстанавливать хинонные производные катехоламинов с образованием их нестабильных хинольных форм и усиливать образование АФК [11–13]. Фермент обладает регуляторным сайтом, тождественным мелатониновому рецептору третьего типа (MT₃) [14]. У пациентов с болезнью Паркинсона чаще встречается мутантный вариант гена NQO2 с высокой экспрессией фермента, что согласуется с усилением продукции АФК в условиях *in vitro* [15]. Одним из доноров электронов для NQO2 служит N-метилдигидроникотинамид (N-methyldihydronicotinamide) [16]. У больных обнаружено повышение уровня фермента никотинамид N-метилтрансферазы, синтезирующего окисленную форму кофактора (N-methylnicotinamide) [17, 18]. Не исключено, что NQO2 может действовать и как флавиновый переключатель (flavin redox switch), который в зависимости от наличия в клетке субстратов фермента и окислительно-восстановительного потенциала FAD меняет конформацию, приобретает способность вступать во взаимодействие с различными низкомолекулярными веществами и влиять на активность белков [19–21]. Известно, что дофамин способствует активации белка p53 и развитию апоптоза нейронов [22], тогда как ингибиторы p53 оказывают защитное действие на дофаминергические нейроны [23, 24]. Эти соединения нормализуют двигательную активность при моделировании болезни Паркинсона [23]. Показано, что при угнетении митохондриального дыхания NQO2 способен к перемещению в ядро, где стабилизирует и активирует p53. Применение shRNA или ингибитора NQO2 препятствует стабилизации p53 [25]. Литературные данные указывают на нейропротекторную активность лигандов MT₃ рецептора, ингибирующих фермент [26, 27].

В ФГБНУ “НИИ фармакологии им. В.В. Закусова” разработан анксиолитик афобазол (5-этоксидигидрохлорид) [28]. Установлены лигандные свойства препарата к MT₃ рецептору ($K_i = 9.7E-7$ M) [29] и его способность ингибировать NQO2 [30]. Другими мишенями афобазола являются шаперон Sigma1R ($K_i = 5.9E-6$ M), регуляторный сайт MAO-A ($K_i = 3.6E-6$ M), мелатониновый рецептор MT₁ ($K_i = 1.6E-5$ M) [29]. В экспериментах *in vitro* и *in vivo* установлена нейропротекторная активность афобазола [31–33]. При моделировании болезни Паркинсона введением 6-ОНДА афобазол препят-

ствовал снижению уровня ДА в стриатуме опытных мышей [34]. Однако при мультитаргетных взаимодействиях препарата вклад NQO2 в противопаркинсонический эффект остаётся неизвестным. В наших исследованиях найден удобный инструмент для анализа участия NQO2 в фармакодинамике афобазола. Оказалось, что основным метаболитом афобазола является соединение 2-[2-(3-оксоморфолин-4-ил)-этилтио]-5-этоксидигидрохлорид (M-11) [35] среди молекулярных мишеней афобазола взаимодействует лишь с MT₃ рецептором ($K_i = 3.9E-7$ M) [29]. M-11 ингибирует фермент в сопоставимых с афобазолом концентрациях [36]. Таким образом, анализ различий в эффектах афобазола и M-11 позволит оценить вклад NQO2 в эффекты исходного соединения. Поэтому целью настоящей работы стало сравнительное изучение действия афобазола и его метаболита M-11 при моделировании болезни Паркинсона интрастриатным введением 6-ОНДА.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Реактивы. В работе использованы следующие реактивы: 5-этоксидигидрохлорид (афобазол) и его основной метаболит 2-[2-(3-оксоморфолин-4-ил)-этилтио]-5-этоксидигидрохлорид (M-11) (ФГБНУ “НИИ фармакологии имени В.В. Закусова”, Россия), аскорбиновая кислота, NaCl, HClO₄, сахароза, формальдегид, поликлональные антитела к тирозингидроксилазе T8700, вторичные антитела, конъюгированные с флуорохромом CF488 SAB4600045, 4',6-диамидино-2-фенилиндол (DAPI), среда FluoroShield (Sigma-Aldrich, США), Тритон-X100 (Amresco, США) хлоралгидрат (Serva, Германия), 3,4-дигидроксибензиламин (ДНВА), дофамин (ДА), дигидросифенилуксусная кислота (ДОФУК), гомованилиновая кислота (ГВК), K₂HPO₄, H₃PO₄, лимонная кислота, EDTA-Na₂, октансульфоновая кислота, ацетонитрил (Fluka, США), среда Tissue Tek O.C.T (Fisher Scientific, США).

Животные. Эксперименты выполнены на мышьях-самцах аутбредной линии ICR (CD-1) массой 25–30 г ($n = 74$), полученных из НПП Питомника лабораторных животных ФИБХ. Мышей содержали в условиях вивария (20–22°C, относительная влажность 30–70%, 12-ти часовой световой цикл) по 5–10 особей в пластиковых клетках со свободным доступом к пище и воде. Согласно решению комиссии ФГБНУ “НИИ фармакологии им. В.В. Закусова” по биоэтике все процедуры в исследовании соответствовали этическим принципам обращения с животными.

Моделирование болезни Паркинсона интрастриатным введением 6-ОНДА. За 30 мин до операции животное анестезировали хлоралгидра-

том (400 мг/кг, внутрибрюшинно) и помещали в стереотаксические рамки (Stoelting Motorized Stereotaxis, Stoelting Co., Великобритания), где опытным животным однократно вводили 6-ОНДА в правый стриатум в координатах $A = 0.4$; $L = 1.8$; $V = -3.5$, относительно брегмы [37]. 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), иглу извлекали через 2 мин после окончания инъекции. Ложнооперированным животным вводили 1 мкл контрольного раствора, содержащего 0.9% NaCl и 0.02% аскорбиновой кислоты, в тех же стереотаксических координатах.

Схема введения препаратов. Афобазол в дозе 2.5 мг/кг, М-11 в дозах 2.5 и 7.5 мг/кг и плацебо (вода для инъекций) вводили в/б ежедневно на протяжении 14 сут с началом курса через 30 мин после интратриатной инъекции 6-ОНДА или контрольного раствора. Растворы препаратов вводили из расчета 0.1 мл на 10 г массы животного. Животные были разделены на 5 экспериментальных групп: ложнооперированные, получавшие плацебо ($n = 14$); опытные, получавшие плацебо ($n = 16$); опытные, получавшие афобазол ($n = 14$); опытные, получавшие М-11 в дозе 2.5 мг/кг ($n = 15$) и опытные, получавшие М-11 в дозе 7.5 мг/кг ($n = 15$).

Тест “вращающийся стержень”. Исследование двигательной активности мышей линии ICR (CD-1) в тесте “вращающийся стержень” проводили на экспериментальной установке Rota-rod/RS LE 8500 (диаметр стержня 3.2 см) (Panlab/Harvard Apparatus). Для адаптации мышей в установке и исключения из исследования малоподвижных животных в эксперимент включены две обучающие сессии. Первую обучающую сессию проводили на 12 сут после введения 6-ОНДА. Каждое животное дважды помещалось в экспериментальную установку при скорости вращения стержня 4 об./мин с перерывом не менее 60 мин. Вторую обучающую сессию проводили на 13 сутки после введения 6-ОНДА при скорости вращения стержня 10 об./мин. Манипуляции с животными были аналогичны первой обучающей сессии. Животные, находившиеся на вращающемся стержне менее минуты в одной из обучающих сессий, исключались из эксперимента [38].

На 14 сут после введения 6-ОНДА исследовали способность мышей удерживаться в тесте при постоянной и увеличивающейся скоростях вращения стержня. Для этого экспериментальное животное помещали на вращающийся стержень с постоянной скоростью 20 об./мин и засекали время до падения животного со стержня на платфор-

му. Во втором варианте теста экспериментальное животное помещали на стержень, вращающийся с начальной скоростью 4 об./мин и замеряли время до падения на платформу. Максимальное число оборотов (40 об./мин) [39] достигалось за 5 мин. Каждое животное проходило оба варианта теста по 3 раза с перерывом 30 мин между попытками. Замер времени прекращали после 120 с удерживания животного на стержне при фиксированной скорости вращения и 180 с при возрастающей. Для статистической обработки данных каждого варианта теста отбиралось максимальное время удерживания из трех попыток. Двигательная активность в тесте определена для 5 экспериментальных групп: ложнооперированные, получавшие плацебо ($n = 7$); опытные, получавшие плацебо ($n = 9$); опытные, получавшие афобазол ($n = 9$); опытные, получавшие М-11 в дозе 2.5 мг/кг ($n = 10$) и опытные, получавшие М-11 в дозе 7.5 мг/кг ($n = 10$).

Метод ВЭЖХ-ЭД. ДА и его 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 мышей 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 3,4-дигидоксибензиламина (ДНВА) 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 (рН 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 “Мультихром 1.5” (Ampersand, Россия).

Анализ моноаминов в стриатумах проводили в 5 экспериментальных группах: ложнооперированные, получавшие плацебо ($n = 14$); опытные, получавшие плацебо ($n = 16$); опытные, получавшие афобазол ($n = 14$); опытные, получавшие М-11 в дозе 2.5 мг/кг ($n = 15$) и опытные, получавшие М-11 в дозе 7.5 мг/кг ($n = 15$).

Иммуногистохимический анализ. Через 14 сут после введения 6-ОНДА мышью декапитировали и извлекали головной мозг. Мозг животных фиксировали в 4% формалине, приготовленном на фосфатном солевом буфере (PBS, pH 7.2–7.4) 24 ч. Образцы выдерживали в 30% растворе сахарозы, и заливали средой Tissue Tek O.C.T. после чего на замораживающем микротоме Sakura Tissue Tek Cryo3 готовили серию фронтальных срезов среднего мозга, толщиной 12 мкм в области черной субстанции. Срезы перед окрашиванием подвергали процедуре тепловой демаскировки антигена в микроволновой печи (0.1 М цитратный буфер, pH 6.0, 600 W, 5 мин), после остывания их выдерживали в PBS с 0.1% Тритон X-100 в течение часа. Для выявления дофаминовых нейронов черной субстанции срезы инкубировали 16 ч с кроличьими поликлональными антителами к тирозингидроксилазе (TH, Sigma, T8700), в разведении 1 : 500. Связывание иммуноглобулинов кролика визуализировали при помощи антител козы, конъюгированных с флуорохромом CF488 (Sigma) [40]. Ядра клеток подкрашивали с помощью DAPI. Срезы заключали в среду FluoroShield под покровные стекла и исследовали под флуоресцентным микроскопом Nikon Eclipse, с соответствующим набором фильтров. Изображения получали при помощи цифровой камеры Nikon DS-Qi.

В программе ImageJ (NIH), подсчитывали плотность TH-позитивных (TH+) нейронов с ядрами, попадающими в плоскость среза, при увеличении объектива $\times 40$. Подсчет проводили на 3–6 срезах с каждого животного, взятых на разных уровнях черной субстанции (в роstralном, медиальном, каудальном отделах). На каждом срезе на ипси- и контралатеральной сторонах относительно введения 6-ОНДА клетки подсчитывали в 5–7 полях зрения (площадью 0.044 мм²). Полученные данные усредняли для каждого животного. Изменения плотности нейронов в черной субстанции на стороне повреждения выражали в процентах, относительно противоположного полушария. Содержания TH определяли в группах ложнооперированных животных ($n = 6$) и опытных животных, получавших плацебо ($n = 7$), афобазол ($n = 9$) опытные, получавшие М-11 в дозе 2.5 мг/кг ($n = 6$) и опытные, получавшие М-11 в дозе 7.5 мг/кг ($n = 8$).

Статистическая обработка экспериментальных данных. Соответствие полученных данных нормальному распределению проверяли критериями

Д'Агостино–Пирсона и Шапиро–Уилка. Так как распределение данных содержания ДА, его метаболитов и времени удерживания мышью на вращающемся стержне в значительной части выборок отличалось от нормального, то для дальнейшей обработки использовали методы непараметрической статистики. Оценку статистической значимости различий проводили с применением знако-рангового критерия Вилкоксона и непараметрического аналога дисперсионного анализа по Краскелу–Уоллису с обработкой методом множественных сравнений по Данну (Kruskal–Wallis test, Dunn's post hoc). Оценку статистической значимости различий плотности TH+ нейронов проводили с применением однофакторного дисперсионного анализа с обработкой методом множественных сравнений по Холм–Сидак. Табличные данные представлены в виде медиан и нижнего и верхнего квартилей (Mdn (q25–75)). Данные на гистограммах представлены в виде медиан (минимум–максимум) (Mdn (min–max) с указанием среднего значения. Статистическая обработка и визуализация полученных данных осуществлялись с помощью программного пакета GraphPad Prism 8.0.1 (GraphPad Software, San Diego California USA (www.graphpad.com)).

РЕЗУЛЬТАТЫ

На 14-е сут после инъекции 6-ОНДА в правый стриатум мышью ICR, получавших плацебо, зарегистрировано более чем двукратное снижение уровня ДА по сравнению с их интактным стриатумом и поврежденным стриатумом ложнооперированных мышью (рис. 1). Внутривентрикулярное введение афобазола в дозе 2.5 мг/кг на протяжении 14-ти дней с началом курса через 30 мин после интратриатного введения 6-ОНДА статистически значимо повышало уровень ДА в поврежденном стриатуме опытных мышью и восстанавливало его содержание до значений, зафиксированных у ложнооперированных животных (рис. 1). Хроническое введение М-11 в дозе 2.5 мг/кг не изменяло содержания ДА в поврежденном стриатуме опытных животных (рис. 1). Однако увеличение дозы М-11 до 7.5 мг/кг вызывало увеличение уровня ДА в поврежденном стриатуме, аналогично действию афобазола. Афобазол и М-11 в обеих дозах не влияли на уровень ДА в интактном стриатуме опытных мышью в сравнении с контрольными значениями (рис. 1).

Снижение уровня ДОФУК в поврежденном стриатуме опытных животных соответствует уменьшению содержания ДА в данной экспериментальной группе (рис. 2). Несмотря на восстанавливающее влияние афобазола на ДА в группе опытных животных, содержание ДОФУК в поврежденном стриатуме сохранилось на более низком уровне в сравнении с ложнооперированными

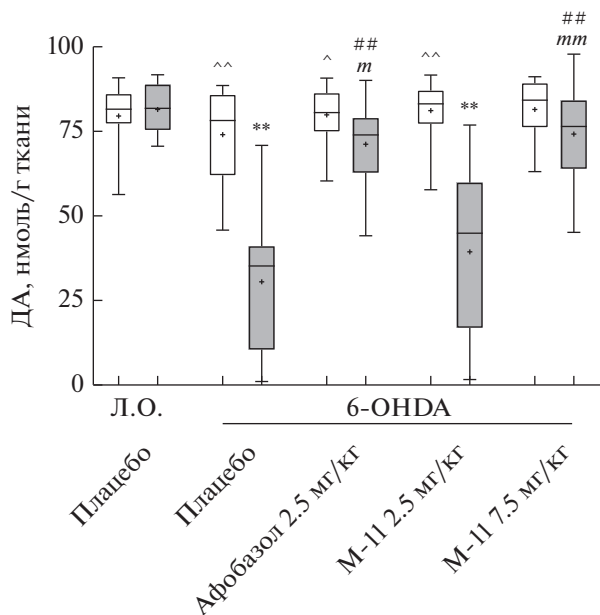


Рис. 1. Действие афобазола и М-11 на содержание дофамина в стриатуме мышей при моделировании болезни Паркинсона. Примечания. Данные представлены в виде Mdn (min–max). “+” – среднее значение. Л.О. – ложнопериоперированные животные. 6-OHDA – опытные животные. □ – интактный стриатум, ■ – поврежденный стриатум. Kruskal–Wallis test, Dunn’s post hoc: ** $p < 0.01$ – статистически значимые различия по сравнению с поврежденным стриатумом ложнопериоперированных животных, получавших плацебо. ## $p < 0.01$ – статистически значимые различия по сравнению с поврежденным стриатумом опытных животных, получавших плацебо. ^m $p < 0.05$, ^{mm} $p < 0.01$ – статистически значимые различия по сравнению с поврежденным стриатумом опытных животных получавших М-11 в дозе 2.5 мг/кг. Wilcoxon test: [^] $p < 0.05$, ^{^^} $p < 0.01$ – статистически значимые различия по сравнению с поврежденным стриатумом в отдельной экспериментальной группе.

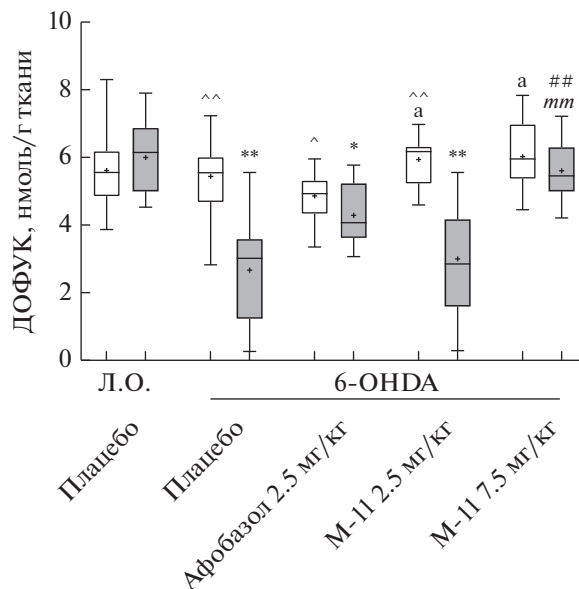


Рис. 2. Действие афобазола и М-11 на содержание ДОФУК в стриатуме мышей при моделировании болезни Паркинсона. Примечания. Данные представлены в виде Mdn (min–max). “+” – среднее значение. Л.О. – ложнопериоперированные животные. 6-OHDA – опытные животные. □ – интактный стриатум, ■ – поврежденный стриатум. Kruskal–Wallis test, Dunn’s post hoc: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ – статистически значимые различия по сравнению с поврежденным стриатумом ложнопериоперированных животных, получавших плацебо. ## $p < 0.01$ – статистически значимые различия по сравнению с поврежденным стриатумом опытных животных, получавших плацебо. ^{mm} $p < 0.01$ – статистически значимые различия по сравнению с поврежденным стриатумом опытных животных получавших М-11 в дозе 2.5 мг/кг. ^a $p < 0.05$ – статистически значимые различия по сравнению с интактным стриатумом опытных животных получавших афобазол в дозе 2.5 мг/кг. Wilcoxon test: [^] $p < 0.05$, ^{^^} $p < 0.01$ – статистически значимые различия по сравнению с поврежденным стриатумом в отдельной экспериментальной группе.

животными (рис. 2). Количество ДОФУК в интактном стриатуме животных, получавших афобазол, также оказалось значимо ниже по сравнению с интактным стриатумом животных, получавших М-11 в обеих дозах (рис. 2). Соединение М-11 в дозе 2.5 мг/кг не оказывало влияния на уровень ДОФУК в поврежденном 6-OHDA стриатуме. В дозе 7.5 мг/кг метаболит М-11 вызывал повышение уровня ДОФУК до контрольных значений (рис. 2).

Уровень ГВК в поврежденном стриатуме опытных животных, получавших плацебо, понижался по сравнению с контралатеральным стриатумом и поврежденным стриатумом ложнопериоперированных животных (рис. 3). Соединение М-11 в дозе 2.5 мг/кг не влияло на уровень ГВК (рис. 3). Афобазол в дозе 2.5 мг/кг и М-11 в дозе 7.5 мг/кг статистически значимо повышали содержание ГВК в поврежденном стриатуме по сравнению с

группой плацебо, которое, однако, не достигало уровня контралатерального стриатума (рис. 3). В отличие от М-11 в дозе 7.5 мг/кг действие афобазола и М-11 в дозе 2.5 мг/кг статистически значимо не различались.

Через 14 сут после введения 6-OHDA наряду с падением уровня ДА в стриатуме зафиксировано уменьшение плотности TH+ нейронов в ипсилатеральной SNc (рис. 4) и почти двукратное снижение их количества относительно контралатеральной стороны (рис. 5). Афобазол в дозе 2.5 мг/кг статистически значимо увеличивал плотность и относительное количество TH+ нейронов в ипсилатеральной SNc (рис. 4, 5). Соединение М-11 в дозе 2.5 мг/кг не влияло на количество TH+ нейронов в SNc опытных мышей. При увеличении дозы М-11 до 7.5 мг/кг метаболит ста-

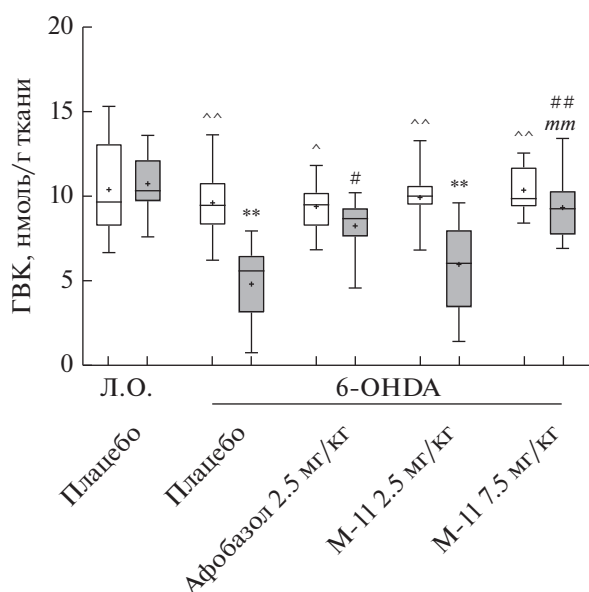


Рис. 3. Действие афобазола и М-11 на содержание ГВК в стриатуме мышей при моделировании болезни Паркинсона. Примечания. Данные представлены в виде Mdn (min–max). “+” – среднее значение. Л.О. – ложнооперированные животные. 6-ОНДА – опытные животные. □ – интактный стриатум, ■ – поврежденный стриатум. Kruskal–Wallis test, Dunn’s post hoc: ** $p < 0.01$ – статистически значимые различия по сравнению с поврежденным стриатумом ложнооперированных животных, получавших плацебо. # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ – статистически значимые различия по сравнению с поврежденным стриатумом опытных животных, получавших плацебо. ^{mm} $p < 0.01$ – статистически значимые различия по сравнению с поврежденным стриатумом опытных животных получавших М-11 в дозе 2.5 мг/кг. Wilcoxon test: ^ $p < 0.05$, ^^ $p < 0.01$ – статистически значимые различия по сравнению с поврежденным стриатумом в отдельной экспериментальной группе.

статистически значимо увеличивал количество TH+ нейронов в ипсилатеральной SNc (рис. 4, 5).

В тесте “вращающийся стержень” при постоянной скорости вращения медиана времени удерживания опытных животных, получавших плаце-

бо, уменьшилась по сравнению с ложнооперированными животными (табл. 1). Хроническое введение М-11 в дозе 2.5 мг/кг не изменяло время удерживания опытных животных (табл. 1). Афобазол в дозе 2.5 мг/кг увеличивал время удерживания на стержне при фиксированной скорости вращения в сравнении с опытными животными, получавшими плацебо и М-11 в дозе 2.5 мг/кг. Увеличение дозы М-11 до 7.5 мг/кг приводило к увеличению времени удерживания опытных животных на стержне, аналогично действию афобазола. Схожие зависимости были зарегистрированы в тесте с возрастающей скоростью вращения стержня (табл. 1). Медиана времени удерживания на стержне опытных животных, получавших плацебо, в этих условиях снизилась в 1.85 раза по сравнению с ложнооперированными животными (табл. 1). Соединение М-11 в дозе 2.5 мг/кг не влияло на токсическое действие 6-ОНДА. Афобазол или М-11 в дозе 7.5 мг/кг нивелировали действие 6-ОНДА, приводя время удерживания на стержне этих животных к контрольным значениям. (табл. 1).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Содержание ДА и его метаболитов в стриатуме контрольных и опытных животных соответствуют ранее опубликованным данным [34]. Наряду со снижением уровня ДА в стриатуме опытных животных выявлено уменьшение числа TH+ нейронов SNc, что соответствует ретроградному токсическому действию 6-ОНДА [37, 38]. На увеличенной выборке животных повторно показана способность афобазола восстанавливать уровень ДА в стриатуме опытных мышей [34]. Совместно с повышением содержания ДА в стриатуме введение афобазола приводило к увеличению количества TH+ нейронов SNc, что свидетельствует о нейропротекторной активности препарата [38, 41–43]. Нейрохимические изменения, выявленные при курсовом применении афобазола, сопровождались нормализацией двигательной активности

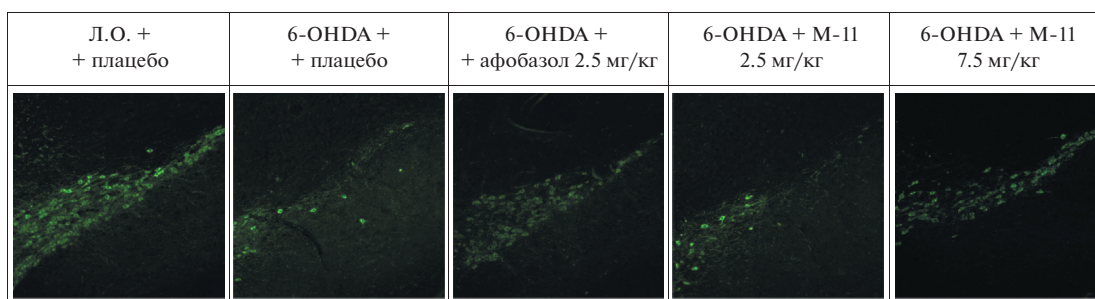


Рис. 4. Влияние афобазола и М-11 на число TH+ нейронов в ипсилатеральной черной субстанции при моделировании болезни Паркинсона. Примечания. Л.О. – ложнооперированные животные. 6-ОНДА – опытные животные. Снимки сделаны при увеличении объектива $\times 10$.

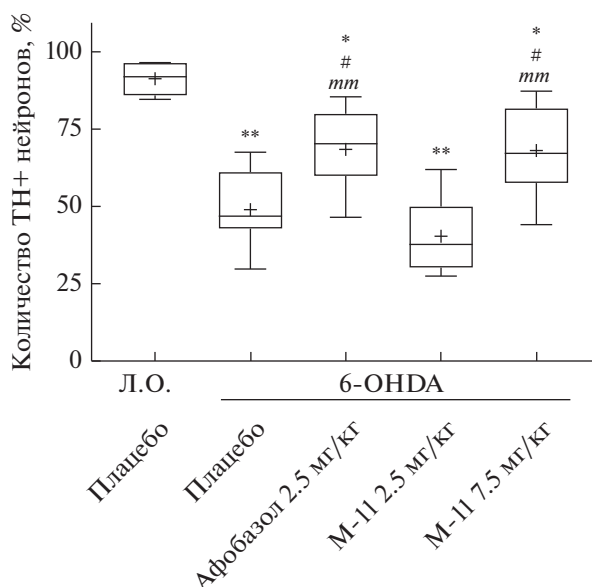


Рис. 5. Влияние афобазола и М-11 на относительное количество TH+ нейронов в ипсилатеральной черной субстанции при моделировании болезни Паркинсона. Примечания. Данные представлены в виде Mdn (min–max). “+” – среднее значение. Л.О. – ложнооперированные животные. 6-OHDA – опытные животные. Kruskal–Wallis test, Dunn’s post hoc: ** $p < 0.01$ – статистически значимые различия по сравнению с поврежденным стриатумом ложнооперированных животных, получавших плацебо. # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ – статистически значимые различия по сравнению с поврежденным стриатумом опытных животных, получавших плацебо. mm $p < 0.01$ – статистически значимые различия по сравнению с поврежденным стриатумом опытных животных получавших М-11 в дозе 2.5 мг/кг.

опытных животных в тесте “вращающийся стержень”, что подтверждает наши предыдущие данные [44] и указывает на возможность предотвращения двигательных нарушений при профилактическом введении препарата. Судя по литературным данным, все известные белковые мишени афобазола могут опосредовать антипаркинсоническое действие препарата [45–49]. В качестве удобного инструмента для изучения вклада NQO2 в механизмы действия афобазола нами предложено сравнение эффектов препарата с действием его метаболита М-11. Ранее на модели менадионовой генотоксичности в суспензии клеток костного мозга мышей афобазол и его метаболит М-11, селективно взаимодействующий с МТ₃ рецептором, проявляли цитопротекторные свойства в разных концентрациях [50, 51]. Эти результаты согласуются с настоящим исследованием *in vivo*, где афобазол был эффективен в дозе 2.5 мг/кг, а М-11 лишь при увеличении дозы до 7.5 мг/кг вызывал восстановление уровня ДА стриатума, увеличение количества TH+ нейронов ипсилатеральной SNc и нормализацию двигательной активности опытных животных. Полученные данные демонстрируют роль NQO2 в развитии нейропротекторного действия афобазола и соответствуют ранее опубликованным работам. Так, внесение ингибитора NQO2 в культуры клеток нейробластомы или нейронов, инкубируемых в присутствии косубстрата и адренохрома, снижало продукцию АФК [52]. Ингиби-

торы фермента препятствовали снижению активности митохондрий и повышали выживаемость гиппокампальных нейронов при действии менадиона или депривации ростовой среды [26]. На модели культуры астроцитов показано негативное влияние параквата на процесс аутофагии, которое устранялось ингибированием NQO2 [47]. Нокаутные по гену NQO2 мыши демонстрировали более высокую обучаемость в тесте вращающийся стержень, что выражалось в увеличении времени удерживания [26].

В нашем исследовании выявлены количественные различия в нейропротекторном действии афобазола и М-11. Эффективная доза афобазола оказалась в три раза меньше в сравнении с М-11. Схожие зависимости действия афобазола и М-11 от концентраций были установлены ранее в экспериментах *in vitro* [50, 51], где с использованием селективных лигандов доказан вклад Sigma 1R в цитопротекторное действие афобазола [50]. В настоящей работе оба препарата восстанавливали уровень ДА стриатума опытных животных, однако афобазол значимо не влиял на содержание ДОФУК, что можно связать с его ингибирующим влиянием на MAO-A [53].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, полученные данные позволяют сделать заключение о вкладе NQO2 в механиз-

Таблица 1. Влияние 14-дневного введения афобазола и М-11 на время удерживания мышей на стержне при фиксированной и возрастающей скоростях вращения

Экспериментальные группы		Время удерживания, с	
		20 об/мин	4–40 (об/мин)
Л.О.	Плацебо (n = 7)	120 (116–120)	180 (170–180)
6-OHDA	Плацебо (n = 9)	17 (13–20.5) **p = 0.0003	97 (71–123.5) **p = 0.008
	Афобазол 2.5 мг/кг (n = 9)	92 (72.5–118.5) #p = 0.011 ^{mm} p = 0.006	178 (154–180) #p = 0.02 ^{mm} p = 0.007
	М-11 2.5 мг/кг (n = 10)	15 (13.5–22) **p = 0.0001	72 (54.5–104) **p = 0.0003
	М-11 7.5 мг/кг (n = 10)	88.5 (34–118.5) #p = 0.034 ^m p = 0.019	175.5 (156.8–180) #p = 0.029 ^{mm} p = 0.001

Данные представлены в виде Mdn (q25–75). n – количество животных в группе. Л.О. – ложнооперированные животные. 6-OHDA – опытные животные.

Kruskal–Wallis test, Dunn's post hoc:

**p < 0.001 – статистически значимые различия по сравнению с группой ложнооперированных животных, получавших плацебо.

#p < 0.05 – статистически значимые различия по сравнению с группой опытных животных, получавших плацебо.

^mp < 0.05, ^{mm}p < 0.01 – статистически значимые различия по сравнению с группой опытных животных, получавших М-11 в дозе 2.5 мг/кг.

мы нейропротекторного действия афобазола в использованной экспериментальной модели болезни Паркинсона. Установленные результаты и ранее выполненные исследования показали, что в фармакодинамике афобазола шаперон Sigma1R и NQO2 аддитивно формируют нейропротекторный эффект.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (тема 0521-2019-0002).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. 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.
2. Pissadaki E.K., Bolam J.P. // Front. Comput. Neurosci. 2013. V. 7. P. 13.
3. Harris J.J., Jolivet R., Attwell D. // Neuron. 2012. V. 75. № 5. P. 762–777.
4. Bolam J.P., Pissadaki E.K. // Mov. Disord. 2012. V. 27. № 12. P. 1478–1483.
5. Guzman J.N., Sanchez-Padilla J., Wokosin D., Kondapalli J., Ilijic E., Schumacker P.T., Surmeier D.J. // Nature. 2010. V. 468. № 7324. P. 696–700.
6. Sulzer D., Zecca L. // Neurotox. Res. 2000. V. 1. № 3. P. 181–195.
7. Bolton J.L., Trush M.A., Penning T.M., Dryhurst G., Monks T.J. // Chem. Res. Toxicol., 2000. V. 13. № 3. P. 135–160.
8. Zahid M., Saeed M., Yang L., Beseler C., Rogan E., Cavalieri E.L. // IUBMB Life. 2011. V. 63. № 12. P. 1087–1093.
9. Gurusamy P., Muthukumar K., Rajesh S., Muneeswaran G., Perumal S., Karunakaran C. // J. Struct. Biol. 2012. V. 180. № 1. P. 125–131.
10. Herrera A., Munoz P., Steinbusch H.W.M., Segura-Aguilar J. // ACS Chem. Neurosci. 2017. V. 8. № 4. P. 702–711.

11. Fu Y., Buryanovskyy L., Zhang Z. // J. Biol. Chem. 2008. V. 283. № 35. P. 23829–23835.
12. Cassagnes L.E., Perio P., Ferry G., Moulharat N., Antoine M., Gayon R., Boutin J.A., Nepveu F., Reybier K. // Free Radic. Biol. Med. 2015. V. 89. P. 126–134.
13. Reybier K., Perio P., Ferry G., Bouajila J., Delagrance P., Boutin J.A., Nepveu F. // Free Radic. Res. 2011. V. 45. № 10. P. 1184–1195.
14. Boutin J.A., Ferry G. // J. Pharmacol. Exp. Ther. 2019. V. 368. № 1. P. 59–65.
15. 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.
16. Calamini B., Santarsiero B.D., Boutin J.A., Mesecar A.D. // Biochem. J. 2008. V. 413. № 1. P. 81–91.
17. Parsons R.B., Smith S.W., Waring R.H., Williams A.C., Ramsden D.B. // Neurosci. Lett. 2003. V. 342. № 1–2. P. 13–16.
18. Aoyama K., Matsubara K., Kondo M., Murakawa Y., Suno M., Yamashita K., Yamaguchi S., Kobayashi S. // Neurosci. Lett. 2001. V. 298. № 1. P. 78–80.
19. Leung K.K., Shilton B.H. // Biochemistry. 2015. V. 54. № 51. P. 7438–7448.
20. Leung K.K., Shilton B.H. // J. Biol. Chem. 2013. V. 288. № 16. P. 11242–11251.
21. Senda T., Senda M., Kimura S., Ishida T. // Antioxid. Redox Signal. 2009. V. 11. № 7. P. 1741–1766.
22. Daily D., Barzilai A., Offen D., Kamsler A., Melamed E., Ziv I. // Cell. Mol. Neurobiol. 1999. V. 19. № 2. P. 261–276.
23. Duan W., Zhu X., Ladenheim B., Yu Q.S., Guo Z., Oyler J., Cutler R.G., Cadet J.L., Greig N.H., Mattson M.P. // Ann. Neurol. 2002. V. 52. № 5. P. 597–606.
24. Nair V.D. // Apoptosis. 2006. V. 11. № 6. P. 955–966.
25. Khutorenko A.A., Roudko V.V., Chernyak B.V., Vartapeitian A.B., Chumakov P.M., Evstafieva A.G. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2010. V. 107. № 29. P. 12828–12833.
26. Benoit C.E., Bastianetto S., Brouillette J., Tse Y., Boutin J.A., Delagrance P., Wong T., Sarret P., Quirion R. // J. Neurosci. 2010. V. 30. № 38. P. 12690–12700.
27. Janda E., Parafati M., Aprigliano S., Carresi C., Visalli V., Sacco I., Ventrice D., Mega T., Vadala N., Rinaldi S., Musolino V., Palma E., Gratteri S., Rotiroti D., Mollace V. // Br. J. Pharmacol. 2013. V. 168. № 1. P. 46–59.
28. Seredenin S.B., Voronina T.A., Neznamov G.G., Blednov Iu A., Badyshov B.A., Viglinskaya I.V., Kozłovskaia M.M., Kolotilinskaia N.V., Iarkova M.A., Savel'ev V.L., Garibova T.L., Val'dman E.A. // Vestn. Ross. Akad. Med. Nauk. 1998. V. @. № 11. P. 3–9.
29. Seredenin S.B., Voronin M.V. // Eksp. Klin. Farmakol. 2009. V. 72. № 1. P. 3–11.
30. Kadnikov I.A., Voronin M.V., Seredenin S.B. // Pharm. Chem. J. 2014. V. 47. № 10. P. 514–516.
31. Zenina T.A., Gavrish I.V., Melkumyan D.S., Seredenina T.S., Seredenin S.B. // Bull. Exp. Biol. Med. 2005. V. 140. № 2. P. 194–196.
32. Galaeva I.P., Garibova T.L., Voronina T.A., Seredenin S.B. // Bull. Exp. Biol. Med. 2005. V. 140. № 5. P. 535–537.
33. Kraineva V.A., Seredenin S.B. // Bull. Exp. Biol. Med. 2010. V. 149. № 2. P. 204–207.
34. Voronin M.V., Kadnikov I.A., Seredenin S.B. // Neurochem. J. 2019. V. 13. № 1. P. 49–56.
35. Seredenin S.B., Viglinskaya A.O., Mozhaeva T.Y., Kolyvanov G.B., Litvin A.A., Avdyunina N.I., Savel'ev V.L., Zherdev V.P. // Eksp. Klin. Farmakol. 2008. V. 71. № 2. P. 50–52.
36. Kadnikov I.A., Voronin M.V., Seredenin S.B. // Farmakokinetika i farmakodinamika. 2018. № 3. P. 27–30.
37. 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.
38. 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.
39. Brooks S.P., Dunnett S.B. // Nat. Rev. Neurosci. 2009. V. 10. № 7. P. 519–529.
40. Grigoriev I.P., Vasilenko M.S., Sukhorukova E.G., Korzhhevskii D.E. // Morfologiya. 2010. V. 138. № 6. P. 60–63.
41. 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.
42. 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.
43. Chan H.H., Kumar S., Zhuo L. // Eur. J. Pharmacol. 2013. V. 715. № 1–3. P. 405–413.
44. Kadnikov I.A., Voronin M.V., Seredenin S.B. // Farmakokinetika i farmakodinamika, 2018. V. № 3. P. 3–8.
45. Francardo V., Geva M., Bez F., Denis Q., Steiner L., Hayden M.R., Cenci M.A. // Neurotherapeutics. 2019. V. 16. № 2. P. 465–479.
46. Francardo V., Bez F., Wieloch T., Nissbrandt H., Ruscher K., Cenci M.A. // Brain. 2014. V. 137. № Pt 7. P. 1998–2014.
47. 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.
48. Riederer P., Laux G. // Exp. Neurobiol., 2011. V. 20. № 1. P. 1–17.
49. Mack J.M., Schamne M.G., Sampaio T.B., Pertile R.A., Fernandes P.A., Markus R.P., Prediger R.D. // Oxid. Med. Cell. Longev. 2016. V. 2016. P. 3472032.
50. Voronin M.V., Kadnikov I.A. // Pharmacol. Res. Perspect. 2016. V. 4. № 6. P. e00273.
51. Kadnikov I.A., Voronin M.V., Seredenin S.B. // Bull. Exp. Biol. Med. 2015. V. 159. № 1. P. 44–47.
52. Cassagnes L.E., Chhour M., Perio P., Sudor J., Gayon R., Ferry G., Boutin J.A., Nepveu F., Reybier K. // Free Radic. Biol. Med. 2018. V. 120. P. 56–61.
53. Voronin M.V., Aksenova L.N., Buneena O.A., Medvedev A.E. // Bull. Exp. Biol. Med. 2009. V. 148. № 1. P. 23–25.

Analysis of the Role of Quinone Reductase 2 in the Mechanism of Anti-Parkinsonic Action of Afobazole

I. A. Kadnikov^a, D. N. Voronkov^b, M. V. Voronin^a, and S. B. Seredenin^a

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

^b*Research Center of Neurology, Moscow, Russia*

In an experimental model of Parkinson's disease, the dopamine content in the striatum, the density of TH+ neurons in the substantia nigra, and the motor activity of mice were studied after the administration of afobazole, which interacts with Sigma-1 and MT1 receptors as well as regulatory sites of MAO A and quinone reductase 2 (NQO2, MT3 receptor), and its main metabolite M-11, which selectively interacts only with the regulatory site of NQO2. The drugs were administered intraperitoneally for 14 days with the start of the course 30 minutes after unilateral intrastriatal administration of 5 µg of 6-hydroxydopamine (6-OHDA). Afobazole and M-11 showed neuroprotective properties. In all experiments, the effective dose of afobazole (2.5 mg/kg) was significantly lower compared to M-11 (7.5 mg/kg). The experimental model used shows the contribution of NQO2 to the antiparkinsonian effect of afobazole along with other drug targets.

Keywords: 6-hydroxydopamine, afobazole, the main metabolite of afobazole M-11, quinone reductase 2, striatum, dopamine, substantia nigra, tyrosine hydroxylase, rotating rod