

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР
ОРИГИНАЛЬНЫХ И ПЕРСПЕКТИВНЫХ
БИОМЕДИЦИНСКИХ И ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИХ ТЕХНОЛОГИЙ»

На правах рукописи



Мариевский Валентин Евгеньевич

**ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОЕ ОБОСНОВАНИЕ ПРИМЕНЕНИЯ
КОМБИНАЦИИ ФАБОМОТИЗОЛА С ЛАДАСТЕНОМ
ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ БОЛЕЗНИ ПАРКИНСОНА**

3.3.6. Фармакология, клиническая фармакология

Диссертация

на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
кандидат биологических наук
Зайнуллина Лиана Фанзилевна

Москва – 2026

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	5
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	13
1.1 Современные представления о патогенезе болезни Паркинсона.....	13
1.1.1 Роль α -синуклеина в патогенезе болезни Паркинсона.....	15
1.1.2 Роль митохондриальной дисфункции в патогенезе болезни Паркинсона.....	20
1.1.3 Роль протеасомной дисфункции в патогенезе болезни Паркинсона.....	27
1.1.4 Роль нейровоспаления в патогенезе болезни Паркинсона.....	30
1.1.5 Роль нарушений дофаминергической системы в патогенезе болезни Паркинсона.....	32
1.2 Современная фармакотерапия болезни Паркинсона.....	38
1.2.1 Дофаминергическая фармакотерапия болезни Паркинсона.....	39
1.2.2 Антиглутаматергическая фармакотерапия болезни Паркинсона.....	41
1.2.3 Антихолинергическая фармакотерапия болезни Паркинсона.....	42
1.3 Фармакологические свойства ладастена, обуславливающие его потенциальное антипаркинсоническое действие.....	43
1.3.1 Влияние ладастена на дофаминергические процессы.....	44
1.3.2 Влияние ладастена на экспрессию генов и белков.....	47
1.3.3 Влияние ладастена на пострецепторные пути передачи сигнала.....	50
1.4 Фармакологические свойства фабомотизола, обуславливающие его потенциальное антипаркинсоническое действие.....	53
1.4.1 Влияние фабомотизола на белок-шаперон Sigma-1 рецептор.....	54
1.4.2 Влияние фабомотизола на фермент хинон-редуктазу 2 (NQO2).....	56
1.4.3 Влияние фабомотизола на нейротрофины.....	58
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	61
2.1 Используемые субстанции и реактивы.....	61
2.2 Лабораторные животные.....	62
2.3 Методы оценки противопаркинсонической активности.....	62

2.3.1	Моделирование паркинсонического синдрома интрастриатным введением 6-гидроксидофамина.....	62
2.3.2	Моделирование паркинсонического синдрома посредством однократного введения МФТП.....	63
2.3.3	Моделирование паркинсонического синдрома посредством длительного введения параквата.....	63
2.4	Схема введения препаратов и дизайн исследования.....	64
2.4.1	Модель паркинсонического синдрома, вызванного интрастриатным введением 6-гидроксидофамина.....	64
2.4.2	Модель паркинсонического синдрома, вызванного однократным введением МФТП.....	66
2.4.3	Модель паркинсонического синдрома, вызванного длительным введением параквата.....	67
2.5	Поведенческие тесты.....	68
2.5.1	Тест «вращающийся стержень».....	68
2.5.2	Тест «вертикальный стержень».....	70
2.5.3	Тест «цилиндр».....	71
2.5.4	Тест «длина шага».....	72
2.6	Нейрохимические методы исследования: высокоэффективная жидкостная хроматография с электрохимической детекцией (ВЭЖХ-ЭД).....	72
2.7	Статистическая обработка экспериментальных данных.....	73
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ.....		75
3.1	Исследование наличия антипаркинсонического действия у субстанции ладастена при пероральном хроническом введении на модели 6-гидроксидофамин-индуцированного паркинсонического синдрома у мышей.....	75
3.1.1	Оценка наличия антипаркинсонического действия у субстанции ладастена при помощи поведенческих тестов на модели 6-гидроксидофамин-индуцированного паркинсонического синдрома у мышей.....	75
3.1.2	Нейрохимический анализ влияния субстанции ладастена на дофаминергическую систему головного мозга мышей на модели 6-гидроксидофамин-индуцированного паркинсонического синдрома.....	81

3.2 Исследование наличия антипаркинсонического действия у субстанции фабомотизола при пероральном хроническом введении на модели 6-гидроксидофамин-индуцированного паркинсонического синдрома у мышей	89
3.2.1 Оценка наличия антипаркинсонического действия у субстанции фабомотизола при помощи поведенческих тестов на модели 6-гидроксидофамин-индуцированного паркинсонического синдрома у мышей.....	90
3.2.2 Нейрохимический анализ влияния субстанции фабомотизола на дофаминергическую систему головного мозга мышей на модели 6-гидроксидофамин-индуцированного паркинсонического синдрома	94
3.3 Исследование наличия антипаркинсонического действия у комбинаций субстанций ладастена с фабомотизолом при пероральном хроническом введении на модели 6-гидроксидофамин-индуцированного паркинсонического синдрома у мышей	100
3.3.1 Исследование антипаркинсонического действия комбинаций субстанций ладастена с фабомотизолом в батарее поведенческих тестов на модели 6-гидроксидофамин-индуцированного паркинсонического синдрома у мышей	100
3.3.2 Нейрохимический анализ влияния комбинаций субстанций ладастена с фабомотизолом на дофаминергическую систему головного мозга мышей на модели 6-гидроксидофамин-индуцированного паркинсонического синдрома.....	115
3.4 Исследование наличия антипаркинсонического действия у комбинаций субстанций ладастена с фабомотизолом при пероральном остром введении на модели МФТП-индуцированного паркинсонического синдрома у мышей ..	131
3.5 Исследование наличия антипаркинсонического действия у комбинации субстанций ладастена с фабомотизолом при пероральном хроническом введении на модели паракват-индуцированного паркинсонического синдрома у мышей.....	140
3.6 Обсуждение полученных результатов.....	149
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	158
ВЫВОДЫ	161
ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ	162
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ	163
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	166

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность работы. Болезнь Паркинсона (БП) представляет собой медленно прогрессирующее дегенеративное заболевание, характеризующееся наличием выраженных двигательных проявлений, среди которых можно отметить тремор покоя, ригидность (скованность), замедленность и уменьшение совершаемых движений (брадикинезия), нарушение походки и постуральную неустойчивость [199]. В зависимости от преобладающей симптоматики выделяют три формы БП: акинетико-ригидную, в которой на первый план выходит гипертонус мышц, со временем приводящий к полной неподвижности; дрожательную, основным симптомом которой является тремор, а также смешанную, при которой патология начинается с тремора рук, затем присоединяется гипокинезия [178].

Распространенность БП в мире составляет 0,15%, достигая приблизительно 1% среди людей в возрасте старше 60 лет [218]. По данным крупного исследования в популяционно-репрезентативной когорте, прогноз при БП неоднороден: у большинства пациентов развивается деменция или постуральная неустойчивость в течение 10 лет после постановки диагноза, при этом у четверти пациентов сохраняется удовлетворительное состояние [231]. Согласно этому же исследованию, БП указывалась в качестве причины смерти в 20% случаев [231]. Средний возраст смерти пациентов с БП варьируется от 77 до 82 лет [86, 168]. В настоящее время повышение эффективности лечения замедляет прогрессирование заболевания и увеличивает продолжительность жизни пациентов, однако приводит к возрастанию инвалидизации в популяции. По данным эпидемиологических исследований, БП наблюдается во всех этнических группах мира [201]. В России распространенность БП на 2016 год составляла примерно 48,9–139,9 случая на 10^5 населения [33], что соответствует 210 тысячам случаев.

В настоящее время не существует консенсуса в научном сообществе касательно этиологии заболевания, поскольку БП является полиэтиологической

и ее развитие обусловлено множеством взаимосвязанных факторов. В качестве примеров подобных факторов можно привести митохондриальную дисфункцию центральной нервной системы (ЦНС) и окислительный стресс, провоцирующий апоптоз нейронов черной субстанции (ЧС) [151]. Одним из широко исследуемых патогенетических факторов заболевания является белок α -синуклеин (α -син), который способен агрегировать и оказывать нейротоксическое воздействие, а также распространяться по ЦНС [158]. В основе БП, вероятнее всего, лежит взаимодействие между факторами внешней среды и генетическими мутациями, что способствует развитию нейродегенеративных изменений [221].

В настоящий момент успешно подобранное лечение БП может замедлить нейродегенеративные процессы и снизить выраженность патологической симптоматики, что позволяет пациентам переходить в стадию ремиссии. Современное медикаментозное лечение направлено на восстановление баланса нейромедиатора дофамина (ДА) в ЦНС, поэтому основными препаратами для лечения БП являются: леводопа и ее аналоги, которые служат основой для выработки ДА; агонисты дофаминовых рецепторов, которые стимулируют рецепторы аналогично природному моноамину и снижают выраженность симптоматических нарушений; ингибиторы фермента моноаминоксидазы-Б (МАО-Б), способствующие уменьшению деградации ДА; ингибиторы фермента катехол-О-метилтрансферазы (КОМТ), назначаемые в комбинации с леводопой и увеличивающие биодоступность последней; ингибиторы глутаматных N-метил-D-аспарагиновой кислоты (NMDA) рецепторов и холиноблокаторы, используемые в качестве дополнительных средств терапии [122]. Однако, несмотря на применение вышеперечисленных средств и симптоматическое улучшение пациентов, БП не излечивается полностью. Кроме того, зачастую медикаментозная терапия БП приводит к побочным эффектам, ухудшающим состояние пациентов [210].

Таким образом, актуальной задачей современной фармакологии является поиск новых противопаркинсонических лекарственных средств (ЛС),

одновременно обладающих как выраженным влиянием на устранение нейродегенеративных процессов, так и хорошей переносимостью.

Степень разработанности темы. В ФГБНУ «ФИЦ оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий» был разработан лекарственный препарат ладастен, предназначенный для лечения астенических состояний различного происхождения, вызванных психическим стрессом, переутомлением, недосыпанием, различными инфекционными и соматическими заболеваниями.

Основным механизмом действия ладастена является усиление синтеза и высвобождения ДА, показанные в экспериментах на здоровых крысах [99, 147]. Ладастен обладает способностью усиливать синтез ДА *de novo*, что принципиально отличает его от типичных психостимуляторов, поскольку подобное влияние свидетельствует о «неистошающем» типе действия ладастена [6]. Для действия ладастена также характерно увеличение активности протеинкиназы С (РКС), протеинкиназы А (РКА), регулируемых внеклеточными сигналами митоген-активируемых протеинкиназ (МАРК) ERK1 и ERK2 (ERK1/2) [2, 3].

Фабомотизол является селективным небензодиазепиновым анксиолитиком, также разработанным в ФГБНУ «ФИЦ оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий». Фабомотизол обладает нейропротекторными свойствами, в частности за счет его способности к лигандной активации Sigma-1 рецептора (Sigma-1R) в нервных клетках головного мозга [7]. Нейропротекторное влияние препарата опосредуется также его воздействием на фермент хинон-редуктазу 2 (NAD(P)H quinone dehydrogenase 2, NQO2) [15] и нейротрофический фактор мозга (brain-derived neurotrophic factor, BDNF) [26]. Помимо этого, фабомотизол восстанавливает рецепцию в бензодиазепиновом участке рецептора γ -аминомасляной кислоты (ГАМК) после тестов «приподнятый крестообразный лабиринт» и «контакт с хищником» [36], повышает биоэнергетический потенциал нейронов и оказывает нейропротективное

действие, что выражается в восстановлении и защите нервных клеток [10]. Действие препарата реализуется преимущественно в виде сочетания анксиолитического (противотревожного) и легкого стимулирующего (активирующего) эффектов. Так, фабомотизол уменьшает или устраняет чувство тревоги и другие проявления, возникающие при стрессовых расстройствах (расстройствах адаптации) [22].

Учитывая большое количество разнообразных биологических мишеней в спектре действия ладастена, участвующих в дофаминергических и антиоксидативных процессах, а также фармакологические мишени фабомотизола, можно предположить синергичное действие при комбинировании данных ЛС, которое будет выражено дофаминпозитивным и нейропротекторным эффектами в условиях нейродегенерации, наблюдаемой при БП.

Цель исследования. Анализ противопаркинсонических эффектов комбинации ладастена с фабомотизолом на экспериментальных моделях паркинсонического синдрома (ПС) *in vivo*.

Задачи исследования:

1. Провести исследование наличия антипаркинсонического действия у субстанции ладастена при пероральном хроническом введении на модели 6-гидроксидофамин(6-ГОДА)-индуцированного ПС у мышей.
2. Провести исследование наличия антипаркинсонического действия у субстанции фабомотизола при пероральном хроническом введении на модели 6-ГОДА-индуцированного ПС у мышей.
3. Провести нейрохимический анализ влияния на дофаминергическую систему головного мозга субстанций ладастена и фабомотизола и их комбинации на модели 6-ГОДА-индуцированного ПС у мышей.
4. Провести подбор оптимального дозового соотношения комбинации субстанций ладастена и фабомотизола на модели 6-ГОДА-индуцированного ПС у мышей.

5. Провести исследование наличия антипаркинсонического действия комбинации субстанций ладастена с фабомотизолом при пероральном остром введении на модели 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридин(МФТП)-индуцированного ПС у мышей.

6. Провести исследование наличия антипаркинсонического действия комбинации субстанций ладастена с фабомотизолом при пероральном хроническом введении на модели паракват-индуцированного ПС у мышей.

Научная новизна. Впервые установлено антипаркинсоническое действие субстанции ладастена при пероральном введении на модели 6-ГОДА-индуцированного ПС у мышей. Впервые установлено антипаркинсоническое действие субстанции фабомотизола при пероральном введении на модели 6-ГОДА-индуцированного ПС у мышей. Впервые установлено антипаркинсоническое действие комбинации субстанций ладастена с фабомотизолом на моделях 6-ГОДА-, МФТП- и паракват-индуцированных ПС у мышей и фармакологически обосновано применение данной комбинации по сравнению с монотерапией ладастеном или фабомотизолом.

Теоретическая и практическая значимость работы. Результаты работы позволили установить наличие антипаркинсонического действия комбинации субстанций ладастена с фабомотизолом на 6-ГОДА-, МФТП- и паракват-индуцированных моделях ПС. Были подобраны оптимальные дозы субстанций: наиболее эффективно антипаркинсоническое действие проявляется при совместном введении ладастена в дозе 50 мг/кг с фабомотизолом в дозе 10 мг/кг. При этом на 6-ГОДА-, МФТП- и паракват-индуцированных моделях ПС действие комбинации было сопоставимо с эффектами леводопы. Таким образом, обнаруженное антипаркинсоническое действие комбинации ладастена с фабомотизолом, сочетающее в механизме действия дофаминпозитивный и нейропротекторный эффекты, определяет ее терапевтическую перспективность.

Методология и методы исследования. В работе использовались три модели ПС, вызванного различными нейротоксинами: 6-ГОДА, МФТП и паракватом. Для оценки наличия антипаркинсонического действия комбинации субстанций ладастена с фабомотизолом в зависимости от используемой модели проводились поведенческие тесты «вращающийся стержень», «вертикальный стержень», «цилиндр», «длина шага», а также регистрировался тремор и осуществлялся нейрохимический анализ дофаминергической системы головного мозга.

Положения, выносимые на защиту:

1. Антипаркинсоническое действие субстанции ладастена при пероральном введении на модели 6-ГОДА-индуцированного ПС.
2. Антипаркинсоническое действие субстанции фабомотизола при пероральном введении на модели 6-ГОДА-индуцированного ПС.
3. Нейрохимический анализ влияния на дофаминергическую систему головного мозга субстанций ладастена и фабомотизола и их комбинации на модели 6-ГОДА-индуцированного ПС у мышей.
4. Подбор наиболее оптимальных дозовых соотношений субстанций в составе комбинации ладастена с фабомотизолом при изучении ее антипаркинсонического действия на модели 6-ГОДА-индуцированного ПС.
5. Антипаркинсоническое действие комбинации субстанций ладастена с фабомотизолом на модели МФТП-индуцированного ПС.
6. Антипаркинсоническое действие комбинации субстанций ладастена с фабомотизолом на модели паракват-индуцированного ПС.

Степень достоверности. Работа выполнена на репрезентативной выборке с использованием корректных методических подходов. Для статистического анализа данных были применены соответствующие методы математической статистики и современное программное обеспечение. Выводы исследования основаны на собственных экспериментальных результатах и анализе литературных источников.

Апробация результатов. Материалы диссертационной работы были представлены на 34-м Конгрессе международного колледжа нейробиофармакологии (Монреаль, Канада, 2023), 2-й Всероссийской научной конференции молодых ученых, посвященной 100-летию со дня рождения профессора А.А. Никулина (Рязань, 2023), Академическом форуме молодых ученых «Большая Евразия. Континент науки» (Москва, 2023), VI Съезде фармакологов России (Клязьма, 2023), 27-й Международной школе-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века» (Пушино, 2024), XX Международном междисциплинарном конгрессе «Нейронаука для медицины и психологии» (Судак, 2024), III Международной научно-практической конференции «Разработка лекарственных средств – традиции и перспективы» (Томск, 2024), IX Междисциплинарной конференции «Молекулярные и биологические аспекты химии, фармацевтики и фармакологии» (Сыктывкар, 2024), 28-й Международной школе-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века» (Пушино, 2025).

Личный вклад автора состоит в разработке дизайна диссертационного исследования, проведении всех экспериментов, анализе и обработке полученных результатов, анализе источников литературы, написании статей и тезисов, представлении результатов на российских и международных конференциях.

Публикации по теме работы. По материалам диссертации опубликовано 14 работ, из них 5 статей в рецензируемых изданиях, рекомендуемых Высшей аттестационной комиссией Министерства образования и науки Российской Федерации, и 9 тезисов докладов в материалах научных съездов и конференций.

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 193 страницах печатного текста, состоит из введения, обзора литературы, главы, посвященной материалам и методам исследования, главы, содержащей собственные результаты и их обсуждение, заключения, выводов, описания перспектив дальнейшей разработки темы и списка литературы. Работа

иллюстрирована 15 таблицами и 37 рисунками. Список литературы содержит 244 источника, в том числе 36 отечественных и 208 зарубежных источников.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Современные представления о патогенезе болезни Паркинсона

БП является нейродегенеративным заболеванием с тенденцией к увеличению частоты встречаемости и находящемся на втором месте по распространенности после болезни Альцгеймера (БА) [37]. В среднем, БП развивается примерно в 60 лет, причем ожидаемая продолжительность жизни в зависимости от оказываемого лечения составляет 23,3 года [97]. Однако в настоящее время имеются данные об «омоложении» заболевания [12] и более раннем возрастном периоде манифестации симптомов.

Клинически БП проявляется выраженными двигательными нарушениями, среди которых можно отметить тремор покоя, брадикинезию, мышечную ригидность с нарушением походки, акинегию и постуральную неустойчивость [199]. Кроме того, имеется также ряд немоторных проявлений, таких как нарушения сна, желудочно-кишечные расстройства, частичная или полная утрата обоняния, тревожность и депрессия [119].

В основе всех вышеперечисленных проявлений лежит прогрессирующий нейродегенеративный процесс, включающий в себя гибель дофаминергических нейронов экстрапирамидной системы головного мозга, в первую очередь ЧС и полосатого тела (ПТ, стриатума) [117].

Несмотря на то, что БП считается идиопатическим заболеванием [239], имеются данные о роли генетических и приобретенных факторов, которые могут являться первопричиной нейродегенерации. В настоящее время известно о вовлеченности различных генов в семейные формы БП, наследуемые как по аутосомно-доминантному (*PARK1/4*, *PARK8*, *PARK21*), так и по аутосомно-рецессивному типу (*PARK2*, *PARK6*, *PARK7*, *PARK9*, *PARK14*, *PARK15*, *PARK20*) [221], однако только у 5–10% пациентов наблюдается моногенная форма БП, при которой наличие данных мутаций вызывает заболевание с высокой пенетрантностью [128].

Касательно влияния факторов окружающей среды на развитие БП, известно о пагубном воздействии пестицидов, трихлорэтилена и загрязненного воздуха, приводящем к нейродегенерации [83]. В настоящее время выделение единой этиологической причины БП представляется затруднительным, поэтому более вероятно предположение, что имеется взаимодействие между генетическими факторами и экзотоксикантами окружающей среды.

Патогенез БП также является довольно сложным, однако с уверенностью можно утверждать, что это мультифакторное заболевание. На данный момент можно выделить ряд основных патологических звеньев, в итоге приводящих к нейродегенерации, а именно накопление и агрегацию токсичного белка α -син и митохондриальную дисфункцию, так или иначе способствующих развитию окислительного стресса за счет выработки активных форм кислорода (АФК) (Рисунок 1) [204].

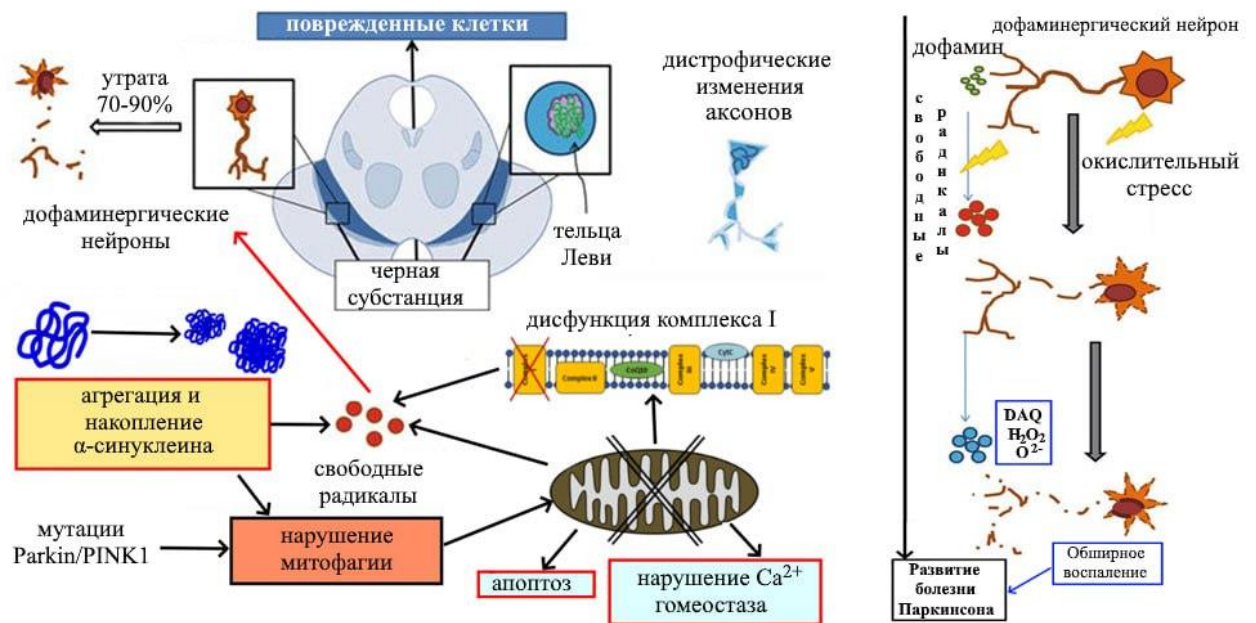


Рисунок 1 – Влияние α -синуклеина и митохондриальной дисфункции на развитие окислительного стресса с последующей гибелью дофаминергических нейронов черной субстанции (адаптировано из [161])

Помимо этого, важный вклад в инициирование нейродегенерации вносят нарушения в функционировании убиквитин-протеасомной системы и развитие нейровоспаления (НВ) [151].

1.1.1 Роль α -синуклеина в патогенезе болезни Паркинсона

Микромолекулярный белок α -син присутствует в большом количестве в пресинаптических областях ЦНС, составляя около 1% от общего цитоплазматического белка в нейронах [67]. В полноразмерном белке α -син можно выделить три ключевые области: N-концевой, мембраносвязывающий домен, который имеет тенденцию образовывать α -спирали; центральный гидрофобный участок с NAC(non-amyloid component, неамилоидный компонент)-последовательностью, участвующей в образовании и агрегации фибрилл, а также отрицательно заряженный C-концевой участок, который посредством взаимодействия с областью NAC отвечает за ингибирование агрегации α -син [84].

На данный момент отсутствует полное понимание физиологических функций α -син, однако его обилие в пресинаптических терминалях позволяет предположить его участие в синаптической функции и синаптической пластичности. Так, было показано, что α -син влияет на несколько этапов жизненного цикла синаптических пузырьков, включая их кластеризацию, процесс стыковки везикул, формирование SNARE-комплекса и поддержание синаптического гомеостаза везикул [194]. Вышеперечисленные функции α -син утрачиваются при БП, а сам белок приобретает токсическую активность, что приводит к дисфункции множества внутриклеточных путей в нейронах и окружающих клетках.

На важное значение α -син в патогенезе БП указывает тот факт, что он является наиболее распространенным белковым компонентом внутриклеточных конгломератов в виде эозинофильных включений (диаметром 5–30 мкм) в соматических сохранившихся нейронах, которые детектируются при обычном гистологическом окрашивании и называются тельцами Леви (ТЛ) [93]. Данные включения чаще всего присутствуют в ЧС, но могут обнаруживаться в других областях мозга, а также в периферических тканях. Распространение и накопление ТЛ коррелирует с прогрессированием

заболевания и тяжестью симптомов БП [88]. Стоит отметить, что ТЛ можно рассматривать как последнюю стадию процесса агрегации α -син, до которой происходит накопление данного белка в форме растворимых аморфных олигомеров, которые затем превращаются в протофибриллы (то есть олигомеры, имеющие β -складчатую структуру) и в конечном итоге приводят к образованию нерастворимых амилоидных фибрилл, являющихся токсичными для клеток [158]. Процесс агрегации α -син можно представить в виде трех этапов [158]:

- 1) Фаза инерции: образуется ядро агрегации из мономеров α -син вследствие его фосфорилирования по S129. Данная стадия является лимитирующей.
- 2) Фаза элонгации: ядро агрегации превращается в префибриллы, профибриллы и другие агрегатные формы.
- 3) Фаза равновесия: большая часть растворимого белка превращается в амилоидо-подобные фибриллы и между ними устанавливается постоянное равновесие.

Свой вклад в наличие нейротоксических свойств агрегатов α -син могут вносить его посттрансляционные модификации, такие как фосфорилирование и нитрование, которые способствуют стабилизации олигомеров [47].

Касательно конкретных механизмов, вовлеченных в токсическое воздействие α -син на нейроны, имеются доказательства влияния данного белка на функционирование внутри- и внеклеточных мишеней. Так, α -син способствует нарушению функций митохондрий, эндоплазматического ретикула (ЭПР), убиквитин-протеасомной и аутофаго-лизосомальных систем, а также влияет на целостность клеточной мембраны и развитие нейровоспалительных процессов [105]. Так, α -син способен подобно некоторым белковым токсинам создавать поры в мембране, что приводит к повышению проницаемости внешнего липидного бислоя и притоку ионов из внеклеточного пространства, а в конечном итоге – к нарушению клеточного гомеостаза [105]. Агрегаты α -син на аксональном уровне приводят к

нарушению микротрубочкового транспорта от тела клетки к синаптическим окончаниям и ретроградных сигнальных молекул и эндосом из синаптических окончаний в сому нейронов [61].

Достаточно подробно изучено влияние α -син на функционирование митохондрий. Олигомеры α -син способны напрямую взаимодействовать с митохондриями за счет высокоаффинного связывания с транслоказой наружной мембраны 20, что приводит к снижению импорта белков, которые необходимы для поддержания функций данных органелл, а также к их старению и повышению выработки АФК [79]. Другой мишенью для взаимодействия является митохондриальный транслокатор адениновых нуклеотидов, связывание с которым посредством N-конца α -син приводит к изменению морфологии, снижению мембранного потенциала и повышению проницаемости поры митохондрий [196]. Кроме того, α -син способен связываться с аденозинтрифосфат(АТФ)-синтазой, комплексами I и IV электрон-транспортной (дыхательной) цепи переноса, а также с кардиолипином [60].

Установлено также, что α -син способен влиять на биоэнергетику митохондрий. В исследовании с использованием крыс с прогрессирующей гибелью дофаминергических нейронов, вызванной гиперэкспрессией мутантного (замена А53Т) человеческого α -син в компактной части ЧС, было показано, что α -син транспортируется в синапсы ПТ и приводит к нарушению биоэнергетики митохондрий [146]. После этого наблюдается последовательное снижение уровня ДА и повышение количества поврежденных митохондрий по мере развития патологического процесса. Кроме того, наблюдалось увеличение экспрессии сенсорных белков PRKAG2 и TTR, которые являются маркерами окислительного стресса [146]. Помимо этого, α -син способен связываться своим C-концом с потенциал-зависимым анионным каналом (voltage-dependent anion-selective channel, VDAC), причем с VDAC1 в 10-100 раз эффективнее, чем с VDAC3, что приводит к изменению проводимости с анионной на катионную и увеличению притока Ca^{2+} через

VDAC в митохондриях [183]. В конечном счете подобное воздействие изменяет гомеостаз митохондрий. Также, вместе с другими белками, VDAC способствует перемещению α -син из цитозоля в межмембранное пространство митохондрий, где, предположительно, он нарушает активность комплекса I/III дыхательной цепи переноса электронов [183].

Известно о влиянии α -син на митохондриальные процессы биогенеза, динамических изменений и транспортирования. Воздействие на биогенез реализуется посредством влияния на промотор гамма-коактиватора 1 рецептора, активируемого пролифератором пероксисом (PGC-1), который играет важную роль в образовании новых митохондрий и восстановлении их здоровой популяции [69]. Белок α -син напрямую воздействует на промотор PGC-1 в условиях окислительного стресса, что приводит к нарушению синтеза митохондрий *de novo* [69].

Митохондрии являются динамическими органеллами клетки, которые способны делиться на отдельные составляющие и сливаться друг с другом. Фрагментация митохондрий представляет собой процесс, необходимый для поддержания их морфологии, и предшествующий делению клетки, а также митофагии, во время которой поврежденные митохондрии удаляются в лизосомальных компартментах [89]. Основным белком, участвующим в делении митохондрий, является динамин-подобный белок 1 (dynamin related protein 1, Drp1), обладающий гуанозинтрифосфатной (ГТФазной) активностью [89]. Можно заключить, что процесс фрагментации осуществляет контроль качества митохондрий. В исследовании с использованием трансгенных мышей, экспрессирующих человеческий α -син с мутацией A53T, было показано, что у животных с патологией наблюдалось снижение локализации и активности Drp1 в митохондриях [169]. Кроме того, потеря функции Drp1 была связана с двумя различными фенотипами увеличенных митохондрий в нейронах [169].

О влиянии α -син на митофагию также свидетельствует его воздействие на белок паркин, который играет важную роль в биогенезе митохондрий и

митофагии. На клеточной линии PC12 было показано, что воздействие экзогенного α -син вызывает деполяризацию митохондриальной мембраны, повышенную продукцию супероксид-аниона и снижение уровня АТФ в клетках, также была выявлена корреляция между α -син-зависимыми нарушениями митофагии и сниженным уровнем паркина в митохондриях [230]. Кроме того, α -син нарушал биосинтез митохондрий из-за зависимо от паркина снижения уровня ранее упомянутого PGC-1 [230]. Таким образом, нарушение функции паркина из-за воздействия α -син приводит к общему нарушению митохондриального гомеостаза и накоплению аномальных митохондрий.

Слияние митохондрий – процесс, основной целью которого является уменьшение повреждений, накапливаемых в митохондриях, а также обеспечение возможности обмена содержимым. В частности, слияние способствует окислительному фосфорилированию и позволяет перераспределять митохондриальную дезоксирибонуклеиновую кислоту (ДНК) между поврежденными и здоровыми митохондриями [94]. Важную роль в слиянии митохондрий играет белок митофузин-1 (mitofusin, MFN), ключевыми особенностями которого является ГТФ-зависимая димеризация и конформационные изменения, обеспечивающие слияние внешней мембраны [94]. В ранее рассмотренном исследовании с использованием трансгенных мышей, экспрессирующих человеческий α -син с мутацией A53T, было показано, что у животных с патологией наблюдалось снижение уровня MFN, а значит и нарушение процессов слияния митохондрий [169]. Кроме того, было обнаружено, что гиперэкспрессия α -син дикого типа и мутантных вариантов также нарушает слияние митохондрий и стимулирует их деление посредством специфического мембранного взаимодействия, независимого от слияния или расщепления белков [170].

Транспорт митохондрий в ЦНС является важным гомеостатическим процессом. Например, транспорт митохондрий, осуществляемый различными белками кинезинами в синаптическую область, необходим для высокого

энергетического обеспечения, а также буферизации кальция для поддержания синаптической пластичности и передачи сигналов [87]. Имеются данные на модели α -синуклеопатии рыбок *Danio rerio* о влиянии на белковый клиренс, показывающие, что α -син вызывает нарушение аксонального транспорта митохондрий, а также белковую агрегацию и гибель нейронов [135]. Таким образом, α -син влияет на различные процессы, необходимые для нормального функционирования митохондрий, в конечном итоге приводя к митохондриальной дисфункции и гибели клеток.

1.1.2 Роль митохондриальной дисфункции в патогенезе болезни Паркинсона

Митохондрии широко распространены в нейронах и выполняют множество задач, среди которых, в первую очередь, можно отметить поддержание энергетических потребностей нейрональных клеток. Нейроны ввиду своего сложного строения и функционирования имеют высокие биоэнергетические потребности и в значительной степени зависят от синтеза АТФ митохондриями [216]. Молекулы АТФ образуются в результате гликолиза и окислительного фосфорилирования, а нейроны используют эти два источника для покрытия своих энергетических затрат [44]. Таким образом, митохондрии должны быть функционально активны в соме, аксонах и дендритах нейронов на протяжении всей жизни организма, поэтому необходима постоянная поддержка митохондриального пула. Так, необходимый запас митохондрий поддерживается процессами их транспорта по нейронам в зависимости от местных энергетических потребностей [129], а также благодаря процессам слияния и деления, способствующими поддержанию функционального и здорового пула органелл. Сложная динамическая система, которая поддерживает и доставляет митохондрии, называется митостазом. Таким образом, основной функцией митостаза является регуляция необходимого количества митохондрий в каждом

компарimente нейрона [148]. Однако в двигательных нейронах, которые являются клетками с длинными отростками, постоянное перемещение митохондрий энергетически невыгодно, поэтому, вероятно, их биогенез может происходить и на периферии [62].

Другой важной функцией митохондрий нейронов является буферизация ионов Ca^{2+} , что особенно важно для регуляции возбудимости нейронов, синаптической передачи и защиты от нейрональной токсичности [227]. Помимо этого, нейрональные митохондрии вовлечены также в передачу сигналов, поскольку они являются источниками цитрата, необходимого для производства ацетил-кофермента А и ацетилирования белков и ДНК [65].

Вышеперечисленное свидетельствует о том, что нарушение функции митохондрий может оказывать непропорционально сильное воздействие на те нейроны, которые подвержены риску развития БП, в особенности на дофаминергические нейроны ЧС. Данные нейроны постоянно активно функционируют и имеют обширные аксональные разветвления с 1-2 миллионами мест высвобождения нейромедиаторов на аксон у человека [56]. Помимо нейронов ЧС, в зону риска при БП попадает и ряд других нервных клеток, например, норадренергические нейроны голубого пятна [46]. Для удовлетворения своих биоэнергетических потребностей нейроны из группы риска задействуют механизм прямой активации Ca^{2+} -каналов L-типа в плазматической мембране для запуска митохондриального цикла Кребса [240]. Данный механизм позволяет поддерживать уровень АТФ в условиях высокой энергетической потребности, но он также увеличивает выработку АФК [42], что способствует развитию окислительного стресса, в итоге приводящего к нарушению функционирования и жизнедеятельности клеток. Кроме того, окислительный стресс также повышает нагрузку на катаболические процессы в нейронах, в первую очередь на лизосомальную деградацию, что снижает резервную способность клеток.

Окислительный стресс в митохондриях связан с генетическими мутациями, которые выявлены при анализе наследственных случаев БП. В

качестве примеров наиболее изученных мутаций, влияющих на функционирование митохондрий, можно привести мутации в генах *parkin* (*PARK2*), *PINK1* (*PARK6*), *DJ-1* (*PARK7*), *LRRK2* (*PARK8*) и *SCNA* (*PARK1*).

Ген *parkin* кодирует белок паркин, являющийся убиквитинлигазой E3, который принимает участие в деградации белков посредством полиубиквитинирования, направляя целевые молекулы в систему протеасомной деградации [111]. Дефицит паркина нарушает процесс деградации и приводит к увеличению количества белков, в том числе токсичных для ЦНС, например, α -син [207]. Подобное нарушение протеостаза способствует развитию нейродегенеративных процессов при БП. Кроме того, мутации паркина приводят к снижению активности комплекса I дыхательной цепи митохондрий, нарушению митохондриального мембранного потенциала и значительному понижению уровня АТФ, что было продемонстрировано в исследованиях *in vitro* и *in vivo* [111]. Также паркин играет важную роль в митофагии. Так, после повреждения митохондрий, киназа *PINK1* накапливается на внешней мембране, где фосфорилирует митохондриальные белки, в том числе паркин, тем самым активируя его. Затем паркин убиквитинирует белки внешней мембраны митохондрий с дальнейшим привлечением адаптеров аутофагии, которые, в свою очередь, инициируют образование аутофагосом для митохондриальной деградации [156]. Процесс митофагии нарушается из-за мутаций *parkin* при БП, что приводит к снижению эффективности удаления поврежденных митохондрий и накоплению дефектных органелл [132].

Ген *PINK1* кодирует PTEN-индуцированную киназу 1, которая локализуется на мембранах митохондрий, где она способствует поддержанию их целостности и участвует в вышеупомянутом процессе митофагии [165]. Мутации *PINK1* при БП нарушают процесс митофагии, что приводит к накоплению поврежденных митохондрий и способствует гибели дофаминергических нейронов [222].

Ген *DJ-1* кодирует одноименный белок, который действует как датчик окислительного стресса и участвует в антиоксидантной защите клеток от повреждения, в том числе дофаминергических нейронов [82]. Активированный после окисления DJ-1 перемещается в ядро клетки, где регулирует несколько факторов транскрипции, влияющих на окислительно-восстановительный статус клетки, в частности через разобщающие белки митохондрий (UCP4 и UCP5), которые, в свою очередь, снижают выработку митохондриальных матриксных металлопротеиназ и АФК посредством активации ядерного фактора Nrf2 и проапоптотического белка p53 [82]. Кроме того, DJ-1 взаимодействует с митохондриальным белком Bcl-xL, предотвращая высвобождение цитохрома C и подавляя апоптоз [82]. DJ-1 также регулирует НВ посредством подавления активации микроглии [241] и ингибирует экспрессию MAO-B, снижая образование АФК [133]. Защитные свойства DJ-1 в отношении дофаминергических нейронов к различным окислительным агентам, в частности к перекиси водорода и нейротоксинам, например, параквату, были подтверждены в различных исследованиях *in vitro* и *in vivo* [220]. Нарушения в структуре или функционировании DJ-1, вызванные мутациями соответствующего гена, приводят к снижению антиоксидантных и нейропротекторных свойств этого белка, что способствует развитию и прогрессированию БП [202]. В качестве примера нарушения функционирования DJ-1 можно привести его взаимодействие с гомоцистеинтиолактоном по 182 остатку лизина, что в итоге устраняет нейропротекторные эффекты DJ-1 в отношении окислительного стресса и митохондриальной дисфункции [100].

Ген *LRRK2* кодирует соответствующий белок дардарин (богатая лейциновыми повторами киназа 2, leucine-rich repeat kinase 2, LRRK2), представляющий собой мультидоменный комплекс, отдельные участки которого выполняют различные функции. Например, в его структуре выделяют домены, обладающие ГТФазной и серин/треонинкиназной активностями [229]. LRRK2 фосфорилирует подмножество Rab-ГТФаз, участвующих в

регуляции везикулярного транспорта и поддержании лизосомального гомеостаза [229]. Помимо этого, LRRK2 участвует в регуляции актинового цитоскелета через взаимодействие с такими белками, как Fascin, Rho-киназа, и влияет на миграцию веретена деления [163]. Мутации в *LRRK2* приводят к развитию наиболее распространенной аутосомно-доминантной формы моногенной БП [226]. Наиболее частой мутацией является замена глицина на серин (G2019S) в киназном домене LRRK2, что повышает его киназную активность и рассматривается в качестве одной из причин нейротоксичности при БП [157]. Кроме того, мутации *LRRK2* были обнаружены при спорадической БП [137]. Более того, в фибробластах пациентов с мутацией G2019S наблюдалось снижение уровня клеточного АТФ и активности митохондриальных комплексов III и IV [114]. LRRK2 также участвует в регуляции митохондриальной динамики, взаимодействуя с Drp1, поэтому мутации G2019S приводят к таким аномалиям митохондрий, как нарушение их деления [102]. Таким образом, участие LRRK2 в разнообразных функциях, необходимых для корректной работы митохондрий и других клеточных органелл, подчеркивает важную роль его нарушений, которые наблюдаются при БП и приводят к различным клеточным дисфункциям.

Однако, несмотря на значительную роль вышеперечисленных мутаций в патогенезе БП, стоит учитывать, что наследственные моногенные формы БП составляют всего 5–10% от всех случаев заболевания [70], в то время как остальные 90–95% являются спорадическими формами и вызваны неизвестными факторами. Среди подобных факторов достаточно хорошо изучены токсины из окружающей среды [83], которые могут приводить к возникновению БП, правда такая взаимосвязь подтверждается не всегда [101].

Первым изученным нейротоксином, который вызывает БП, был МФТП [189]. Он является высоколипофильной молекулой, которая легко проникает через гематоэнцефалический барьер (ГЭБ). Проникнув через ГЭБ, МФТП метаболизируется с образованием активного метаболита 1-метил-4-фенилпиридиния (МФП⁺) избирательно транспортируется переносчиками

дофамина в дофаминергические нейроны, а далее концентрируется в синаптических пузырьках с помощью везикулярного переносчика моноаминов 2-го типа (Vesicular monoamine transporter 2, VMAT2) [160]. МФП⁺ реализует свое токсическое воздействие путем ингибирования комплекса I дыхательной цепи митохондрий, что приводит к снижению продукции АТФ [124], генерации АФК и развитию окислительного стресса. Все вышеперечисленные патологические процессы приводят к митохондриальной дисфункции и гибели клеток. МФП⁺ вызывает более выраженную дофаминергическую дегенерацию в нейронах ЧС, чем в вентральной области покрышки, что было показано на мышинной модели БП [243]. Таким образом, МФП широко используется для моделирования ПС у мышей [155] и приматов [235], поскольку нейротоксин является селективным по отношению к дофаминергическим нейронам ЧС, что отражает патогенез БП у человека.

Далее стало известно о других токсических факторах внешней среды, используемых в сельской промышленности, а именно о пестицидах ротеноне и параквате. Ротенон, используемый в качестве инсектицида, обладает высокой липофильностью, поэтому легко проникает через клеточные мембраны и ингибирует комплекс I дыхательной цепи митохондрий. Также он нарушает окислительное фосфорилирование и процесс переноса электронов к кислороду, тем самым увеличивая образование АФК [63]. Ротенон широко используется для моделирования ПС у грызунов [103].

Паракват, используемый в качестве гербицида, также обладает нейротоксическими свойствами. Он индуцирует дегенерацию дофаминергических нейронов, особенно в ЧС, что воспроизводит основные черты БП [66, 190]. В качестве механизмов, лежащих в основе вызываемой им нейродегенерации, можно привести образование АФК, снижение активности антиоксидантных ферментов и запуск апоптоза [66, 190].

Митохондриальная дисфункция и избыточное производство АФК крайне пагубно сказываются на состоянии дофаминергических нейронов, которые особенно уязвимы к окислительному стрессу из-за высокой метаболической

активности. Стоит отметить, что эти нейроны также могут повреждаться в результате окислительного стресса, вызванного эндогенными веществами, такими как сам ДА и его метаболиты [180]. Так, в цитозоле и синаптической щели нейронов в результате чрезмерного протекания ферментативных реакций при метаболизме ДА образуются свободные радикалы [212]. Кроме того, высокое содержание железа в ЧС при БП может способствовать образованию АФК и агрегатов α -син [136]. Нарушения в обмене железа, избыточное накопление железа или железо-серных кластеров в митохондриях приводит к окислительному стрессу, нарушению морфологии (например, потере крист) и динамики митохондрий [80]. Кроме того, с возрастом эффективность эндогенной антиоксидантной системы снижается, что делает дофаминергические нейроны более уязвимыми к окислительному стрессу, вызванному собственным эндогенным ДА и его метаболитами [180].

В пользу того, что ДА обладает токсичностью, может свидетельствовать наличие токсических свойств у очень близкого по химической структуре соединения – 6-ГОДА, который является хорошо известным нейротоксином и используется для моделирования нейродегенерации, подобной таковой при БП в условиях *in vivo* [171] и *in vitro* [237]. 6-ГОДА способен проникать в дофаминергические нейроны с помощью дофаминового транспортера, где вызывает образование АФК, способствуя развитию окислительного стресса и запуску апоптоза [188]. Кроме того, 6-ГОДА способен вызывать митохондриальную дисфункцию, нарушая мембранный потенциал и биоэнергетику этих органелл [193].

Таким образом, митохондриальная дисфункция признается объединяющим патогенетическим механизмом генетических и негенетических форм БП. В основе этого патогенетического звена лежит чрезмерная продукция АФК, нарушения в способности обеспечивать энергией затратные клеточные процессы и митоптоз, сокращающий численность функционирующих митохондрий.

1.1.3 Роль протеасомной дисфункции в патогенезе болезни Паркинсона

В настоящее время известно, что протеасомы представляют собой мультисубъединичный комплекс, который отвечает за деградацию подавляющего большинства клеточных белков. Данная структура обладает мультикаталитической активностью и состоит из нескольких субъединиц, формируя структуру, напоминающую бочонок, что обеспечивает избирательное и эффективное разрушение белков [116]. Основной разновидностью протеасом является 26S протеасома, которая отвечает за деградацию большей части белков в эукариотических клетках, поддерживая протеостаз и регулируя множество клеточных процессов [45]. Стоит отметить, что помимо конститутивной протеасомы в клетках присутствуют также иммунопротеасома, тимопротеасома и сперматопротеасома [77].

Считается, что нарушение клеточного протеостаза напрямую связано с различными нейродегенеративными заболеваниями, в том числе и БП [123]. В эукариотических клетках можно выделить два основных пути деградации белков, посредством протеасомы и аутофагии, которые взаимосвязаны с функцией поддержания клеточного протеолиза [177]. Кроме того, протеасомная система тесно связана с убиквитиновой системой, которая, в свою очередь, необходима для селективного удаления короткоживущих белков, а также неправильно собранных или поврежденных белков в цитоплазме, ядре и ЭПР [167]. Аутофагия, в свою очередь, работает в сочетании с лизосомами (аутофаго-лизосомальная система) и необходима для деградации долгоживущих макромолекул, фракций цитозоля и органелл посредством трех специфических механизмов: макроаутофагии, микроаутофагии и шаперон-опосредованной аутофагии [126]. Исходя из вышеизложенного, становится ясно, что поддержание нормального протеостаза является сложной задачей, особенно по мере старения организма, когда происходит постепенное снижение протеолитических способностей клеток и связанное с этим накопление неразрушенных белков [120]. Результирующее аномальное

накопление неразрушенных белков, особенно тех, которые обладают нейротоксическими свойствами (например, α -син), перегружает клеточные деградационные ресурсы, делая нейроны уязвимыми к повреждению.

В настоящее время известно, что мутации и нарушения в убиквитин-протеасомной системе снижают ее активность, что способствует развитию нейродегенерации при БП [52]. Например, нокаут АТФазной субъединицы Rpt2 протеасомы в дофаминергических нейронах демонстрирует истощение системы 26S протеасом, из-за чего в нигростриатном пути отмечается накопление внутринейрональных включений, подобных ТЛ [50]. Нокаут другой АТФазной субъединицы протеасомы Rpt3 в мотонейронах вызывает выраженные двигательные нарушения, сопровождаемые прогрессирующей потерей нейронов и глиозом [215].

Внешние воздействия также нарушают функционирование протеасом. Одним из наиболее изученных подобных факторов, негативно отражающихся на работе протеасом, является α -син. Гомеостаз этого белка поддерживается убиквитин-зависимой протеасомной деградацией, а также макроаутофагией и шаперон-опосредованной аутофагией [185]. Различные формы α -син деградируют разными путями в зависимости от их локализации и общей белковой нагрузки. Протеасомы и макроаутофагия способны деградировать мутантный α -син или его промежуточные олигомеры, в то время как шаперон-опосредованная аутофагия обладает специфической способностью деградировать мономеры и димеры α -синуклеина [209]. Однако точные механизмы, определяющие, будет ли α -син деградироваться протеасомами или аутофагией, остается неизвестным. При этом достоверно известно, что системное воздействие ингибиторов протеасомы вызывает образование α -син/убиквитин-содержащих включений, напоминающих ТЛ в нейронах, а у опытных животных развиваются прогрессирующие двигательные нарушения, которые являются основными патологическими проявлениями БП [144].

Многочисленные исследования показали, что α -син может ингибировать активность протеасом, особенно если он находится в олигомерной или

фибриллярной форме [142]. Так, было показано, что клетки PC12 с экспрессией мутантного α -син A53T, демонстрируют сниженную протеасомальную химотрипсин-подобную активность, вследствие чего наблюдаются нарушения в работе убиквитин-зависимой системы деградации, сопровождаемые увеличением убиквитин-конъюгированных агрегатов [208]. На аналогичной клеточной линии, экспрессирующей мутантный α -син, было также показано, что пептидазная активность протеасомы выражено снижается, приводя при этом к митохондриальной дисфункции и гибели клеток [213]. Кроме того, на клеточных линиях, которые экспрессировали α -син не мутантного типа, а дикого, также наблюдалось примерно 50%-ное снижение эффективности протеасомальной деградации [203]. Сверхэкспрессия α -син приводит к изменению каталитических функций 26S протеасомы, что, вероятно, связано с селективным накоплением α -син, фосфорилированного по Ser129, и лежит в основе возникновения моторного дефицита и дегенерации дофаминергических нейронов [142]. Кроме того, олигомеры α -син способны взаимодействовать с 26S протеасомой, приводя к значительному ингибированию протеасомальной активности без влияния на уровни или процесс сборки самой протеасомы [85]. В качестве гипотетических механизмов того, как α -син ингибирует функцию протеасом, можно привести его прямое взаимодействие с протеасомой посредством связывания с АТФазной субъединицей Rpt5 или с субъединицей $\beta 5$, обладающей химотрипсиноподобной активностью [203].

Таким образом, нарушения в функционировании протеасомы усугубляет процесс агрегирования и накопления α -син, который, в свою очередь, сам способен связываться с протеасомой и ингибировать ее протеолитическую активность. То есть наблюдается некий порочный круг между протеасомной дисфункцией и агрегацией α -син, что является важным патогенетическим звеном при БП.

1.1.4 Роль нейровоспаления в патогенезе болезни Паркинсона

В последнее время роли НВ уделяется все больше внимания в качестве одного из патологических звеньев БП, которое приводит к развитию нейродегенеративных процессов. По своей сути, НВ представляет собой сложную многокомпонентную систему взаимодействий, в которую вовлечены различные участники иммунного ответа [107], направленные на борьбу с патогенами, проникшими в ЦНС. Несмотря на изначально защитную функцию, иммунная реакция становится слишком выраженной вследствие длительного действия патогенетических факторов, из-за чего нарушается клеточный гомеостаз и воспаление становится хроническим [217].

Наиболее распространенными цитокинами, которые могут использоваться в качестве биомаркеров НВ, являются фактор некроза опухоли альфа, а также интерлейкины-1 β , -4 и -6 [175]. Содержание данных цитокинов у пациентов с БП значительно превосходит таковое у здоровых людей. К другим признакам НВ у пациентов с БП можно отнести микроглиоз, то есть активированную микроглию, а также астроглиоз, то есть активированные астроциты [43].

Микроглия, являющаяся по своей сути резидентными макрофагами в ЦНС, берет на себя ведущую роль в регуляции НВ и поддержании гомеостаза. В нормальных физиологических условиях микроглия находится в состоянии покоя, но при патологических стимулах и развитии НВ она активируется и способствует воспалительной реакции [107]. Для классификации активности микроглии используются провоспалительный (M1) и противовоспалительный (M2) фенотипы, при этом каждый фенотип характеризуется своими маркерами и высвобождаемыми медиаторами. Фенотип M1 способствует развитию различных воспалительных реакций, тем самым усугубляя нейродегенеративные процессы при БП [107].

Наиболее частыми эффекторами, активирующими M1 фенотип, являются липополисахарид и интерферон- γ . Под их влиянием клетки

микроглии поляризуются до фенотипа M1 и секретируют провоспалительные цитокины, которые способствуют дисфункции дофаминергических нейронов и развитию нейродегенерации [217]. Кроме того, при нейрональном повреждении в процессе передачи сигналов между астроцитами и микроглией могут высвободиться молекулы α -син, АТФ, матриксная металлопротеиназа-3 и другие молекулы, усугубляя порочный круг НВ. Микроглия способна также распознавать различные формы α -син, после чего она поглощает этот нейротоксичный белок, активируется, а далее начинает продуцировать провоспалительные цитокины [91]. Интересно, что активированная микроглия способствует дальнейшей агрегации и распространению α -син между клетками, усиливая прогрессирование нейродегенерации [95].

При БП астроциты, подобно микроглии, переходят в реактивное состояние и начинают выделять провоспалительные цитокины, что также способствует нейродегенерации [149]. Также известно, что астроциты участвуют в распространении и удалении патологического α -син, а его накопление в астроцитах усиливает воспалительный ответ и повреждение нейронов [205]. Кроме того, микроглия может индуцировать переход астроцитов в нейротоксичный фенотип A1, что усиливает воспаление и гибель нейронов [149].

Таким образом, НВ является комплексным защитным механизмом, который в условиях нейродегенерации приобретает патологический характер и становится одним из звеньев патогенеза БП, способствуя дальнейшей гибели клеток.

1.1.5 Роль нарушений дофаминергической системы в патогенезе болезни Паркинсона

ДА является катехоламином, выполняющим нейромедиаторные функции. Он синтезируется дофаминергическими нейронами ЧС, аксоны которых проецируются в ПТ [121]. Подобно другим нейромедиаторам, после синтеза ДА хранится в синаптических везикулах и высвобождается из пресинаптической мембраны в синаптическую щель, где связывается с дофаминовыми рецепторами на постсинаптической мембране [121], активируя их и оказывая свое действие на различные клетки-мишени.

ДА выполняет множество разнообразных функций в организме: участвует в контроле координации движений, формировании памяти, а также в обучении, которое реализуется через систему вознаграждения [131]. В настоящее время известно, что большое разнообразие функций ДА обусловлено многочисленными проекциями от дофаминергических нейронов ЧС и вентрального отдела покрышки в различные участки головного мозга, которые можно подразделить на три основных нейронных пути: nigrostriatalный, meso-лимбический и мезокортикальный пути (Рисунок 2) [206].

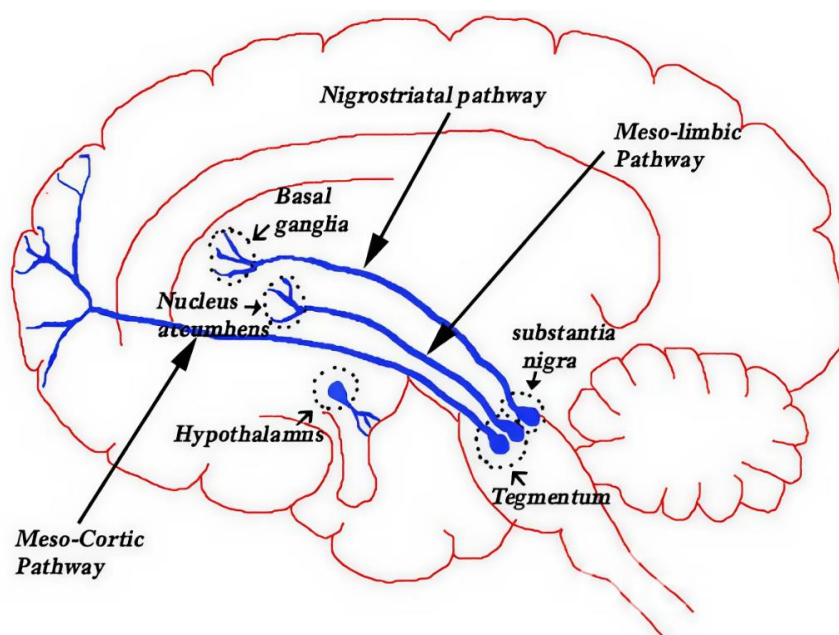


Рисунок 2 – Дофаминовые пути в центральной нервной системе [71]

Нигростриатный путь берет начало в ЧС и распространяется до хвостатого ядра и скорлупы дорсального ПТ. Этот путь играет ключевую роль в контроле движений и обучении двигательным навыкам. Характерные двигательные нарушения при БП связаны с дефицитом ДА именно в нигростриатном пути. В свою очередь, избыток ДА в этом пути вызывает гиперкинетические расстройства, такие как хорей (непроизвольные резкие движения) и похожие нарушения [206].

Мезолимбический путь берет начало в вентральной области покрышки и распространяется в префронтальную кору, прилежащее ядро, миндалевидное тело, поясную извилину, гиппокамп и обонятельную луковицу, а также в островковую кору [206]. В связи с большим количеством проекций, функции, выполняемые этим путем, также разнообразны. Например, иннервация миндалевидного тела и поясной извилины играет важную роль в формировании и обработке эмоций, а гиппокампа – в обучении и формировании долговременной памяти [206]. Кроме того, этот путь вовлечен в формирование мотивации и стремления к получению вознаграждения [206].

В свою очередь, в мезокортикальный путь вовлечена префронтальная кора, поэтому основной задачей этого пути является контроль исполнительных функций, а также планирование и принятие решений [206].

Кроме того, выделяют тубероинфундибулярный путь, имеющий проекцию от дофаминергических нейронов гипоталамуса до зоны срединного возвышения, в которой высвобождаемый ДА через сосудистую систему поступает в переднюю долю гипофиза [173]. Основная функция ДА в тубероинфундибулярном пути заключается в регуляции секреции пролактина [173].

Многогранное действие ДА реализуется через дофаминовые рецепторы, которые являются интегральными мембранными рецепторами, связанными с G-белком [140]. В настоящее время дофаминовые рецепторы подразделяются на 2 подкласса: D₁-подобные и D₂-подобные, которые, в свою очередь, подразделяются на 5 подтипов рецепторов, а именно D₁ и D₅, относящиеся к

D₁-подобным, D₂, D₃ и D₄ – к D₂-подобным [90]. Такое подразделение не случайно, оно обусловлено различным функционированием дофаминовых рецепторов, поскольку D₁-подобные рецепторы активируют аденилатциклазу через Gs-белки, а D₂-подобные – ингибируют этот же фермент через Gi-белки [90]. Это позволяет по-разному влиять на уровень циклического аденозинмонофосфата (цАМФ) в нейронах, что приводит к различным эффектам. Функциональные свойства дофаминовых рецепторов также зависят от их способности образовывать гомо- и гетеродимеры.

Вышеописанное демонстрирует, что дофаминергическая система головного мозга является сложноорганизованной, поэтому любое нарушение ее элементов приводит к утрате в норме выполняемых функций.

При БП нейродегенеративные изменения влияют на все этапы реализации действия ДА: от его синтеза до метаболизма и влияния на дофаминовые рецепторы. Функциональная активность дофаминергической системы утрачивается вследствие прогрессирующей нейродегенерации дофаминергических нейронов при БП, распространение которой индуцируется ранее описанными патологическими факторами, такими как агрегация и накопление α -син, митохондриальная дисфункция, нарушение убиквитин-протеасомной системы и НВ.

В норме синтез ДА осуществляется в пресинаптических нейронах и начинается с фенилаланина, который под действием фенилаланингидроксилазы превращается в тирозин. Тирозин под действием тирозингидроксилазы (ТГ) превращается в предшественник ДА – 3,4-дигидроксифенилаланин (ДОФА), который далее декарбоксилируется с образованием ДА [145]. У пациентов с БП наблюдаются нарушения на этапе синтеза ДА, о чем свидетельствует низкий уровень матричной рибонуклеиновой кислоты (мРНК) гена ТГ в ЧС по сравнению с таковым у здоровых людей [112]. Кроме того, снижение общего уровня белка ТГ в ПТ было более значительным, чем снижение общей активности фермента, что позволяет предположить усиление фосфорилирования ТГ для

компенсирования снижения уровня ДА при БП [112]. Касательно механизма, ответственного за нарушение работы ТГ, имеется предположение о вовлечении убиквитин-протеасомной системы, дисфункция которой наблюдается при БП [112].

После завершения синтеза ДА хранится в синаптических везикулах, в которые он проникает благодаря везикулярному моноаминовому транспортеру (vesicular monoamine transporter, VMAT). Особый интерес представляет VMAT2, основной функцией которого являются перенос ДА в везикулы и предотвращение его автоокисления в цитоплазме, то есть участие в нейротрансмиссии и защите ДА [41]. В подтверждение нейропротекторной роли VMAT2 можно привести снижение им патологических воздействий от экзогенных токсинов, например, МФТП [41]. Нарушение работы VMAT2 наблюдается при БП и связано с прогрессирующей дегенерацией nigrostriatalных дофаминергических нейронов. В недавних исследованиях при помощи позитронно-эмиссионной томографии было показано, что у пациентов с БП уровень VMAT2 значительно ниже, чем у здоровых людей [49]. Интересно отметить, что подобное снижение VMAT2 может быть обнаружено задолго до появления клинических симптомов, поэтому предлагается использовать определение VMAT2 в качестве биомаркера для мониторинга развития БП [49].

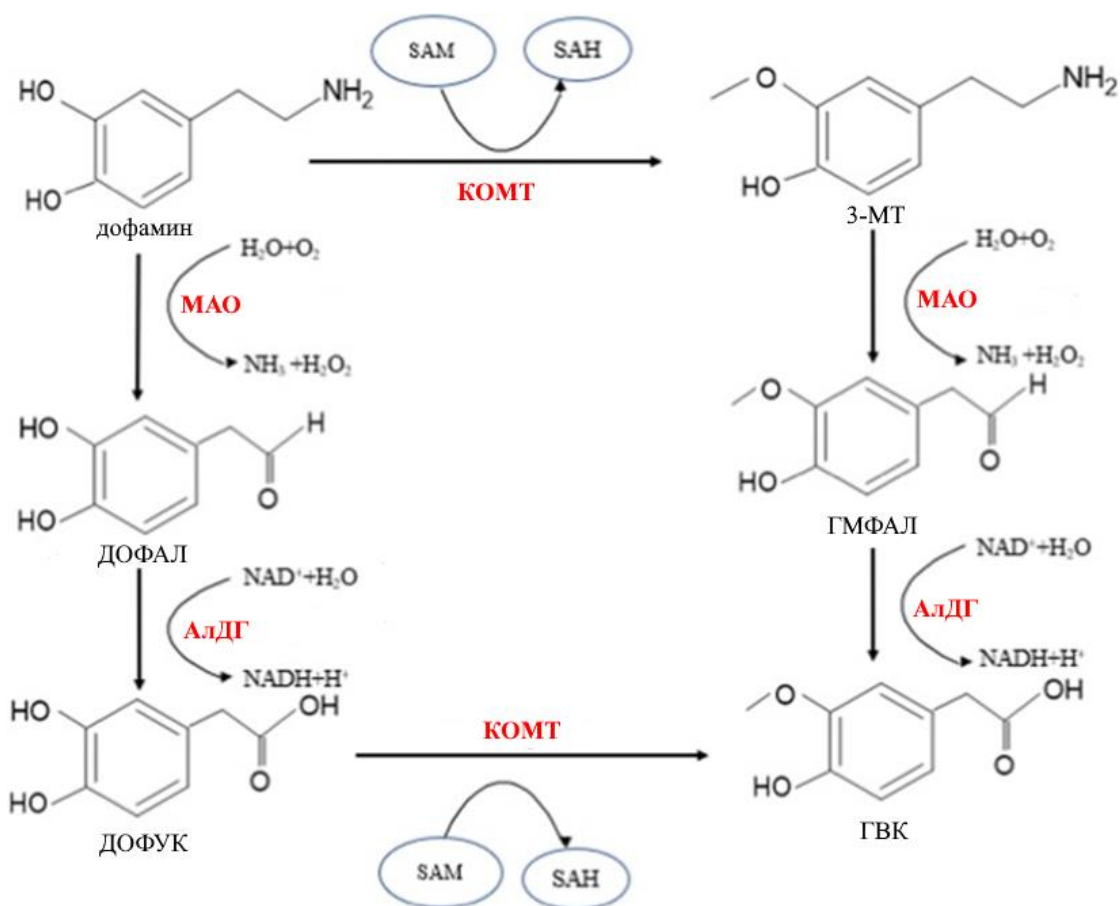
Выделение ДА в синаптическую щель происходит путем экзоцитоза из везикул, хранящихся в пресинаптическом окончании. Важно отметить, что ДА действует не только в области отдельных синапсов, но также на внесинаптических рецепторах, и, кроме того, может секретироваться из тела нейронов и дендритов посредством соматодендритного высвобождения [75]. При БП наблюдается нарушение секреции ДА на уровне экзоцитоза, перемещения, заполнения и рециркуляции везикул [75]. Отмечается также, что нарушения в высвобождении ДА наблюдаются до развития двигательных симптомов, поэтому этот патологический процесс можно рассматривать в качестве одного из пусковых факторов дисфункции дофаминергической

системы на ранних стадиях БП [75]. Более того, если высвобождение ДА снижено слишком выражено, то развиваются двигательные симптомы, поскольку содержание моноамина в ПТ падает ниже порога, который не может быть компенсирован другими факторами. Но является ли синаптическая дисфункция маркером, который лишь предвещает неминуемую гибель клеток, или же этот дефицит ДА оказывает пагубное влияние на жизнеспособность клеток, тем самым способствуя развитию нейродегенерации, все еще остается темой для дискуссий [75]. Однако, если дисфункция дофаминовых синапсов не просто сигнализирует о начале заболевания, но и способствует его прогрессированию, то будущие стратегии по восстановлению функций дофаминергической системы могут быть направлены именно на восстановление высвобождения ДА.

Когда наступает потребность в прекращении передачи сигнала, внеклеточный ДА должен быть удален из синаптической щели. Для этого моноамин либо подвергается обратному захвату через дофаминтранспортный белок (dopamine transporter, DAT), либо разрушается ферментными системами [145]. Кроме того, избыток ДА разрушается и в пресинаптическом нейроне посредством MAO. В результате окислительного дезаминирования с помощью MAO образуются H_2O_2 и 3,4-дигидроксифенилацетальдегид (ДОФАЛ), являющийся реакционно-активным соединением. Образующийся альдегид может быть инактивирован путем дальнейшего окисления до карбоновой кислоты 3,4-дигидроксифенилуксусной кислоты (ДОФУК) с помощью альдегиддегидрогеназы (Рисунок 3) [145]. Также он может быть восстановлен до спирта 3,4-дигидроксифенилэтанола под действием алкогольдегидрогеназы. Однако в физиологических условиях основным путем инактивирования ДОФАЛ является окисление до соответствующей карбоновой кислоты, в то время как превращение ДОФАЛ в соответствующий спирт происходит лишь в незначительной степени [145].

ДА из синаптической щели также поглощается окружающими глиальными клетками, которые используют MAO и КОМТ для деградации ДА.

КОМТ переносит метильные группы от S-аденозилметионина к гидроксильным группам различных катехоламинов и посредством 3-О-метилирования ДОФУК приводит к образованию гомованилиновой кислоты (ГВК) [145], одного из основных продуктов метаболизма ДА. Под действием КОМТ также образуется 3-метокситирамин (3-МТ), который в дальнейшем превращается в ГВК [121] (Рисунок 3). КОМТ активно функционирует в глиальных клетках, но в дофаминергических нейронах ЧС его активность отсутствует [145].



Примечания – SAM – S-аденозилметиозин, SAH – S-аденозилгомоцистеин, КОМТ – катехол-О-метилтрансфераза, MAO – моноаминоксидаза, ALDH – альдегиддегидрогеназа, ДОФАЛ – 3,4-дигидроксифеинлацетальдегид, ГМФАЛ – 4-гидрокси-3-метоксифеилацетальдегид, ДОФУК – 3,4-дигидроксифенилуксусная кислота, 3-МТ – 3-метокситирамин, ГВК – гомованилиновая кислота.

Рисунок 3 – Схема метаболизма дофамина (адаптировано из [121])

При терапии БП используются ингибиторы MAO и КОМТ, поскольку это позволяет замедлить процессы деградации ДА, что приводит к увеличению концентрации последнего и снижению выраженности двигательных

нарушений. Согласно данным некоторых исследований, при БП вследствие определенных мутаций (например, при потере функции DJ-1) может увеличиваться экспрессия MAO, а именно MAO-B, что способствует окислительному стрессу и гибели нейронов [133]. Кроме того, генетические полиморфизмы в генах MAO-B (например, rs1799836) и КОМТ (например, rs4680) приводят к побочным эффектам при терапии леводопой, что увеличивает частоту развития леводопа-индуцированных дискинезий у пациентов с БП [187, 238].

Наконец, дофаминергическая система при БП также повреждается в результате химических модификаций ДА. В присутствии кислорода и при высоком значении рН ДА может окисляться до о-хинонов, среди которых можно выделить дофамин-о-хинон, аминохром и 5,6-индолхинон [121]. Эти промежуточные соединения обладают нейротоксичными свойствами, поскольку способны взаимодействовать с α -син, приводя к инактивации DJ-1 с последующим развитием окислительного стресса [121]. Кроме того, они способны связываться с компонентами I, III и V дыхательной цепи переноса электронов, что способствует развитию митохондриальной дисфункции, а также инактивировать белок паркин, что приводит к нарушению убиквитин-протеасомной системы [121]. Таким образом, процессы автоокисления ДА могут способствовать развитию и прогрессированию нейродегенерации при БП.

1.2 Современная фармакотерапия болезни Паркинсона

Поиск новых методов фармакотерапии БП все еще остается актуальной задачей современной фармакологии ввиду того, что не существует эффективных ЛС, приводящих к полному излечению пациентов. Используемые в клинической практике препараты способствуют улучшению физического состояния больных, но не излечению [186].

В связи с недостаточной изученностью этиологии БП лечение сводится к патогенетической и симптоматической терапии [151]. При этом можно выделить три основные фармакотерапевтические стратегии: 1) дофаминергическая терапия, направленная на повышение содержания ДА, 2) антиглутаматергическая терапия и 3) антихолинергическая терапия [122].

1.2.1 Дофаминергическая фармакотерапия болезни Паркинсона

Дофаминергическая терапия реализуется препаратами, направленными на различные этапы биосинтеза и метаболизма ДА: с использованием предшественников ДА, стимуляцией дофаминовых D₂-рецепторов, а также угнетением катаболизма ДА.

Представителем группы предшественников ДА является широко используемый препарат леводопа. Леводопа, проходя ГЭБ и попадая в нейрональные тела, метаболизируется до дофамина посредством фермента ДОФА-декарбоксилазы [32]. Леводопа эффективно восполняет дефицит ДА и способствует устранению различных проявлений БП [182]. С целью повышения клинической эффективности терапевтических доз леводопы она одновременно может назначаться с ингибиторами ДОФА-декарбоксилазы, которые блокируют превращение леводопы в ДА только на периферии из-за невозможности пройти через ГЭБ, тем самым увеличивая биодоступность ДА в базальных ядрах, что в итоге приводит к потенцированию клинических эффектов ДА [32]. В качестве примера подобного ингибитора периферической ДОФА-декарбоксилазы можно привести карбидопу [92]. Несмотря на то, что леводопа является так называемым «золотым стандартом» лечения БП, необходимо отметить, что ее применение сопряжено с рядом побочных эффектов [110], среди которых можно выделить моторные флуктуации, выражающиеся резким переключением между состояниями с хорошим контролем движений и рецидивами двигательных нарушений, а также дискинезии, характеризующиеся произвольными движениями на более

поздних стадиях лечения [154]. В основе наблюдаемых явлений лежит уменьшение везикулярного депонирования ДА и пульсовые изменения его концентрации в нейронах [174]. Кроме того, имеются данные о развитии у 80% пациентов, длительное время принимающих леводопу, так называемого «парадоксального ухудшения», которое может проявляться усилением тремора, галлюцинациями и рядом других симптомов [54]. В настоящее время специалисты стараются сократить назначение леводопы пациентам с БП, особенно молодым пациентам и больным на ранних стадиях, в связи с описанными выше побочными эффектами [118].

Представителями группы ингибиторов MAO-B и КОМТ являются зонисамид, а также энтакапон, селегилин, сафинамид. Механизмы действия этих препаратов основаны на ингибировании ферментов КОМТ (энтакапон) и MAO-B (селегилин, зонисамид, сафинамид), что приводит к уменьшению катаболизма дофамина как в постсинаптическом нейроне за счет блокады КОМТ, так и в пресинаптическом нейроне путем блокирования работы MAO-B [181]. Важно отметить, что ярким побочным эффектом этих ЛС является возможное возникновение серотонинового синдрома при одновременном применении их с селективными ингибиторами обратного захвата серотонина [92]. Вышеперечисленные препараты используются для монотерапии, а также при моторных флуктуациях в составе комбинированной терапии [78]. Стоит отметить, что ингибиторы MAO-B больше назначаются в качестве монотерапии БП на ранних стадиях заболевания, а ингибиторы КОМТ практически неэффективны в монотерапии БП при любой стадии [92]. В настоящее время ингибиторы MAO-B и КОМТ применяются на ранних стадиях БП с преобладанием одного моторного симптома, например, выраженного тремора или дискинезии [153]. При более поздних стадиях БП ингибиторы ферментов деградации ДА могут использоваться в качестве комбинированной терапии для купирования моторных флуктуаций и дискинезий, вызванных длительным применением леводопы.

Одна из важнейших стратегий лечения БП заключается во влиянии на дофаминовые рецепторы постсинаптической мембраны для стимуляции передачи импульса по нейронам в условиях дефицита ДА. Препаратами группы агонистов дофаминовых рецепторов являются различные по химической структуре вещества, например, производное эрготамина бромокриптин, а также апоморфин, ропинирол и прамипексол. Фармакологическое действие ЛС данной группы достигается за счет связывания с D₂- и D₃-рецепторами на постсинаптической мембране нейронов, приводя к активации G-белка и уменьшению образования цАМФ, что оказывает сходное действие с ДА [211]. Связывание с дофаминовым рецептором приводит к стимуляции выработки ацетилхолина из холинергических нейронов, что, в свою очередь, приводит к осуществлению произвольного движения. Отмечается, что эффективность агонистов дофаминовых рецепторов была выражена как в монотерапии, так и при комбинированном использовании с леводопой [55]. Несмотря на довольно высокую эффективность препаратов данной группы, необходимо отметить, что в связи с пульсовой гиперстимуляцией дофаминовых рецепторов пациенты подвержены риску развития обсессивно-компульсивного расстройства, галлюцинаций и психозов [152]. На более поздних стадиях, когда обосновано постоянное длительное введение леводопы, использование комбинированной терапии с агонистами дофаминовых рецепторов приводит к купированию леводопа-индуцированной дискинезии [68].

1.2.2 Антиглутаматергическая фармакотерапия болезни Паркинсона

Немаловажными ЛС при лечении БП являются производные адамантана – амантадин и мемантин. Фармакотерапевтический эффект этих соединений основан на многонаправленности их действия. Так, амантадин блокирует NMDA-рецепторы, что приводит к угнетению глутаматной эксайтотоксичности, уменьшает поток ионов кальция внутрь нейронов, что

приводит к снижению возбудимости холинергических нейронов и, как следствие, уменьшению выраженности тремора покоя [176]. Помимо этого, амантадин является аллостерическим модулятором постсинаптических D₂-рецепторов, за счет чего увеличивает сродство рецептора к ДА и увеличивает эффекторное действие нейромедиатора. Также амантадин является ингибитором обратного нейронального захвата ДА путем блокады пресинаптических D₂-рецепторов, что увеличивает время действия моноамина в синапсе [159, 200]. Мемантин, в свою очередь, также является блокатором NMDA-рецепторов, однако он также оказывает влияние на экспрессию генов дофаминовых рецепторов, вследствие чего увеличивает их синтез в ПТ [115]. Также мемантин способен оказывать прямое угнетающее действие на воспалительное звено в процессе нейродегенерации при БП, снижая секрецию микроглией провоспалительных цитокинов. Помимо этого, он активирует синтез нейротрофических факторов астроцитами, модулирует сигнальные пути, связанные с ядерными рецепторами Nur77 и Nurr1, что приводит к снижению митохондриального стресса [232, 233]. Производные адамантана широко используются в качестве средств для комбинированного лечения БП с леводопой. Также на любой стадии БП адамантаны эффективно устраняют дискинезию и некоторые другие моторные нарушения [179]. Сообщается о хорошей переносимости производных адамантана, сравнительно небольших побочных эффектах и относительно высокой терапевтической эффективности препаратов [162].

1.2.3 Антихолинергическая фармакотерапия болезни Паркинсона

Нельзя не упомянуть и группу антихолинергических средств, яркими представителями которой являются тригексифенидил (циклодол) и бипериден (акинетон). Механизм действия тригексифенидила до сих пор остается неизученным, однако его связывают с блокадой центральных М-холинорецепторов в головном мозге и проводящих пучках ствола мозга, что

приводит к угнетению нервно-мышечной проводимости и уменьшению дрожательных движений, наблюдаемых при треморе покоя [113]. Применение холиноблокаторов осложняется достаточно низкой эффективностью при использовании их в монотерапии, а также из-за высокой токсичности и опасных побочных эффектов, развивающихся в ходе комбинированной терапии с леводопой и препаратами других групп [113]. Среди побочных эффектов, снижающих вероятность назначения тригексифенидила, можно выделить развитие галлюцинаций, угнетение моторики и секреторной функции желудочно-кишечного тракта, а также развитие толерантности и лекарственной зависимости.

Подводя итог всему вышесказанному, стоит отметить, что в современных реалиях имеет место увеличение терапевтической тактики, направленной на применение комбинированного введения противопаркинсонических средств, центральным звеном которой остается назначение леводопы, а также препаратов, уменьшающих прогрессирование и силу двигательных нарушений, развивающихся на фоне длительного приема леводопы. В связи с этим встает вопрос о разработке и исследовании противопаркинсонических свойств новых молекул, способных заменить леводопу, которая, хоть и является эффективным препаратом для поддержания состояния больных при БП, имеет риски развития серьезных побочных эффектов.

1.3 Фармакологические свойства ладастена, обуславливающие его потенциальное антипаркинсоническое действие

Ладастен (бромантан, N-(2-адамантил)-N-пара-бромфенил)-амин), представляющий собой производное адамантана, был синтезирован и фармакологически изучен в ФГБНУ «ФИЦ оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий» (Москва, Россия) и продемонстрировал психостимулирующие, иммуностимулирующие и

актопротекторные свойства [6]. В дальнейших исследованиях было показано также наличие анксиолитического эффекта. Так, в исследованиях с использованием тестов «открытое поле» и «приподнятый крестообразный лабиринт» на мышах показано анксиолитическое действие у мышей линии BALB/c [191, 192], в отличие от мышей линии C57Bl/6, что может свидетельствовать о более избирательном воздействии в отношении животных с пассивным типом реакции на эмоционально-стрессовое воздействие. Анксиолитический эффект был также продемонстрирован в тесте «открытое поле» на самцах крыс линии MR при введении ладастена внутривнутрибрюшинно в дозе 30 мг/кг, в отличие от линии MNRA [36]. Кроме того, ладастен восстанавливал способность мембран клеток крыс MR увеличивать рецепцию [³H]-дiazепама при добавлении ГАМК, то есть предотвращал нарушения регуляции лигандного связывания в бензодиазепиновом участке ГАМК_A – рецепторного комплекса [35]. Таким образом, установлено наличие анксиолитического действия на лабораторных животных, причем с направленностью на пассивный фенотип эмоционально-стрессового ответа.

В качестве фармакологически значимой мишени действия ладастена установлен транспортер ГАМК – GAT3, функции которого заключаются в поддержании оптимального внеклеточного уровня ГАМК посредством обратного захвата из синаптического пространства. Ладастен способен ингибировать экспрессию гена *Gat3*, тем самым оказывая влияние на процессы обратного захвата ГАМК, что согласуется с ранее полученными экспериментальными данными о вовлечении ГАМК-ергической системы в реализацию анксиолитических свойств препарата [6].

1.3.1 Влияние ладастена на дофаминергические процессы

Имеются данные о дофаминпозитивном эффекте ладастена, что может являться объяснением его психостимулирующей активности, и, что более важно, одним из механизмов действия в качестве потенциальной терапии при

БП. Так, показана способность ладастена стимулировать высвобождение ДА (240–355% по сравнению с исходным уровнем) в дорсальной части ПТ крыс [99]. Также было показано снижение содержания метаболитов ДА, а именно ДОФУК и ГВК, однако в меньшей степени, чем под действием амфетамина, что свидетельствует о способности ладастена повышать синтез ДА при снижении истощения пула вновь синтезированного нейромедиатора за счет предположительного пресинаптического антагонизма препарата и его влияния на обратный захват ДА. В подтверждении вышесказанного свидетельствуют данные об ингибирующем влиянии тетродотоксина на повышенное высвобождение ДА *in vivo* при действии ладастена, в то время как высвобождение нейромедиатора, вызываемое амфетамином, не чувствительно к тетродотоксину [99].

Способность ладастена влиять на обратный захват ДА также была показана *in vitro* на препаратах ПТ мозга крыс с использованием меченного [³H]-ДА – ингибирование наблюдалось в микромолярном диапазоне концентраций, что свидетельствует о «мягком» ингибировании синаптосомального захвата нейромедиатора [11].

В дальнейших исследованиях, посвященных анализу синтеза и метаболизма ДА под действием ладастена, показано, что в условиях *ex vivo* препарат вызывал достоверное увеличение ДОФА и ДА в гомогенате ПТ на 40% и 20% соответственно от контрольного значения. Кроме того, в условиях *ex vivo* была установлена способность ладастена ускорять выход ДА до 30% по сравнению с контролем, а также увеличивать высвобождение ДОФУК до 70% относительно контроля [11]. Далее вновь в *in vivo* экспериментах установлено повышение уровня ДОФА во фронтальной коре, прилежащем ядре, ПТ и гипоталамусе при введении ладастена [8]. Помимо этого, обнаруживались изменения концентрации ГВК (возрастание на 45% в прилежащем ядре и снижение до 52% в гипоталамусе по сравнению с контролем), при этом показатель утилизации ГВК/ДА в прилежащем ядре возрастал на 148%, а в гипоталамусе снижался на 40% по сравнению с

контролем. Соотношение же ДОФУК/ДА возрастало более чем в 2,5 раза в гиппокампе [8]. Все полученные данные свидетельствуют о влиянии ладастена на процессы биосинтеза и метаболизма дофамина с преимущественным увеличением содержания нейромедиатора в различных структурах головного мозга.

Увеличение уровня ДОФА под влиянием ладастена может свидетельствовать о преимущественном влиянии на ТГ. Было показано, что ладастен модулирует экспрессию генов ТГ и ДОФА-декарбоксилазы в клетках ПТ и гипоталамуса при однократном введении перорально в дозе 50 мг/кг, причем максимальное воздействие препарата на экспрессию происходит через 1,5 ч после введения [4]. Индукция транскрипции генов ТГ и ДОФА-декарбоксилазы уже через 0,5 ч после введения ладастена свидетельствует о потребности в компенсаторном синтезе ДА, а увеличение экспрессии через 1,5 ч свидетельствует об активации биосинтеза ТГ и ДОФА-декарбоксилазы *de novo* [4]. Все вышесказанное позволяет причислить ладастен к веществам «неистоющего» действия, в отличие от «классических» психостимуляторов, а также свидетельствует о длительности эффектов препарата, что чрезвычайно важно при лечении нейродегенеративных заболеваний, сопровождающихся истощением пула ДА и гибелью дофаминергических нейронов. Помимо тканеспецифической регуляции экспрессии гена ТГ рассматривается возможность действия ладастена через эпигенетические механизмы, в частности, посредством влияния на характер метилирования цитозина в CpG-динуклеотидах промоторной области, а именно увеличением частоты деметилирования остатков цитозина CRE-последовательности в промоторной области гена ТГ [6].

Касательно вопроса о тропности ладастена к рецепторам установлено, что препарат не имеет прямого влияния на дофаминовые рецепторы ПТ D₁-, D₂- и D₃-подтипов, что было показано в эксперименте *in vitro* [11]. Однако, в настоящее время имеются данные о тропности препарата к D₃-подтипу рецепторов ДА ПТ, считающихся пресинаптическими ауторецепторами, что

также может являться подтверждением участия ладастена в ингибировании обратного захвата нейромедиатора [6, 8].

Таким образом, вышеприведенные данные свидетельствуют о положительном дофаминергическом влиянии ладастена, что позволяет предположить у него наличие антипаркинсонической активности. Однако, подобное воздействие ладастена на дофаминергическую систему было показано только на здоровых животных, в связи с чем необходимо подтверждение этой гипотезы в условиях моделирования БП.

1.3.2 Влияние ладастена на экспрессию генов и белков

Доказана способность ладастена вызывать изменение экспрессионного статуса генов, кодирующих различные в структурном и функциональном отношении белки [5]. Так, поиск генов, экспрессия которых в мозге крыс изменяется при однократном введении ладастена в дозе 50 мг/кг осуществлялся при помощи макрочипов на основе комплементарной ДНК, а дальнейшее подтверждение дифференциальной экспрессии – посредством полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией. В итоге количественный анализ выявил 26 генов с достоверным изменением уровня экспрессии после введения ладастена [5].

Некоторые гены, транскрипционная активность которых индуцируется ладастеном, могут рассматриваться в качестве мишеней, имеющих самостоятельное фармакологическое значение. Так, показана способность ладастена ингибировать экспрессию генов, кодирующих ферменты аэробного гликолиза, а именно нейронспецифическую енолазу и глицеральдегид-3-фосфат-дегидрогеназу (GAPDH), что может быть связано со снижением интенсивности гликолиза при уменьшенном поступлении глюкозы в клетки головного мозга [5]. Под влияние ладастена попадают также гены компонентов пептидергической системы, а именно карбоксипептидаза Н, рецептор галанина 3 и ген предшественника гипокретина, которые,

предположительно, принимают участие в реализации психостимулирующих, анксиолитических и нейротропных свойств препарата [6]. Изменение экспрессионного статуса генов, кодирующих белки синаптических везикул (syn 1A&1B), миелина (PLP), цитоскелета (*tuba1*, *actin*) возможно отражает вклад ладастена в поддержание уровня синаптической активности и усиление нейропластичности [5].

Способность ладастена влиять на процесс гликолиза в головном мозге подтверждается влиянием на экспрессию белков-ферментов гликолитического метаболизма. Подобное незначительное ингибирование альдолазы 2 и GAPDH может свидетельствовать о снижении гликолиза в головном мозге в ответ на введение ладастена [6], что соответствует ранее описанному воздействию препарата на экспрессию генов-ферментов гликолиза. Кроме того, была показана способность ладастена снижать уровень глюкозы и инсулина в крови при всех типах введения [6].

Несмотря на достаточно большое количество изменений экспрессионных профилей генов под действием ладастена, нельзя исключать отсутствие прямой корреляции между транскрипционной активностью гена и уровнем кодируемого им белка. Поэтому, для поиска потенциальных мишеней воздействия ладастена были проведены поиск и идентификация белков в клетках головного мозга крыс. При помощи 2D-электрофореза и матрично-активированной лазерной десорбционно-ионизационной времяпролетной масс-спектрометрии (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry; MALDI-TOF-масс-спектрометрия) было показано влияние ладастена на уровень экспрессии 14 белков в мозге крыс при однократном внутрибрюшинном введении препарата в дозе 50 мг/кг, среди которых можно выделить следующие функциональные группы: белки-шапероны, стрессовые белки, синаптические белки и белки-ферменты гликолитического метаболизма [6, 236].

Одним из важных механизмов в реализации фармакологических эффектов ладастена можно считать воздействие на экспрессию ряда белков-

шаперонов. Установлено, что ладастен увеличивает экспрессию белка теплового шока HSP-70, вазолизин-содержащего белка, белка комплекса 26S-протеасом [6]. Как известно, дисфункция HSP-70, отражением которой в том числе является низкое содержание данного белка в ЧС, является одной из главных составляющих патогенеза БП, поскольку может приводить к нарушению защитного механизма деградации токсичных белковых агрегатов, таких как α -син [242]. В подтверждение важной роли данного шаперона при БП можно привести экспериментальные данные, подтверждающие способность HSP-70 ингибировать образование фибрилл α -син, тем самым уменьшая его потенциальную токсичность [214]. Снижение эффективности комплексов 26S-протеасом, а также ассоциированных с ними белков убиквитин-протеасомной системы (в том числе вазолизин-содержащего белка), также может приводить к нарушению деградации белков и накоплению токсичного α -син, что является еще одним механизмом нейродегенерации при БП [72].

Влияние ладастена на увеличение экспрессии синаптических белков, в частности, тубулина, α -интернексина, легкой цепи А клатрина, белка-медиатора 2 коллапсинового ответа, нейронального белка 22 свидетельствует об усилении нейрональной активности, вероятно, посредством интенсификации процессов экзо- и эндоцитоза, транспорта между аппаратом Гольджи и цитоплазматическими элементами, взаимодействия между элементами цитоскелета [6].

Учитывая все вышеперечисленное, можно сделать предположение о возможном наличии антипаркинсонической активности ладастена посредством влияния на гликолиз и экспрессию белков-шаперонов. Известно, что при БП наблюдается усиление гликолиза в астроцитах и нейронах при сниженном общем уровне метаболизма и повышенной местной концентрации глюкозы [125], что может быть связано с митохондриальной дисфункцией. Снижение интенсивности гликолиза под действием ладастена, а также усиление экспрессии белков-шаперонов потенциально может лежать в основе

цитопротекторного воздействия при нейродегенеративных изменениях, наблюдаемых у пациентов с БП.

1.3.3 Влияние ладастена на пострецепторные пути передачи сигнала

Влияние на внутриклеточные пути передачи сигнала имеет большое значение для понимания механизма действия и установления конечных мишеней ЛС. В настоящее время накоплены экспериментальные данные, свидетельствующие о воздействии ладастена на 4 различных типа протеинкиназ.

Показано активирующее воздействие ладастена на РКС. Однократное внутрижелудочное введение ладастена в виде суспензии в дозе 50 мг/кг приводит к увеличению активности данного фермента, причем более чем в 2,5 раза, спустя 30 минут после введения [2]. В связи с тем, что высокая концентрация кальция является условием активации РКС, можно предположить наличие влияния ладастена на мембранные и цитозольные кальциевые каналы. В подтверждение кальций-зависимого эффекта у ладастена имеется ряд экспериментальных данных: 1) при введении дополнительных ионов кальция в реакционную среду не наблюдалось значимого повышения активности РКС; 2) зафиксировано резкое снижение активности РКС к 1,5 ч после введения ладастена с дальнейшим повышением активности фермента в присутствии ионов кальция; 3) при селективном блокировании Ca^{2+} -каналов циннаризином (кальциесомы ЭПР) и нифедепином (мембранные каналы) наблюдалось ингибирование активности РКС; 4) показано участие Ca^{2+} -АТФазы в поддержании оптимальной концентрации ионов кальция в клетках головного мозга крыс через 0,5 ч после введения ладастена и в интервале от 8 до 12 ч (первый и второй максимум увеличения активности РКС) [2]. Следует также отметить возможное воздействие ладастена на рецепторы, сопряженные с фосфолипазой С, что может также являться объяснением повышения активности РКС [6]. Учитывая

все вышесказанное, можно предположить наличие у ладастена влияния на липидные компоненты и мембрано-рецепторные взаимодействия, что в итоге приводит к изменению ионной проводимости, повышению концентрации вторичных мессенджеров и дальнейшей передачи сигнала. Способность же ладастена к взаимодействию с мембранами подтверждается его физико-химическими свойствами и фармакокинетическими особенностями, среди которых можно отметить высокую липофильность, способность накапливаться в липидах и предотвращать мембранозависимые нарушения в ГАМК_A-бензодиазепиновом рецепторном комплексе, а также быстрое проявление биологических эффектов [2]. Таким образом, активация фосфоинозитидного каскада, являющегося мембранозависимым, а также приводящего к развитию Ca²⁺-зависимых процессов является одним из этапов механизма действия ладастена.

Еще одним значимым влиянием ладастена на пострецепторные пути передачи сигнала можно считать его воздействие на цАМФ-зависимые протеинкиназы. Так, было установлено изменение активности РКА в первые часы действия ладастена при введении внутрь в дозе 50 мг/кг, при этом наибольшее увеличение (около 10%) выявлялось при одно- и шестичасовом воздействии [3]. Воздействие ладастена на аденилатциклазную систему является еще одним звеном в формировании большого спектра нейротропной активности препарата, кроме того, подобные влияния могут являться не первичными с точки зрения механизма действия, а быть обусловлены изменением концентрации гормонов и нейромедиаторов. Примечательно также проявление активности РКА через 0,5, 2 и 12 ч при введении препарата, которая не подавляется специфичным ингибитором фермента, что свидетельствует о вовлечении других сигнальных путей в механизм действия [3].

Ладастен влияет на компоненты сигнального каскада MAPK, являющегося путем сигнальной трансдукции при активации тирозинкиназных рецепторов ростовых факторов. Так, показано увеличение уровня ERK1/2 в

гипоталамусе, ПТ и гиппокампе крыс уже через 0,5 ч после однократного внутрижелудочного введения препарата в дозе 50 мг/кг [24]. Примечательно также, что максимум активности киназ достигается через 1,5 ч после введения ладастена во всех исследованных структурах головного мозга [24]. Стоит отметить, что уровень pERK1/2 в гиппокампе поддерживается на протяжении всего периода наблюдений (2,5 ч), свидетельствуя о раннем включении и стабильной активности MAPK-зависимого сигнального каскада под действием ладастена. Изучение влияния ладастена на экспрессию генов BDNF и фактора роста нервов (nerve growth factor, NGF) и дальнейшее сопоставление с уровнем ERK1/2 позволяет предположить зависимость от ростовых факторов активацию сигнального каскада, поскольку наблюдается повышение уровня мРНК BDNF через 1,5 ч после введения препарата в ПТ. Однако, учитывая ранее рассмотренные воздействия ладастена на сигнальные пути, в том числе затрагивающие РКС и ионы Ca^{2+} , которые также связаны с MAPK-каскадом, предполагается преимущественная Ca^{2+} -опосредованная активация ERK1/2. Таким образом, ладастен индуцирует передачу внутриклеточных сигналов посредством митоген-зависимого каскада, который, в свою очередь, взаимодействует с другими (цАМФ-, Ca^{2+} -зависимыми) сигнальными системами, приводя к различным влияниям на биохимические процессы в клетке.

Учитывая вышесказанное, а также наличие положительной модуляции дофаминергической нейротрансмиссии ладастеном, можно заключить, что препарат оказывает влияние через посредников внутриклеточной передачи сигналов, а именно РКС, цАМФ и MAPK, что опосредует фосфорилирование ТГ с последующим увеличением высвобождаемого ДА. Эти свойства ладастена позволяют предположить наличие потенциального противопаркинсонического действия.

Таким образом, все вышеперечисленные свойства ладастена указывают на наличие у него потенциальной антипаркинсонической активности. Экспериментальное подтверждение подобного действия ладастена, а также

комбинации его с фабомотизолом, является задачами данной диссертационной работы.

1.4 Фармакологические свойства фабомотизола, обуславливающие его потенциальное антипаркинсоническое действие

Фабомотизол (5-этокси-2-[2-(морфолино)-этилтио]бензимидазола дигидрохлорида), представляющий собой производное бензимидазола, был синтезирован и фармакологически изучен в ФГБНУ «ФИЦ оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий» (Москва, Россия). Фабомотизол обладает разнообразными фармакологическими эффектами, из которых нейротропными являются анксиолитические, антидепрессивно-подобные и нейропротекторные. Анксиолитическое действие фабомотизола является избирательным и зависит от фенотипа реакции на стресс: он активизирует поведение мышей линии BALB/c с реакцией замирания в новой обстановке, при этом не влияя на мышей линии C57Bl/6 с активным исследовательским поведением [25]. Кроме того, было установлено, что анксиолитический эффект сопровождается восстановлением бензодиазепиновой рецепции в тесте «приподнятый крестообразный лабиринт» только у мышей BALB/c, а в тесте «контакт с хищником» – у мышей обеих линий [36]. Антидепрессивно-подобное действие фабомотизола было показано в тесте «вынужденное плавание» на самцах беспородных крыс [31]. Нейропротекторные свойства фабомотизола показаны на моделях различных патологий, в частности, фабомотизол повышал выживаемость нейронов гиппокампа HT-22 на моделях окислительного стресса, глутаматной токсичности [10] и выживаемость кортикальных нейронов, инкубированных с амилоидом A β 25-35 [51], ослаблял неврологические нарушения на крысиной модели геморрагического инсульта [30] и уменьшал очаг поражения на модели фокальной ишемии головного мозга крыс [27]. Наибольший интерес представляет потенциальное антипаркинсоническое действие фабомотизола,

связанное с нейропротекторными свойствами, реализуемыми за счет его воздействия на такие мишени как Sigma-1R, NQO2 и нейротрофины.

1.4.1 Влияние фабомотизола на белок-шаперон Sigma-1 рецептор

Sigma-1R – это многофункциональный трансмембранный белок-шаперон, который в основном находится на мембране ЭПР, где он регулирует функцию инозитол-3-фосфатного рецептора, тем самым стабилизируя кальциевую передачу сигналов между ЭПР и митохондриями [134]. При этом наибольшая функциональная активность отмечается на границе между ЭПР и митохондриями, также известной как митохондриально-ассоциированная мембрана ЭПР. Нарушения в работе Sigma-1R-опосредованных путей способствуют развитию и прогрессированию нейродегенеративных заболеваний, таких как эпилепсии, боковой амиотрофической склероз, БА и болезнь Хантингтона [197]. Кроме того, Sigma-1R были обнаружены в ЧС и в ПТ, а их количество может значительно снижаться у пациентов с БП [166]. В частности, было показано, что у мышей с нокаутом Sigma-1R наблюдаются возрастные двигательные нарушения и дегенерация дофаминергических нейронов, возможно, из-за агрегации и фосфорилирования α -син [166].

При этом модулирование активности Sigma-1R является перспективным подходом к поиску потенциальных соединений, обладающих антипаркинсонической активностью [198]. Это обусловлено, в первую очередь, нейропротекторными функциями данного шаперона. Так, при нейродегенерации из-за нарушения протеасомного удаления агрегатов α -син возникает ЭПР-стресс. В подобных условиях шаперон Sigma-1R диссоциирует от шаперона BiP и стабилизирует ЭПР сенсор IRE1, что в конечном счете способствует индукции экспрессии шаперонов и белков антиоксидантной защиты [198]. Снижение микроглиоза, глутаматной эксайтотоксичности и окислительного стресса – важных патогенетических звеньев БП, также наблюдается при активации Sigma-1R [198]. Стоит отметить, что вне ЭПР-

стресса Sigma-1R остается связанным с ViP и является неактивным [150], поэтому именно активация Sigma-1R может способствовать оказанию нейропротекторного воздействия при БП.

Фабомотизол является лигандным активатором Sigma-1R [29], что, вероятно, может объяснить его нейропротекторные свойства. Касательно БП, было показано, что внутрибрюшинное введение мышам фабомотизола (2,5 мг/кг) на протяжении двух недель после унилатеральной интрастриатной инъекции 6-гидроксидофамина (6-ГОДА) способствовало восстановлению уровня ДА в поврежденном ПТ, нормализации двигательной активности животных в тесте «вращающийся стержень» и предотвращению гибели тирозингидроксилаза-позитивных (ТГ⁺) нейронов [225]. Доказательством вовлечения именно лигандной активации Sigma-1R в вышеописанные эффекты препарата можно считать заметное снижение их выраженности при одновременном введении фабомотизола с антагонистом Sigma-1R BD-1047 [225]. Стоит также отметить, что в этом же исследовании положительное влияние фабомотизола было сходным с действием агониста Sigma-1R PRE-084 [225]. Антипаркинсоническое действие фабомотизола при внутрибрюшинном введении наблюдалось на моделях МФТП- и ротенон-индуцированных ПС, что также, вероятно, связано с активирующим влиянием на Sigma-1R [17]. Кроме того, фабомотизол снижал миграцию микроглиальных клеток в ответ на хемотаксис, вызванный АТФ и уридинтрифосфатом (УТФ), а ингибирование Sigma-1R предотвращало данное воздействие [76]. Также фабомотизол снижал повышение уровня внутриклеточного кальция, вызванное локальным применением АТФ и УТФ и блокировал мембранные токи, вызванные быстрым введением АТФ в клетки микроглии. В основе вышеперечисленного влияния на микроглию, вероятно, лежит блокирование пуринергических рецепторов под действием Sigma-1R, который, в свою очередь, активировался фабомотизолом [76].

Цитопротекторный эффект, опосредованный влиянием фабомотизола на Sigma-1R, зафиксирован также на модели гипоксии *in vitro* с использованием

антагонистов Sigma-1R: под действием препарата снижалась гибель клеток микроглии во время гипоксического эпизода и после 24-часового периода восстановления, а также наблюдалось повышение выживаемости клеток при использовании фабомотизола даже после гипоксии [76]. На модели клеточного повреждения под действием менандиона, оцениваемого методом ДНК-комет, было показано, что фабомотизол снижал уровень повреждений ДНК, причем даже более выражено по сравнению с PRE-084, а кроме того, данный эффект нивелировался добавлением антагониста Sigma-1R, а именно BD-1047 [224].

Таким образом, нейропротекторный эффект фабомотизола в условиях нейродегенерации опосредован в том числе его влиянием на Sigma-1R.

1.4.2 Влияние фабомотизола на фермент хинон-редуктазу 2 (NQO2)

По всей видимости, в реализацию нейропротекторных свойств фабомотизола вовлечено влияние не только на Sigma-1R, но также и на NQO2. Данный фермент представляет собой флавопротеин, особенностью которого является использование дигидроникотинамидных ко-субстратов [108]. С функциональной точки зрения физиологическая роль этого фермента остается спорной, и некоторые данные указывают на его как детоксикационную, так и потенциально токсическую активность, особенно в контексте образования АФК [108]. Так, NQO2 участвует в детоксикации хиноновых производных катехоламинов, катализируя их двухэлектронное восстановление, но образующиеся в ходе ферментативной реакции гидрохиноны подвергаются автоокислению до семихинонов, которые, в свою очередь, способны передавать свой неспаренный электрон молекулярному кислороду с образованием супероксид-аниона [223]. Учитывая вовлеченность NQO2 в образование АФК, он участвует в патогенезе нейродегенеративных заболеваний, в частности БП и БА [109]. Определенные полиморфизмы NQO2 связаны с повышенным риском развития этих заболеваний [109]. Кроме того,

недостаточный уровень антиоксидатной защиты, обусловленной митохондриальной дисфункцией и истощением глутатиона при БП [53], способствует протеканию реакций с участием NQO2, приводящих к увеличению выработки свободных радикалов. Активность NQO2 также негативно влияет на нейропротекторные процессы и аутофагию в астроцитах, способствуя дофаминергической дегенерации, а направленное ингибирование этого фермента нивелирует данные нарушения [109].

NQO2 имеет мелатонин-зависимый регуляторный сайт (MT-3 рецептор) [58]. Фабомотизол является лигандом MT-3 рецептора, а также способен ингибировать NQO2, причем сопоставимо с мелатонином [13]. В условиях клеточного повреждения, опосредованного менандионом, фабомотизол и его метаболит М-11, специфически связывающийся с MT-3 рецептором, снижали уровень повреждений ДНК [15]. Причем фабомотизол был эффективен в меньших концентрациях, чем М-11. Также, на мышинной модели 6-ГОДА-индуцированного ПС было показано, что внутрибрюшинное введение в течение 14 дней фабомотизола и М-11 оказывало нейропротекторное воздействие [163]. Эти результаты согласуются с влиянием указанных веществ на модели менандионового клеточного повреждения, поскольку фабомотизол снова был эффективен в дозе 2,5 мг/кг, а М-11 лишь при увеличении дозы до 7,5 мг/кг вызывал нормализацию двигательной активности животных, восстановление уровня ДА в ПТ и увеличение количества ТГ⁺ нейронов ипсилатеральной ЧС [16]. Кроме того, метаболит фабомотизола М-11 сам способен оказывать ингибирующее влияние на NQO2 [14].

Таким образом, вышеописанные исследования демонстрируют роль ингибирования NQO2 в развитии нейропротекторного действия фабомотизола. Однако, учитывая его эффективность в меньших дозах по сравнению с М-11, а также изучение влияния фабомотизола с лигандами Sigma-1R в условиях нейродегенерации, можно утверждать, что защитное действие препарата обусловлено, скорее всего, совместной фармакологической регуляцией Sigma-1R и NQO2.

1.4.3 Влияние фабомотизола на нейротрофины

Нейротрофины являются семейством нейрональных трофических факторов, в которое входят BDNF, NGF, нейротрофин-3 и нейротрофин-4. Эти белки необходимы для развития и функционирования ЦНС, при этом NGF в основном связывается с тропомиозин-рецепторной киназой А (tropomyosin receptor kinase A, TrkA), способствуя выживанию и дифференцировке симпатических и сенсорных нейронов, в то время как BDNF – с тропомиозин-рецепторной киназой В (tropomyosin receptor kinase B, TrkB), поддерживая синаптическую пластичность, формирование памяти и выживание различных нейронов ЦНС [104]. В головном мозге BDNF является хорошо изученным и наиболее экспрессируемым из всех нейротрофинов. Известно также о том, что астроциты принимают активное участие в активации опосредованных BDNF сигнальных путей, способствуя синаптической пластичности [38]. Кроме того, BDNF способствует выживанию миелинизирующих клеток и ремиелинизации [234].

Снижение уровня BDNF приводит к нарушению функционирования и выживаемости нейронов, поэтому его дефицит связан с развитием нейродегенеративных заболеваний [104], в частности БП и БА. Аналогичное утверждение справедливо и для NGF [73]. Так, нейротрофины могут стать потенциально новыми средствами для лечения БП, поскольку могут регенерировать определенные популяции нейронов, утраченные при нейродегенеративных заболеваниях [57]. Проблема их использования заключается в необходимости вводить данные белки напрямую в головной мозг из-за плохого проникновения через ГЭБ [57], в связи с чем предпринимаются попытки разработать специальные системы доставки, в частности посредством использования наночастиц. Помимо нарушений в работе нейротрофинов, при БП наблюдается дефицит TrkB, что способствует дегенерации дофаминергических нейронов и накоплению α -син в ЧС, а также снижается передача сигналов BDNF/TrkB [39]. Поэтому воздействие на

сигнальный путь BDNF/TrkB с помощью специфических активаторов также рассматривается в качестве перспективной терапии БП.

Имеются данные о влиянии фабомотизола на уровень BDNF в условиях стресса. Так, было показано, что для мышей линии BALB/c уровень BDNF выражено снижается через 1 и 24 ч после стрессовых воздействий, а однократное внутрибрюшинное введение фабомотизола (5 мг/кг) препятствует падению уровня BDNF через 1 ч после влияния стрессирующих факторов [26]. Однако данный эффект не наблюдался через 24 ч после введения препарата. В этом же исследовании было установлено, что повторные стрессирующие воздействия *handling* (подразумевающее извлечение животных из клетки с последующим введением физиологического раствора внутрибрюшинно) приводят к падению уровня BDNF в гипоталамусе, коре и ПТ мышей линии BALB/c, а фабомотизол при 4-кратном внутрибрюшинном введении в дозе 5 мг/кг восстанавливал уровень данного нейротрофина до исходных значений [26]. В культуре гиппокампальных нейронов клеточной линии HT-22 фабомотизол увеличивал содержание BDNF и NGF, причем максимальный эффект препарата проявлялся в концентрации 10^{-8} М [1]. Кроме того, в многоцентровом рандомизированном двойном слепом плацебо-контролируемом исследовании пациентов с расстройствами адаптации после перенесенной коронавирусной инфекции COVID-19 было показано, что в группе фабомотизола в 4 раза больше пациентов смогли достичь 50%-ного снижения суммарного балла по шкале Гамильтона для оценки тревоги (HARS), чем в группе плацебо [9]. Помимо этого, фабомотизол снижал уровень депрессии и способствовал улучшению состояния пациентов. Все вышеуказанные положительные эффекты фабомотизола согласовывались с достоверным повышением уровня BDNF в крови, также зафиксированным в данном исследовании [9].

Таким образом, вышеописанное положительное влияние фабомотизола на содержание BDNF подтверждает наличие в механизме нейропротекторного

действия препарата сочетанного воздействия на ряд мишеней, в числе которых Sigma-1R, NQO2 и нейротрофины.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Используемые субстанции и реактивы

Субстанции: ладастен (N-(2-адамантил)-N-пара-бромфенил)-амин) (АО «Усолъе-Сибирский химфармзавод», Россия), фабомотизол (5-этоксид-2-[2-(морфолино)-этилтио]бензимидазола дигидрохлорида) (Erregieree S.p.A., Италия), леводопа (3-гидрокси-L-тирозин) (Sigma-Aldrich, США) пентобарбитал натрия (этаминал натрия) (АО «Усолъе-Сибирский химфармзавод», Россия).

Реактивы: 6-гидроксидофамина (6-ГОДА) гидрохлорид (Sigma-Aldrich, США), паракват (1,1'-диметил-4,4'-дипиридилия дихлорид) (Sigma-Aldrich, США), 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридин (МФТП) (Nanjink Pars Biochem CO., Китай), аскорбиновая кислота (Sigma-Aldrich, США), физиологический раствор NaCl 0,9% (АО «Производственная фармацевтическая компания Обновление», Россия), твин-80 (Sigma-Aldrich, США), HClO₄ (Sigma-Aldrich, США), сахароза (Sigma-Aldrich, США), H₃PO₄ (Sigma-Aldrich, США), KH₂PO₄ (Sigma-Aldrich, США), лимонная кислота (Sigma-Aldrich, США), динатриевая соль этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА-Na₂) (Sigma-Aldrich, США), октансульфоновая кислота (Sigma-Aldrich, США), ацетонитрил (Sigma-Aldrich, США).

Хроматографические стандарты: 3,4-дигидроксибензиламин (Sigma-Aldrich, США), дофамин (ДА) (Sigma-Aldrich, США), 3,4-дигидроксифенилуксусная кислота (ДОФУК) (Sigma-Aldrich, США), гомованилиновая кислота (ГВК) (Sigma-Aldrich, США), 3-метокситирамин (3-МТ) (Sigma-Aldrich, США).

2.2 Лабораторные животные

Исследование выполнено на 344 мышах-самцах линии С57В1/6 (питомник «Столбовая» (Московская область)). Животных содержали в условиях вивария при 20–24 °С, относительной влажности 45–65% и 12-часовом световом цикле в пластиковых клетках по 6–10 особей. Мыши имели свободный доступ к воде и корму.

Процедуры с лабораторными животными выполнялись в соответствии с российскими и международными документами: Решением Совета Евразийской экономической комиссии (ЕЭК) № 81 «Об утверждении Правил надлежащей лабораторной практики Евразийского экономического союза в сфере обращения лекарственных средств» от 03.11.2016 г., Рекомендацией Коллегии ЕЭК № 33 «О Руководстве по работе с лабораторными (экспериментальными) животными при проведении доклинических (неклинических) исследований» от 14.11.2023 г., ГОСТом 33044-2014 «Принципы надлежащей лабораторной практики» от 20.11.2014 г.

Все экспериментальные процедуры были одобрены комиссией по биоэтике ФГБНУ «ФИЦ оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий».

2.3 Методы оценки противопаркинсонической активности

2.3.1 Моделирование паркинсонического синдрома интратриатным введением 6-гидроксидофамина

ПС моделировался путем введения нейротоксина 6-ГОДА в правое ПТ. За 30 минут до начала операции мышам внутрибрюшинно вводили пентобарбитал натрия (60 мг/кг). По наступлении эффекта от анестезии животных помещали в стереотаксические рамки (Stoelting Motorized Stereotaxis, Stoelting Co., Великобритания) для фиксации черепа. Раствор 6-

ГОДА вводили однократно в правое ПТ согласно стереотаксическому атласу [164] по координатам $A = 0,4$; $L = 1,8$; $V = -3,5$ относительно брегмы. Концентрация 6-ГОДА составляла 2,5 мкг на 1 мкл раствора, содержащего 0,9% NaCl и 0,02% аскорбиновой кислоты [40, 225]. Мышам опытных групп вводили 2 мкл раствора нейротоксина со скоростью 1 мкл/мин при помощи гамильтоновского шприца с иглой из нержавеющей стали (30 gauge) на протяжении 2 минут. Аналогично ложно-оперированным (Л.О.) животным вводили 2 мкл контрольного раствора, содержащего 0,9% NaCl и 0,02% аскорбиновой кислоты.

Через две недели после введения нейротоксина, проводили оценку развития ПС при помощи батареи поведенческих тестов с дальнейшей декапитацией животных для последующего нейрохимического анализа.

2.3.2 Моделирование паркинсонического синдрома посредством однократного введения МФТП

В качестве второй экспериментальной модели использовался МФТП-индуцированный ПС, который вызывали путем однократного внутрибрюшинного введения МФТП в дозе 30 мг/кг [23].

Регистрацию времени наступления тремора (в секундах) начинали сразу после введения нейротоксина. По завершении оценки развития тремора проводили тест «длина шага», через 60 минут после введения нейротоксина для оценки дальнейших двигательных нарушений использовали тест «вертикальный стержень», через 70 минут – «вращающийся стержень».

2.3.3 Моделирование паркинсонического синдрома посредством длительного введения параквата

Эксперимент по моделированию ПС при помощи параквата с оценкой антипаркинсонического действия комбинации ладастена с фабомотизолом

проводился на протяжении 3-х недель. Паракват растворяли в физиологическом растворе и вводили внутривентрикулярно в дозе 10 мг/кг на 1-й, 5-й, 8-й, 12-й, 15-й и 19-й дни эксперимента [184].

2.4 Схема введения препаратов и дизайн исследования

2.4.1 Модель паркинсонического синдрома, вызванного интратриатным введением 6-гидроксидофамина

Со следующего дня после стереотаксической операции животным вводили ладастен (в дозах 10, 50 и 100 мг/кг, перорально), фабомотизол (в дозах 2,5, 5 и 10 мг/кг, перорально), комбинацию ладастена (10, 50 и 100 мг/кг, перорально) с фабомотизолом (5 и 10 мг/кг, перорально), леводопу (50 мг/кг, перорально) и плацебо (раствор твин-80 в воде, перорально) ежедневно на протяжении 14 дней. При этом ладастен вводился в виде суспензии, приготовленной с использованием твин-80, а фабомотизол и леводопа – в виде водных растворов.

Животные были разделены на 6 групп в каждом эксперименте (Таблица 1).

Таблица 1 – Распределение животных по группам в экспериментах по моделированию паркинсонического синдрома интратриатным введением 6-ГОДА

Эксперимент	Экспериментальные группы	Количество животных в группе
Исследование антипаркинсонического действия ладастена	Ложно-оперированные животные, получавшие плацебо	10
	Животные с введением 6-ГОДА, получавшие плацебо	10
	Животные с введением 6-ГОДА, получавшие субстанцию ладастена в дозе 10 мг/кг	10
	Животные с введением 6-ГОДА, получавшие субстанцию ладастена в дозе 50 мг/кг	10
	Животные с введением 6-ГОДА, получавшие субстанцию ладастена в дозе 100 мг/кг	10

Продолжение Таблицы 1

	Животные с введением 6-ГОДА, получавшие субстанцию леводопы в дозе 50 мг/кг	10
Исследование антипаркинсонического действия фабомотизола	Ложно-оперированные животные, получавшие плацебо	10
	Животные с введением 6-ГОДА, получавшие плацебо	10
	Животные с введением 6-ГОДА, получавшие субстанцию фабомотизола в дозе 2,5 мг/кг	10
	Животные с введением 6-ГОДА, получавшие субстанцию фабомотизола в дозе 5 мг/кг	10
	Животные с введением 6-ГОДА, получавшие субстанцию фабомотизола в дозе 10 мг/кг	10
	Животные с введением 6-ГОДА, получавшие субстанцию леводопы в дозе 50 мг/кг	10
Исследование антипаркинсонического действия комбинаций ладастена (10, 50, 100 мг/кг) с фабомотизолом (5 мг/кг)	Ложно-оперированные животные, получавшие плацебо	12
	Животные с введением 6-ГОДА, получавшие плацебо	12
	Животные с введением 6-ГОДА, получавшие комбинацию субстанций ладастена в дозе 10 мг/кг с фабомотизолом в дозе 5 мг/кг	12
	Животные с введением 6-ГОДА, получавшие комбинацию субстанций ладастена в дозе 50 мг/кг с фабомотизолом в дозе 5 мг/кг	12
	Животные с введением 6-ГОДА, получавшие комбинацию субстанций ладастена в дозе 100 мг/кг с фабомотизолом в дозе 5 мг/кг	12
	Животные с введением 6-ГОДА, получавшие субстанцию леводопы в дозе 50 мг/кг	12
Исследование антипаркинсонического действия комбинаций ладастена (10, 50, 100 мг/кг) с фабомотизолом (10 мг/кг)	Ложно-оперированные животные, получавшие плацебо	12
	Животные с введением 6-ГОДА, получавшие плацебо	12
	Животные с введением 6-ГОДА, получавшие комбинацию субстанций ладастена в дозе 10 мг/кг с фабомотизолом в дозе 10 мг/кг	12
	Животные с введением 6-ГОДА, получавшие комбинацию субстанций ладастена в дозе 50 мг/кг с фабомотизолом в дозе 10 мг/кг	12
	Животные с введением 6-ГОДА, получавшие комбинацию субстанций ладастена в дозе 100 мг/кг с фабомотизолом в дозе 10 мг/кг	12
	Животные с введением 6-ГОДА, получавшие субстанцию леводопы в дозе 50 мг/кг	12

На 14 день после унилатеральной инъекции 6-ГОДА проводились поведенческие тесты: «вращающийся стержень», «вертикальный стержень»,

«цилиндр», «длина шага». После завершения всех тестов животных декапитировали для дальнейшего нейрохимического анализа (Рисунок 4).

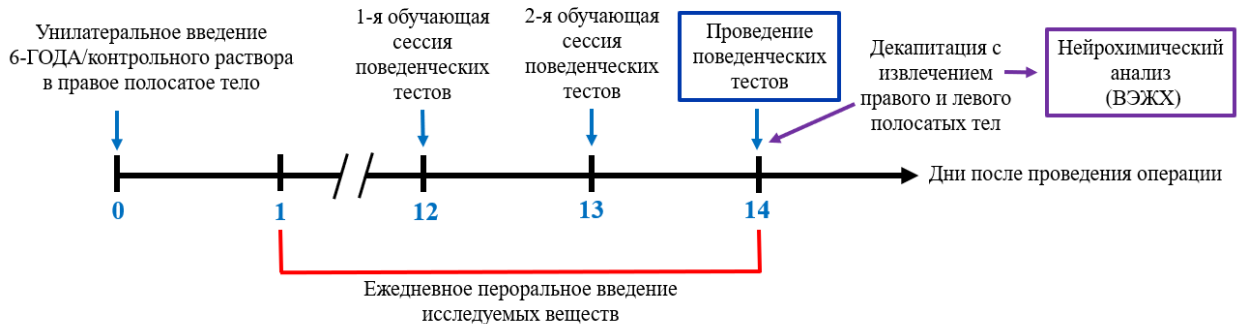


Рисунок 4 – Дизайн исследования с использованием модели 6-ГОДА-индуцированного паркинсонического синдрома

2.4.2 Модель паркинсонического синдрома, вызванного однократным введением МФТП

Комбинации ладастена (50 и 100 мг/кг, перорально) с фабомотизолом (10 мг/кг, перорально), леводопу (50 мг/кг, перорально) и плацебо (раствор твин-80 в воде, перорально) вводили за 30 минут до инъекции нейротоксина. Группе животных, не получавших нейротоксин, перорально вводили плацебо за 30 минут до инъекции физиологического раствора.

В рамках проведения эксперимента животных разделили на 8 групп (Таблица 2).

Таблица 2 – Распределение животных по группам в эксперименте по моделированию паркинсонического синдрома при помощи МФТП

Эксперимент	Экспериментальные группы	Количество животных в группе
Исследование антипаркинсонического действия комбинации ладастена с фабомотизолом	Физиологический раствор + плацебо	8
	МФТП + плацебо	8
	Ладастен в дозе 50 мг/кг (МФТП + субстанция ладастена в дозе 50 мг/кг)	8
	Ладастен в дозе 100 мг/кг (МФТП + субстанция ладастена в дозе 100 мг/кг)	8

Продолжение Таблицы 2

	Комбинация ладастена в дозе 50 мг/кг с фаботизолом в дозе 10 мг/кг (МФТП + комбинация субстанций ладастена в дозе 50 мг/кг с фаботизолом в дозе 10 мг/кг)	8
	Комбинация ладастена в дозе 100 мг/кг с фаботизолом в дозе 10 мг/кг (МФТП + комбинация субстанций ладастена в дозе 100 мг/кг с фаботизолом в дозе 10 мг/кг)	8
	Леводопа в дозе 50 мг/кг (МФТП + субстанция леводопы в дозе 50 мг/кг)	8

Сразу же после введения МФТП фиксировалось время наступления тремора, после чего проводился тест «длина шага». Через 60 минут состояние животных оценивалось в тесте «вертикальный стержень», а через 70 минут – в тесте «вращающийся стержень» (Рисунок 5).

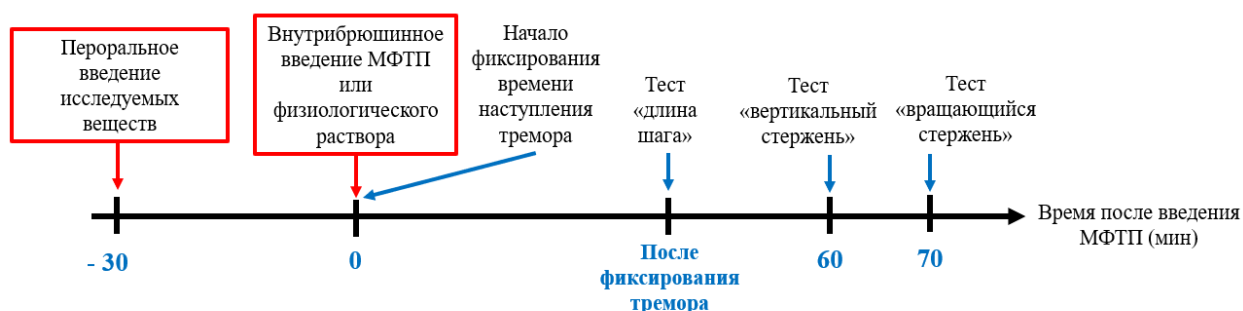


Рисунок 5 – Дизайн исследования с использованием модели МФТП-индуцированного паркинсонического синдрома

2.4.3 Модель паркинсонического синдрома, вызванного длительным введением параквата

С первого дня эксперимента животным перорально вводили комбинацию ладастена в дозе 50 мг/кг с фаботизолом в дозе 10 мг/кг, леводопу в дозе 50 мг/кг и плацебо (раствор твин-80 в воде). Животным, не получавшим паракват, вводили физиологический раствор внутрибрюшинно и плацебо перорально.

В рамках эксперимента животных разделили на 4 группы (Таблица 3).

Таблица 3 – Распределение животных по группам в эксперименте по моделированию паркинсонического синдрома при помощи параквата

Эксперимент	Экспериментальные группы	Количество животных в группе
Исследование антипаркинсонического действия комбинации ладастена с фабомотизолом	Физиологический раствор + плацебо	6
	Паракват + плацебо	6
	Комбинация ладастена с фабомотизолом (паракват + комбинация субстанций ладастена в дозе 50 мг/кг с фабомотизолом в дозе 10 мг/кг)	6
	Леводопа 50 мг/кг (паракват + субстанция леводопы в дозе 50 мг/кг)	6

Состояние животных оценивали при помощи поведенческих тестов на протяжении 3-х недель эксперимента (Рисунок 6).

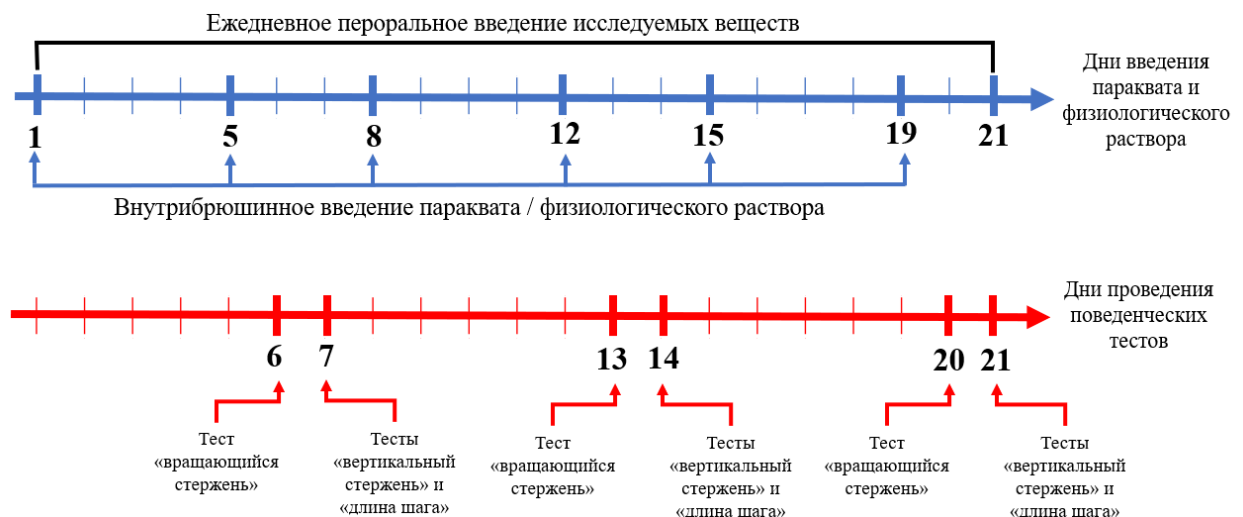


Рисунок 6 – Дизайн исследования с использованием модели паракват-индуцированного паркинсонического синдрома

2.5 Поведенческие тесты

2.5.1 Тест «вращающийся стержень»

Тест «вращающийся стержень» использовали для оценки развития моторного дефицита и нарушенной координации движений [141]. Важно

отметить, что нейроны ПТ задействованы не только в контроле движений, но и в обучении двигательным навыкам, поэтому данный тест может также свидетельствовать о повреждении стриатных нейронов [127].

При оценке антипаркинсонической активности исследуемых субстанций на модели 6-ГОДА-индуцированного ПС тестирование проводили на установке «Ротарод» (ООО «Нейроботикс», Москва) с диаметром стержня 4 см.

За два дня до тестирования животные проходили первую обучающую сессию, во время которой мыши адаптировались к установке при постоянной скорости вращения 4 об/мин, а за один день до тестирования – при постоянной скорости вращения 10 об/мин. Если животные держались на стержне меньше 1 минуты в какой-либо из сессий, то они признавались малоподвижными и исключались из эксперимента [59].

Тестовая сессия состояла из оценки способности животных удерживаться на стержне в двух режимах: при постоянной скорости вращения (20 об/мин) и при нарастающей скорости вращения (от 4 до 30 об/мин). Время нахождения на установке фиксировалось с момента помещения животного на стержень до его падения. Максимальное время тестирования при постоянной скорости вращения стержня составляло 120 секунд, при нарастающей скорости вращения – 240 секунд. При этом каждая мышь тестировалась по 3 раза в каждом режиме с перерывом в 30 минут между попытками. По окончании тестирования использовали максимальное время удержания мышей в каждом варианте теста из всех попыток.

При оценке антипаркинсонической активности исследуемых субстанций на модели МФТП-индуцированного ПС мышей адаптировали к установке за день до начала тестирования при постоянной скорости вращения стержня (10 об/мин). Тестовая сессия проводилась через 70 минут после введения МФТП. В тестовой сессии фиксировали способность мышей удерживаться на стержне при постоянной скорости вращения (10 об/мин) в течение 240 секунд. Выбранный скоростной режим обусловлен развитием

более выраженного моторного дефицита на фоне введения МФТП по сравнению с таковым при введении 6-ГОДА. Фиксирование времени пребывания осуществлялось с момента помещения животного на стержень до его падения или же до наступления 240 секунд. Каждой мыши предоставлялось по две попытки на прохождение теста с перерывом в 30 минут между попытками. По окончании тестирования использовали максимальное время удержания мышей в каждом варианте теста из всех попыток.

При оценке антипаркинсонической активности исследуемых субстанций на модели паракват-индуцированного ПС тестирование проводилось аналогичным образом, как и на модели 6-ГОДА-индуцированного ПС. Тестовые сессии проводились на 6-й, 13-й и 20-й дни эксперимента. За день до проведения тестовой сессии мышей адаптировали к установке посредством обучающей сессии, во время которой каждое животное дважды помещалось на стержень со скоростью вращения 10 об/мин. Если мыши держались на стержне меньше 1 минуты в какой-либо из сессий, то они признавались малоподвижными и исключались из эксперимента.

2.5.2 Тест «вертикальный стержень»

Тест «вертикальный стержень» использовали для оценки развития и выраженности брадикинезии [139], характеризующейся замедлением совершаемых движений при спуске со стержня.

Тестовой установкой являлся металлический стержень (высота 50 см, диаметром 1 см), который был плотно закреплен в клетке с опилками. Стержень с пробковым набалдашником диаметром 1,5 см был обернут бинтом. Мышей помещали на установку носом вверх на верхушку стержня и сразу же фиксировали время, которое требовалось на поворот головой вниз (время поворота) и полного спуска со стержня (время спуска). Животным давалось по 5 попыток на прохождение теста, после чего вычислялось среднее

значение из всех попыток для каждого из фиксируемых параметров. За день до тестирования мышей обучали спускаться по стержню, предъявляя по 5 проб в день [219]. Максимальное время, отводимое на тест, составляло 60 секунд. Если мышь не могла полностью повернуться вниз на стержне, падала или соскальзывала вниз с установки, то подобное состояние принималось за максимальную тяжесть нарушения и приравнивалось ко времени в 60 секунд [96].

2.5.3 Тест «цилиндр»

Тест «цилиндр» проводили для регистрации спонтанной активности передних конечностей. Данный тест хорошо зарекомендовал себя при проведении унилатеральных инъекций 6-ГОДА в ПТ, поскольку позволяет зафиксировать выраженную асимметрию передних конечностей. Здоровые мыши свободно используют левую и правую передние лапы, в то время как мыши с ПС чаще используют лапу, ипсилатеральную к стороне повреждения [138]. Таким образом, при введении 6-ГОДА в правое ПТ животные будут чаще задействовать правую переднюю лапу.

Мышь помещали в цилиндр (диаметр 8 см, высота 40 см), рядом с которым устанавливали два зеркала под углом 90 градусов так, чтобы конечный обзор у наблюдателя составлял 360 градусов [98]. Время тестирования составляло 10 минут, в течение которых животным необходимо было совершить по крайней мере 20 контактов со стенками цилиндра. Если было произведено меньшее число контактов, мышь удалялась из эксперимента. Полученные данные выражали в процентах использования левой лапы по отношению к общему числу контактов по формуле: $[\text{число контактов контрлатеральной лапы} / (\text{число контактов ипсилатеральной лапы} + \text{число контактов контрлатеральной лапы}) \times 100]$. Касания обеими лапами стенок цилиндра исключались из анализа [138].

2.5.4 Тест «длина шага»

Тест «длина шага» проводили для оценки выраженности экстрапирамидной ригидности, проявляющейся нарушением походки с сокращением длины совершаемых животным шагов [74]. Для тестирования использовался узкий лабиринт из акрилового стекла (высота 8 см, ширина 4 см), соединенный с черным приемным боксом (ООО «НПК Открытая Наука», Россия), под который был подложен лист белой бумаги. Перед проведением теста мышам давали освоиться в коридоре и приемном боксе, чтобы в дальнейшем избежать поворачивания или прекращения прохода в установке [59]. Передние лапы мышей окрашивали в красный цвет, а задние – в синий с помощью гуаши, после чего мышь немедленно запускали в коридор. После завершения тестирования было произведено измерение длины шага между передними и задними лапами, при этом вычисляли среднее между каждым шагом с обеих сторон, не учитывая первые и последние шаги мышей [59].

2.6 Нейрохимические методы исследования: высокоэффективная жидкостная хроматография с электрохимической детекцией (ВЭЖХ-ЭД)

Уровень ДА и его метаболитов определяли путем нейрохимического анализа в соответствии с методикой [16]. После проведения поведенческих тестов проводилась декапитация мышей с извлечением головного мозга и последующим выделением левого (интактного) и правого (поврежденного) ПТ. Выделение осуществлялось на фильтровальной бумаге, смоченной 0,32 М раствором сахарозы при температуре тающего льда (0–4 °С). Далее извлеченные структуры взвешивали и помещали в жидкий азот (-196 °С), после чего хранили при температуре -80 °С.

Для определения концентрации ДА и его метаболитов использовали внутренний стандарт, для чего образцы гомогенизировали в 0,1 М HClO₄ с добавлением 3,4-дигидроксибензиламина в концентрации 0,25 нмоль/мл в

шаровом гомогенизаторе Tissue LyserLT (Quiagen, Германия) с частотой 45 ударов в минуту в течение 5 минут. Далее проводили центрифугирование образцов при 10000 g в течение 10 минут, после чего надосадочную жидкость наносили на аналитическую колонку ReproSil-Pur 120 ODS-3 100x4 (Dr. Maisch, Германия) с помощью автосемплера SIL-20 АСНТ (Shimadzu, Япония) в объеме 20 мкл. Подвижной фазой при разделении аналитов служил 0,1 М цитратно-фосфатный буфер, содержащий 0,3 мМ октансульфоната натрия, 0,1 мМ ЭДТА и 8% ацетонитрила (рН 2.8). Скорость потока подвижной фазы составляла 1 мл/мин. Определение ДА и его метаболитов проводили на хроматографической станции Shimadzu LC-20 Prominence (Shimadzu, Япония) с использованием электрохимической ячейки ESA 5011 ($E_1 = -175$; $E_2 = +250$) и электрохимического детектора Coulochem III (ESA, США). Полученные результаты обрабатывали с использованием программно-аппаратного комплекса «Мультихром 1.5» (Ampersand, Россия).

2.7 Статистическая обработка экспериментальных данных

Для проведения статистической обработки экспериментальных данных использовали программное обеспечение GraphPad Prism 8.4.3. Нормальность распределения проверяли при помощи критерия Шапиро–Уилка. Поскольку проводился межгрупповой анализ большого числа экспериментальных групп, использовали дисперсионные методы анализа. Если полученные данные укладывались в нормальное распределение, использовали однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) с множественным сравнением по Даннету, а если полученные данные были отличными от нормального распределения – критерий Краскела–Уоллиса с множественным сравнением по Данну.

Данные представляли в виде медианы (макс.–мин. значения) или среднего \pm стандартное отклонение.

Линейная дозовая зависимость эффектов монотерапии ладастеном и фабомотизолом в поведенческих тестах и нейрохимическом анализе подтверждалась при помощи теста линейного тренда.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

3.1 Исследование наличия антипаркинсонического действия у субстанции ладастена при пероральном хроническом введении на модели 6-гидроксидофамин-индуцированного паркинсонического синдрома у мышей

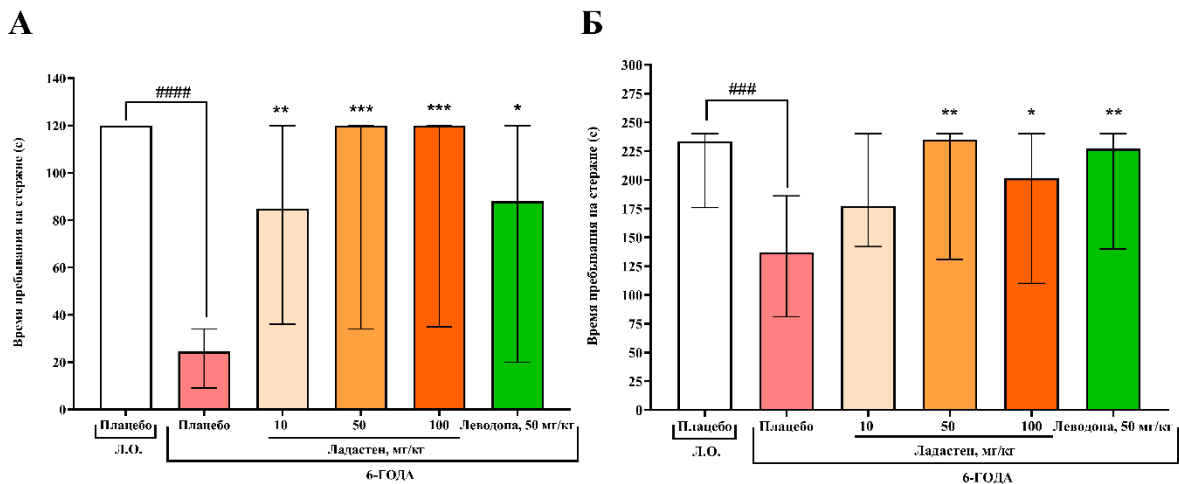
Первым этапом работы явилось установление наличия антипаркинсонического действия ладастена на модели ПС, вызванного унилатеральным интрастриатным введением 6-ГОДА. Субстанция ладастена вводилась перорально со следующего дня после введения нейротоксина в дозах 10, 50, 100 мг/кг ежедневно на протяжении 14 дней, после чего проводилась оценка наличия антипаркинсонического действия в батарее поведенческих тестов с дальнейшим нейрохимическим анализом дофаминергической системы головного мозга.

3.1.1 Оценка наличия антипаркинсонического действия у субстанции ладастена при помощи поведенческих тестов на модели 6-гидроксидофамин-индуцированного паркинсонического синдрома у мышей

Развитие моторного дефицита и нарушений в координации движений было зафиксировано в тесте «вращающийся стержень» у группы 6-ГОДА + плацебо (здесь и далее – группа контроля), поскольку наблюдалось достоверное снижение времени удержания животных при постоянной скорости вращения стержня в 4,9 раза ($p < 0,0001$) по сравнению с группой Л.О. животных (введение контрольного раствора + плацебо), а также снижение времени удержания при нарастающей скорости в 1,7 раза ($p < 0,001$) (Рисунок 7 А, Б).

При постоянной скорости вращения на фоне введения ладастена в дозе 10 мг/кг время удерживания мышей увеличивалось в 3,5 раза ($p < 0,01$), а в дозах 50 и 100 мг/кг – в 4,9 раза ($p < 0,001$) по сравнению с контролем (Рисунок 7 А). В варианте тестирования при нарастающей скорости вращения стержня ладастен был достоверно эффективен только в дозах 50 и 100 мг/кг, увеличив время удержания мышей в 1,7 раза ($p < 0,01$) и 1,5 раза ($p < 0,05$) соответственно по сравнению с контролем (Рисунок 7 Б). В тесте «вращающийся стержень» не было выявлено линейной дозовой зависимости.

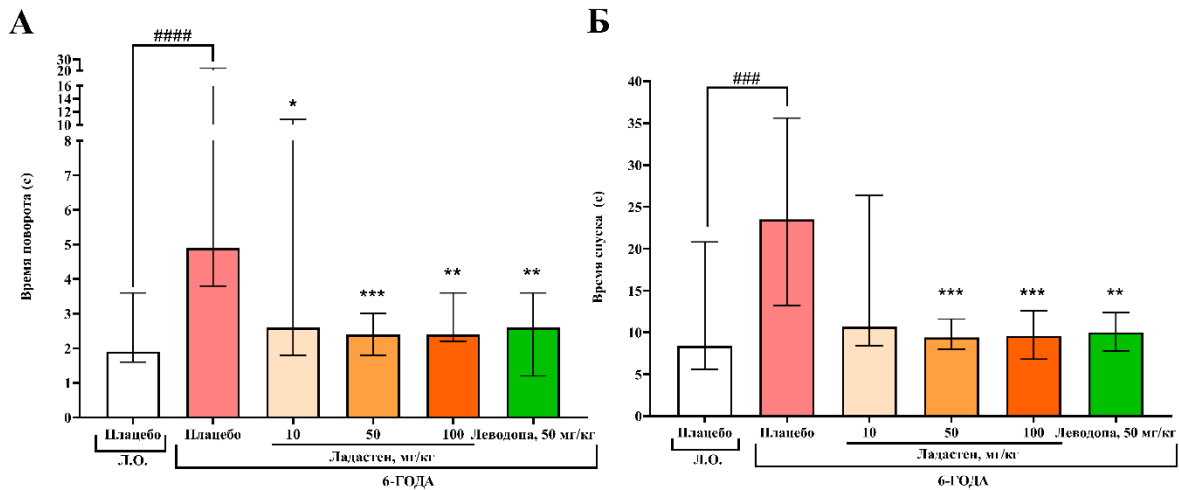
При введении препарата сравнения леводопы наблюдалось достоверное увеличение времени пребывания мышей на стержне в 3,6 раза ($p < 0,05$) при постоянной и в 1,66 раза ($p < 0,01$) при нарастающей скорости вращения по сравнению с контролем (Рисунок 7 А, Б).



Примечание – Л.О. – ложно-оперированные животные, с интрастриатным унилатеральным введением контрольного раствора, 6-ГОДА – животные с интрастриатным унилатеральным введением 6-ГОДА. Данные представлены в виде медианы (макс.–мин. значения): ##### – $p < 0,0001$, ### – $p < 0,001$ – статистически значимые различия по сравнению с ложно-оперированными животными (критерий Краскела–Уоллиса с последующим множественным сравнением по Данну); *** – $p < 0,001$, ** – $p < 0,01$, * – $p < 0,05$ – статистически значимые различия по сравнению с животными, претерпевшими интрастриатное введение 6-ГОДА и получавшими плацебо (контролем) (критерий Краскела–Уоллиса с последующим множественным сравнением по Данну).

Рисунок 7 – Влияние ладастена на двигательную активность мышей с 6-ГОДА-индуцированным паркинсоническим синдромом в тесте «вращающийся стержень» при постоянной (А) и нарастающей (Б) скорости вращения стержня

Брадикинезия проявилась в виде замедленного покидания установки «вертикальный стержень», поскольку время поворота группы контроля было выше в 2,6 раза ($p < 0,0001$) (Рисунок 8 А), а время спуска в 2,8 раза ($p < 0,001$) по сравнению с Л.О. животными (Рисунок 8 Б).



Примечание – Л.О. – ложно-оперированные животные с интрастриатным унилатеральным введением контрольного раствора, 6-ГОДА – животные с интрастриатным унилатеральным введением 6-ГОДА. Данные представлены в виде медианы (макс.–мин. значения): ##### – $p < 0,0001$, ### – $p < 0,001$ – статистически значимые различия по сравнению с ложно-оперированными животными (критерий Краскела–Уоллиса с последующим множественным сравнением по Данну); *** – $p < 0,001$, ** – $p < 0,01$, * – $p < 0,05$ – статистически значимые различия по сравнению с животными, претерпевшими интрастриатное введение 6-ГОДА и получавшими плацебо (контролем) (критерий Краскела–Уоллиса с последующим множественным сравнением по Данну).

Рисунок 8 – Влияние ладастена на выраженность брадикинезии у мышей с 6-ГОДА-индуцированным паркинсоническим синдромом в тесте «вертикальный стержень»: время поворота (А), время спуска со стержня (Б)

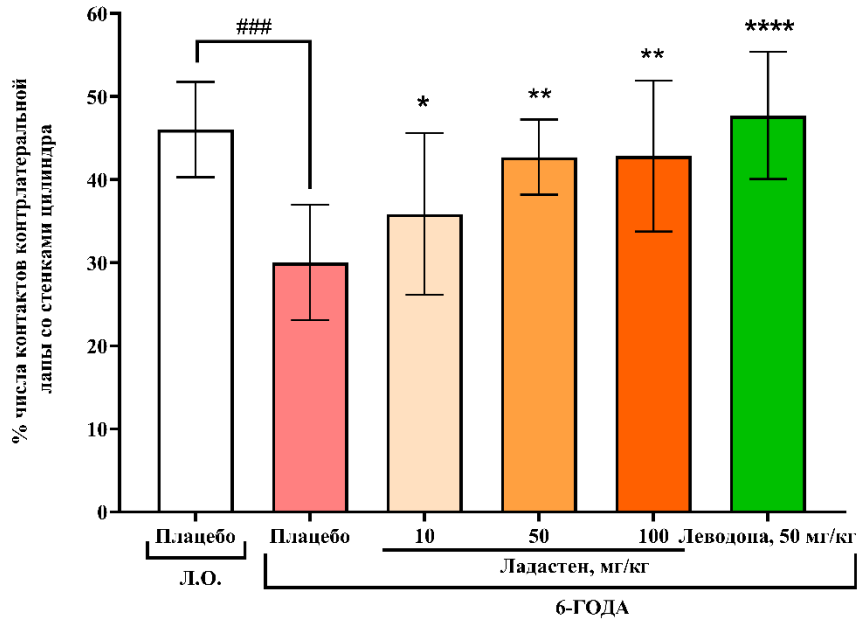
Введение ладастена в дозе 10 мг/кг достоверно влияло только на время поворота мышей, сокращая его в 2,6 раза ($p < 0,05$) по сравнению с контролем (Рисунок 8 А), в то время как введение ладастена в дозах 50 и 100 мг/кг приводило к наиболее выраженному снижению брадикинезии, уменьшая время поворота в 2 раза ($p < 0,001$ и $p < 0,01$ соответственно) (Рисунок 8 А), а время спуска в 2,5 раза ($p < 0,001$) и в 2,45 раза ($p < 0,001$) соответственно по сравнению с контролем (Рисунок 8 Б). Леводопа достоверно сокращала время поворота в 1,9 раза ($p < 0,01$) и спуска в 2,35 раза ($p < 0,01$) по сравнению с

группой контроля (Рисунок 8 А, Б). При этом в тесте «вертикальный стержень» была установлена линейная дозозая зависимость влияния ладастена на время поворота ($p < 0,05$) и спуска ($p < 0,001$).

Моторная асимметрия, проявившаяся акинезией контрлатеральной к стороне повреждения передней конечности (левой лапы), была установлена в тесте «цилиндр» у группы контроля, что выражалось в уменьшении до 30% контактов от общего числа касаний и было ниже в 1,5 раза ($p < 0,001$) по сравнению с группой Л.О. животных (Рисунок 9).

Ладастен в дозе 10 мг/кг способствовал устранению моторной асимметрии, увеличив использование левой лапы до 39,3% от общего числа контактов ($p < 0,05$), что превышает в 1,3 раза данный показатель у контроля (Рисунок 9). Однако, в больших дозах ладастен оказался эффективнее, поскольку при введении в дозах 50 и 100 мг/кг число касаний контрлатеральной конечностью увеличилось в 1,4 раза по сравнению с контролем, что составило 42,7% ($p < 0,01$) и 42,8% ($p < 0,01$) соответственно от общего числа контактов (Рисунок 9). В тесте «цилиндр» была установлена линейная дозозая зависимость влияния ладастена на снижение выраженности акинезии ($p < 0,001$).

Леводопа достоверно повышала возможность использования контрлатеральной лапы до 47,7%, что позволяло животным использовать данную конечность в 1,6 раза ($p < 0,0001$) чаще по сравнению с контролем (Рисунок 9).



Примечание – Л.О. – ложно-оперированные животные с интрастриатным унилатеральным введением контрольного раствора, 6-ГОДА – животные с интрастриатным унилатеральным введением 6-ГОДА. Данные представлены в виде среднего \pm стандартное отклонение: ### – $p < 0,001$ – статистически значимые различия по сравнению с ложно-оперированными животными (однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) с множественным сравнением по Даннету); **** – $p < 0,001$, ** – $p < 0,01$, * – $p < 0,05$ – статистически значимые различия по сравнению с животными, претерпевшими интрастриатное введение 6-ГОДА и получавшими плацебо (контролем) (однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) с множественным сравнением по Даннету).

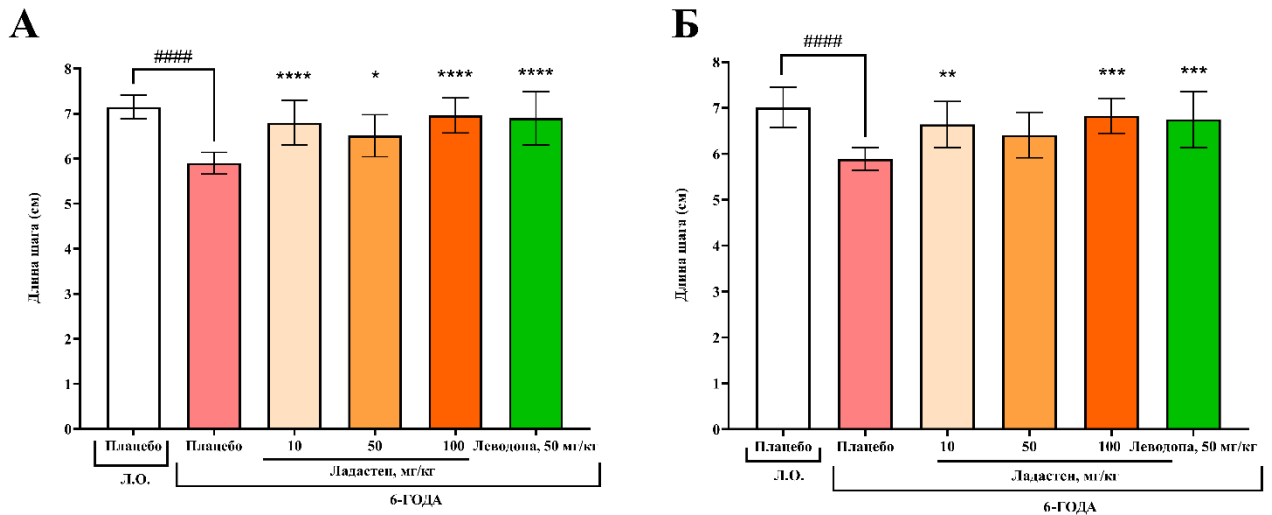
Рисунок 9 – Влияние ладастена на выраженность моторной асимметрии передних конечностей у мышей с 6-ГОДА-индуцированным паркинсоническим синдромом в тесте «цилиндр»

Экстрапирамидная ригидность была зафиксирована в тесте «длина шага» у группы контроля, поскольку длина шага передних лап была меньше на 1,3 см (18,1%; $p < 0,0001$) (Рисунок 10 А), в то время как задних – на 1,1 см (15,6%; $p < 0,0001$) (Рисунок 10 Б) по сравнению с Л.О. животными.

Ладастен в дозе 10 мг/кг увеличивал длину шага передних и задних лап на 0,9 см (15,3%; $p < 0,0001$) и 0,7 см (11,9%; $p < 0,01$) соответственно, а в дозе 50 мг/кг увеличивал длину шага только передних лап на 0,6 см (10,2%; $p < 0,05$) по сравнению с контролем. Наиболее эффективным в снижении выраженности ригидности оказался ладастен в дозе 100 мг/кг, поскольку длина шага передних и задних лап увеличивалась на 1,1 см (18,6%; $p < 0,0001$) (Рисунок 10 А) и на 1 см (15,7%; $p < 0,001$) (Рисунок 10 Б) соответственно по

сравнению с группой контроля. В тесте «длина шага» не было установлено линейной дозовой зависимости влияния ладастена на выраженность ригидности.

Леводопа, в свою очередь, увеличивала длину шага передних и задних лап на 1 см (16,9%; $p < 0,0001$) и 0,85 см (14,4%; $p < 0,001$) соответственно по сравнению с контролем (Рисунок 10 А, Б).



Примечание – Л.О. – ложно-оперированные животные с интрастриатным унилатеральным введением контрольного раствора, 6-ГОДА – животные с интрастриатным унилатеральным введением 6-ГОДА. Данные представлены в виде среднего \pm стандартное отклонение: ##### – $p < 0,0001$ – статистически значимые различия по сравнению с ложно-оперированными животными однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) с множественным сравнением по Даннету); **** – $p < 0,001$, *** – $p < 0,001$, ** – $p < 0,01$, * – $p < 0,05$ – статистически значимые различия по сравнению с животными, претерпевшими интрастриатное введение 6-ГОДА и получавшими плацебо (контролем) (однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) с множественным сравнением по Даннету).

Рисунок 10 – Влияние ладастена на экстрапирамидную ригидность передних (А) и задних (Б) лап мышей с 6-ГОДА-индуцированным паркинсоническим синдромом в тесте «длина шага»

Таким образом, в батарее поведенческих тестов были выявлены различные двигательные нарушения у мышей группы контроля, что характерно при повреждении нигростриатного пути, наблюдаемого при БП.

Введение ладастена успешно способствовало снижению выраженности проявлений ПС у мышей, а именно моторного дефицита и нарушенной координации движений в тесте «вращающийся стержень», брадикинезии в

тесте «вертикальный стержень», акинезии передней конечности в тесте «цилиндр» и экстрапирамидной ригидности в тесте «длина шага», причем наиболее эффективно в дозах 50 и 100 мг/кг.

3.1.2 Нейрохимический анализ влияния субстанции ладастена на дофаминергическую систему головного мозга мышей на модели 6-гидроксидофамин-индуцированного паркинсонического синдрома

Патологической особенностью БП является прогрессирующая гибель дофаминергических нейронов и снижение содержания ДА в компактной части ЧС. При этом нарушение синтеза, хранения, транспортировки и метаболизма ДА способствует нейродегенерации [244]. В связи с этим, изучалось влияние ладастена на содержание ДА и его метаболитов в поврежденном (правом) и интактном (левом) ПТ, которые были извлечены у животных по завершении поведенческих тестов спустя две недели после проведения стереотаксической операции с унилатеральным введением 6-ГОДА.

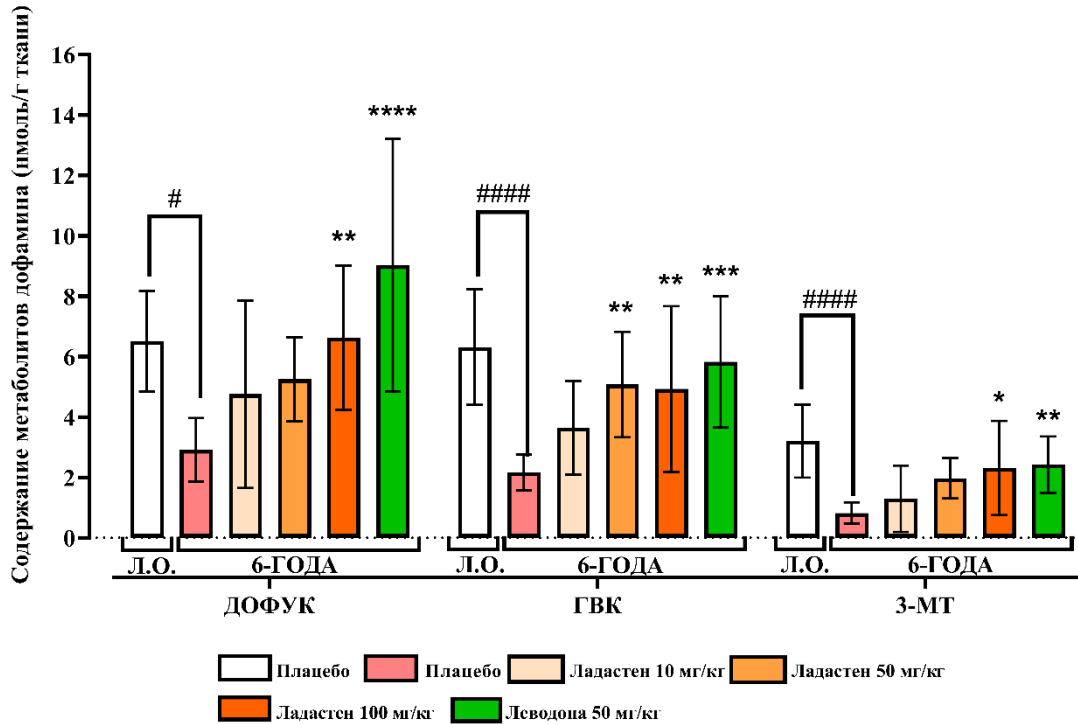
При проведении нейрохимического анализа поврежденного ПТ группы контроля (6-ГОДА + плацебо) зафиксировано снижение содержания ДА в 3,9 раза ($p < 0,0001$) (Рисунок 11), а также снижение уровней его метаболитов – ДОФУК в 2,3 раза ($p < 0,05$) и ГВК в 2,9 раза ($p < 0,0001$) по сравнению с Л.О. животными (Рисунок 12). Кроме того, обнаружено снижение внеклеточного метаболита ДА – 3-МТ в 3,9 раза ($p < 0,0001$).

Уменьшение уровня ДА и его метаболитов также прослеживается в повышении индексов утилизации ДА у контрольных животных (Таблица 4). Зафиксированное достоверное снижение содержания ДА и его метаболитов у группы контроля согласуется с симптоматикой, наблюдаемой при БП, а также с результатами других исследований, в которых ПС моделировался унилатеральным интрастриатным введением 6-ГОДА [40, 225]. Кроме того, полученные результаты сопоставимы с выявленными в поведенческих тестах двигательными нарушениями.

Ладастен в дозе 10 мг/кг не оказывал достоверного влияния на дофаминергическую систему на фоне 6-ГОДА, однако на фоне его введения содержание ДА (Рисунок 11), а также метаболитов ДА превышало таковое по сравнению с контролем (Рисунок 12). В то же время ладастен в больших дозах приводил к положительной дофаминергической модуляции. Так, наиболее выраженное предотвращение снижения уровня ДА и его метаболитов в поврежденном ПТ мышей по сравнению с контролем зафиксировано при введении ладастена в дозе 100 мг/кг, поскольку уровень ДА возрастал в 3,4 раза ($p < 0,001$) (Рисунок 11), ДОФУК и ГВК в 2,3 раза ($p < 0,01$) (Рисунок 12). Ладастен в дозе 50 мг/кг оказывал менее выраженное влияние, повышая содержание ДА в 2,9 ($p < 0,01$) (Рисунок 11) и ГВК в 2,4 ($p < 0,01$) раза (Рисунок 12) по сравнению с контролем. Была установлена линейная дозовая зависимость ($p < 0,01$) влияния ладастена на содержание ДА в поврежденном ПТ. При этом не было установлено подобной зависимости влияния ладастена на метаболиты ДА в поврежденном ПТ.

В свою очередь, леводопа увеличивала содержание ДА в 3,8 ($p < 0,0001$) (Рисунок 11), ДОФУК в 3,1 ($p < 0,0001$), ГВК в 2,7 ($p < 0,001$) раза по сравнению с контролем (Рисунок 12).

Уровень 3-МТ также изменялся под действием ладастена, однако достоверное увеличение содержания наблюдалось только при введении в дозе 100 мг/кг в 2,8 раза ($p < 0,05$) по сравнению с контролем (Рисунок 12). В то же время ладастен в дозах 10 мг/кг и 50 мг/кг способствовал повышению содержания 3-МТ в 1,6 и 2,4 раза соответственно, однако данное влияние не было достоверным (Рисунок 12). При введении леводопы зафиксировано достоверное повышение 3-МТ в 2,95 раза ($p < 0,01$) (Рисунок 12).



Примечание – Л.О. – ложно-оперированные животные с интратриатным унилатеральным введением контрольного раствора, 6-ГОДА – животные с интратриатным унилатеральным введением 6-ГОДА, ДОФУК – 3,4-диоксифенилуксусная кислота, ГVK – гомованилиновая кислота, 3-МТ – 3-метокситирамин. Данные представлены в виде среднего \pm стандартное отклонение: ##### – $p < 0,0001$, # – $p < 0,05$ – статистически значимые различия по сравнению ложно-оперированными животными (однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) с множественным сравнением по Даннету); **** – $p < 0,0001$, *** – $p < 0,001$, ** – $p < 0,01$, * – $p < 0,05$ – статистически значимые различия по сравнению с животными, претерпевшими интратриатное введение 6-ГОДА и получавшими плацебо (однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) с множественным сравнением по Даннету).

Рисунок 12 – Влияние ладастена на уровень метаболитов дофамина в поврежденном 6-ГОДА полосатом теле мышей после стереотаксической операции

Не было выявлено достоверного влияния ладастена в дозе 10 мг/кг на индексы утилизации ДА, однако его введение в дозах 50 и 100 мг/кг приводило к снижению показателя ДОФУК/ДА в 1,7 раза ($p < 0,01$) и 1,55 раза ($p < 0,05$) соответственно, а ДОФУК+ГVK/ДА в 1,58 раза ($p < 0,01$) (Таблица 4). При этом метаболическое отношения ГVK/ДА достоверно снижалось в 1,25 раза ($p < 0,05$) только на фоне ладастена в дозе 100 мг/кг.

Введение леводопы приводило к снижению отношений ГVK/ДА в 1,25 раза ($p < 0,05$) и ДОФУК+ГVK/ДА в 1,58 раза ($p < 0,01$) (Таблица 4).

Таблица 4 – Влияние ладастена на метаболизм дофамина в поврежденном 6-ГОДА полосатом теле мышей после стереотаксической операции

Группа		Индексы утилизации ДА			
		ДОФУК/ДА	ГВК/ДА	3-МТ/ДА	ДОФУК+ ГВК+3- МТ/ДА
		Поврежденное полосатое тело			
Л.О.	Плацебо	0,09 ± 0,02	0,08 ± 0,02	0,04 ± 0,01	0,21 ± 0,05
6-ГОДА	Плацебо	0,17 ± 0,07 ####	0,1 ± 0,09 #	0,04 ± 0,02	0,35 ± 0,15 ##
	Ладастен 10 мг/кг	0,13 ± 0,03	0,1 ± 0,02	0,03 ± 0,02	0,26 ± 0,05
	Ладастен 50 мг/кг	0,1 ± 0,04 **	0,09 ± 0,03	0,04 ± 0,02	0,23 ± 0,08 **
	Ладастен 100 мг/кг	0,11 ± 0,04 *	0,08 ± 0,03 *	0,04 ± 0,02	0,22 ± 0,08 **
	Леводопа 50 мг/кг	0,12 ± 0,04	0,08 ± 0,02 *	0,03 ± 0,01	0,23 ± 0,05 **

Примечание – Л.О. – ложно-оперированные животные с интрастриатным унилатеральным введением контрольного раствора, 6-ГОДА – животные с унилатеральным интрастриатным введением 6-ГОДА, ДА – дофамин, ДОФУК – 3,4-дигидроксифенилукусная кислота, ГВК – гомованилиновая кислота, 3-МТ – 3-метокситирамин. Данные представлены в виде среднего ± стандартное отклонение: #### – $p < 0,001$, ## – $p < 0,01$, # – $p < 0,05$ – статистически значимые различия по сравнению с ложно-оперированными животными (однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) с множественным сравнением по Даннету); ** – $p < 0,01$, * – $p < 0,05$ – статистически значимые различия по сравнению животными, претерпевшими интрастриатное введение 6-ГОДА и получавшими плацебо (однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) с множественным сравнением по Даннету).

При анализе интактного ПТ не было установлено достоверных изменений в содержании ДА и ДОФУК у мышей группы контроля, однако наблюдалось снижение ГВК в 1,6 раза ($p < 0,05$) и 3-МТ в 2,25 раза ($p < 0,001$) по сравнению с Л.О. животными (Таблица 5). Данные отличия, вероятно, обусловлены возможной компенсаторной активацией глии и повышением активности КОМТ в этом типе клеток после инъекции 6-ГОДА.

При этом не было обнаружено достоверных изменений в уровнях ДА, его метаболитов и метаболических отношениях в интактном ПТ мышей, которые получали ладастен во всем дозовом диапазоне и леводопу по сравнению с контролем (Таблица 5).

Таблица 5 – Влияние ладастена на содержание дофамина и его метаболитов, а также индексы утилизации дофамина в интактном полосатом теле мышей после стереотаксической операции

Группа		Содержание дофамина и его метаболитов (нмоль/г ткани) и индексы утилизации ДА							
		ДА	ДОФУК	ГВК	3-МТ	ДОФУК/ ДА	ГВК/ ДА	3- МТ/ДА	ДОФУК + ГВК+3- МТ/ДА
		Интактное полосатое тело							
Л.О.	Плацебо	88,83 ± 15,48	6,95 ± 1,35	6,86 ± 1,58	3,65 ± 1,19	0,08 ± 0,02	0,08 ± 0,02	0,04 ± 0,01	0,2 ± 0,04
6-ГОДА	Плацебо	64,39 ± 27,40	6,76 ± 2,67	4,32 ± 1,17 #	1,62 ± 0,58 ###	0,11 ± 0,03	0,07 ± 0,02	0,03 ± 0,008	0,21 ± 0,045
	Ладастен 10 мг/кг	67,96 ± 30,70	8,18 ± 3,85	5,08 ± 1,8	1,75 ± 1,16	0,13 ± 0,06	0,08 ± 0,02	0,03 ± 0,02	0,24 ± 0,08
	Ладастен 50 мг/кг	78,91 ± 26,67	8 ± 3,35	6,17 ± 2,49	2,72 ± 1,18	0,1 ± 0,02	0,08 ± 0,015	0,03 ± 0,008	0,21 ± 0,02
	Ладастен 100 мг/кг	68,32 ± 23,98	7,69 ± 3,64	5,22 ± 1,78	2,37 ± 1,37	0,11 ± 0,03	0,08 ± 0,01	0,04 ± 0,02	0,23 ± 0,06
	Леводопа 50 мг/кг	92,24 ± 24,06	8,96 ± 3,55	6,05 ± 1,56	2,48 ± 0,86	0,1 ± 0,02	0,07 ± 0,01	0,03 ± 0,005	0,19 ± 0,02

Примечание: Л.О. – ложно-оперированные животные с интрастриатным унилатеральным введением контрольного раствора, 6-ГОДА – животные с унилатеральным интрастриатным введением 6-ГОДА, ДА – дофамин, ДОФУК – 3,4-дигидроксибензилсульфокислота, ГВК – гомованилиновая кислота, 3-МТ – 3-метокситирамин. Данные представлены в виде среднего ± стандартное отклонение: ### – $p < 0,001$, # – $p < 0,05$ – статистически значимые различия по сравнению с ложно-оперированными животными.

Полученные результаты нейрохимического анализа свидетельствуют о том, что ладастен способен предотвращать падение уровня ДА и его метаболитов в поврежденном ПТ при моделировании ПС посредством унилатерального интрастриатного введения 6-ГОДА мышам. Таким образом, учитывая устранение двигательных нарушений в поведенческих тестах с вышеописанным положительным влиянием на дофаминергическую систему в условиях нейродегенерации, можно сделать вывод о наличии выраженного

антипаркинсонического действия у ладастена, сопоставимого с эффектами препарата сравнения.

По полученным результатам исследования наличия антипаркинсонического действия у субстанции ладастена при пероральном хроническом введении на модели 6-ГОДА-индуцированного ПС у мышей опубликована статья с соавторами:

Мариевский, В. Е. Антипаркинсоническое действие ладастена на модели 6-гидроксидофамин-индуцированного паркинсонического синдрома у мышей / **В. Е. Мариевский**, Л. Ф. Зайнуллина // Химико-фармацевтический журнал. – 2025. – Т. 59, № 4. – С. 8-13.

По полученным результатам исследования наличия антипаркинсонического действия у субстанции ладастена при пероральном хроническом введении на модели 6-ГОДА-индуцированного ПС у мышей опубликованы тезисы с соавторами:

1. **Мариевский, В. Е.** Изучение поведенческих и нейрохимических эффектов ладастена на модели паркинсонического синдрома *in vivo* / **В. Е. Мариевский**, И. А. Кадников, Л. Ф. Зайнуллина // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2023. – Т. 86, № 11S. – С. 102.

2. **Мариевский, В. Е.** Ладастен уменьшает степень акинезии передней конечности мышей в модели паркинсонического синдрома *in vivo* / **В. Е. Мариевский**, И. А. Кадников, Л. Ф. Зайнуллина, С. Б. Середенин // Достижения современной фармакологической науки: Сборник материалов Всероссийской конференции молодых ученых, посвященной 100-летию со дня рождения профессора А.А. Никулина и 80-летию Рязанского государственного медицинского университета имени академика И.П. Павлова, Рязань: Рязанский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова, 2023. – С. 39-41.

3. **Мариевский, В. Е.** Изучение антипаркинсонической активности ладастена на модели паркинсонического синдрома *in vivo* / **В. Е. Мариевский**,

Л. Ф. Зайнуллина, И. А. Кадников, Ю. В. Вахитова [и др.] // Академический форум молодых ученых стран Большой Евразии "Континент науки": Сборник тезисов докладов – Москва: Центр научно-технических решений, 2023. – С. 468-469.

4. **Мариевский, В. Е.** Место адамантанов в современной фармакотерапии болезни Паркинсона и изучение ладастена как потенциального антипаркинсонического лекарственного средства, являющегося производным адамантана / **В. Е. Мариевский**, Л. Ф. Зайнуллина // Сборник тезисов докладов III Международная научно-практическая конференция «Разработка лекарственных средств – традиции и перспективы» – Томск: Изд-во СибГМУ, 2024. – С. 257-259.

5. **Мариевский, В. Е.** Ладастен снижает выраженность брадикинезии у мышечей в модели паркинсонического синдрома *in vivo* / **В. Е. Мариевский**, Л. Ф. Зайнуллина, И. А. Кадников, С. Б. Середенин // Нейронаука для медицины и психологии: Материалы XX Международного междисциплинарного конгресса – Москва: ООО "МАКС Пресс", 2024. – С. 190-191.

6. **Мариевский, В. Е.** Ладастен снижает выраженность экстрапирамидной ригидности в модели паркинсонического синдрома *in vivo* / **В. Е. Мариевский**, Л. Ф. Зайнуллина, И. А. Кадников, С. Б. Середенин // Сборник тезисов докладов девятой Междисциплинарной конференции «Молекулярные и Биологические аспекты Химии, Фармацевтики и Фармакологии» – Сыктывкар, 2024 – С. 89.

7. **Мариевский, В. Е.** Ладастен снижает выраженность различных проявлений паркинсонического синдрома *in vivo* / **В. Е. Мариевский**, Л. Ф. Зайнуллина, И. А. Кадников, С. Б. Середенин // Сборник тезисов 27-й Пуцинской школы-конференции молодых ученых с международным участием «Биология – наука XXI века» – Пушино: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки "Федеральный исследовательский центр "Пуцинский научный центр биологических исследований Российской академии наук", 2024. – С. 297.

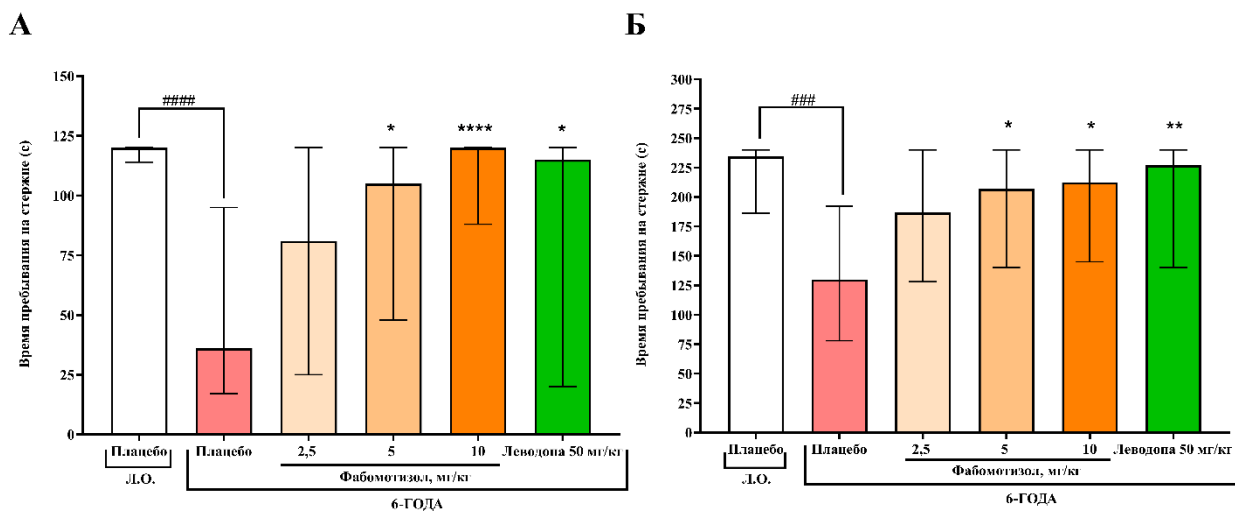
3.2 Исследование наличия антипаркинсонического действия у субстанции фабомотизола при пероральном хроническом введении на модели 6-гидроксидофамин-индуцированного паркинсонического синдрома у мышей

Ранее в ФГБНУ «ФИЦ оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий» (Москва, Россия) была продемонстрирована способность фабомотизола на модели 6-ГОДА-индуцированного ПС предотвращать снижение уровня ДА и потерю ТГ⁺ нейронов ЧС, а также нормализовывать двигательную активность в тесте «вращающийся стержень» [225]. Поскольку подобное положительное влияние наблюдалось при внутрибрюшинном введении в дозе 2,5 мг/кг, в рамках данной работы необходимо установить наличие антипаркинсонического действия у фабомотизола при пероральном введении (предполагаемый путь введения комбинации фабомотизола с ладастеном), используя большее число поведенческих тестов для оценки различной симптоматики ПС. Кроме того, подобное исследование необходимо также для подбора наиболее эффективной дозы в составе комбинации с ладастеном.

3.2.1 Оценка наличия антипаркинсонического действия у субстанции фабомотизола при помощи поведенческих тестов на модели 6-гидроксидофамин-индуцированного паркинсонического синдрома у мышей

На 14-й день после интрастриатной инъекции 6-ГОДА было установлено, что группа контроля (6-ГОДА + плацебо) могла удерживаться на установке в тесте «вращающийся стержень» гораздо меньше, как при постоянной (в 3,3 раза ($p < 0,0001$)), так и при нарастающей скорости вращения стержня (в 1,8 раза ($p < 0,001$)) по сравнению с группой Л.О. животных (контрольный раствор + плацебо) (Рисунок 13 А, Б). Подобная неспособность животных удерживаться на стержне свидетельствует о развитии моторного дефицита и нарушений в координации движений.

При введении фабомотизола в дозе 2,5 мг/кг не было выявлено достоверных улучшений по сравнению с контролем, однако при введении в дозах 5 и 10 мг/кг время удержания на стержне увеличивалось при постоянной скорости вращения в 2,9 ($p < 0,05$) и 3,3 ($p < 0,0001$) раза по сравнению с контролем (Рисунок 13 А), а при нарастающей – в 1,6 ($p < 0,05$) и 1,64 ($p < 0,05$) раза соответственно (Рисунок 13 Б). Леводопа увеличивала время пребывания животных на стержне в 3,2 раза ($p < 0,05$) при постоянной (Рисунок 13 А) и в 1,75 раза ($p < 0,01$) при нарастающей (Рисунок 13 Б) скорости вращения стержня по сравнению с контролем.



Примечание – Л.О. – ложно-оперированные животные с интрастриатным унилатеральным введением контрольного раствора, 6-ГОДА – животные с интрастриатным унилатеральным введением 6-ГОДА. Данные представлены в виде медианы (макс.–мин. значения): ##### – $p < 0,0001$, ### – $p < 0,001$ – статистически значимые различия по сравнению с ложно-оперированными животными (критерий Краскела–Уоллиса с последующим множественным сравнением по Данну); **** – $p < 0,0001$, ** – $p < 0,01$, * – $p < 0,05$ – статистически значимые различия по сравнению с животными, претерпевшими интрастриатное введение 6-ГОДА и получавшими плацебо (критерий Краскела–Уоллиса с последующим множественным сравнением по Данну).

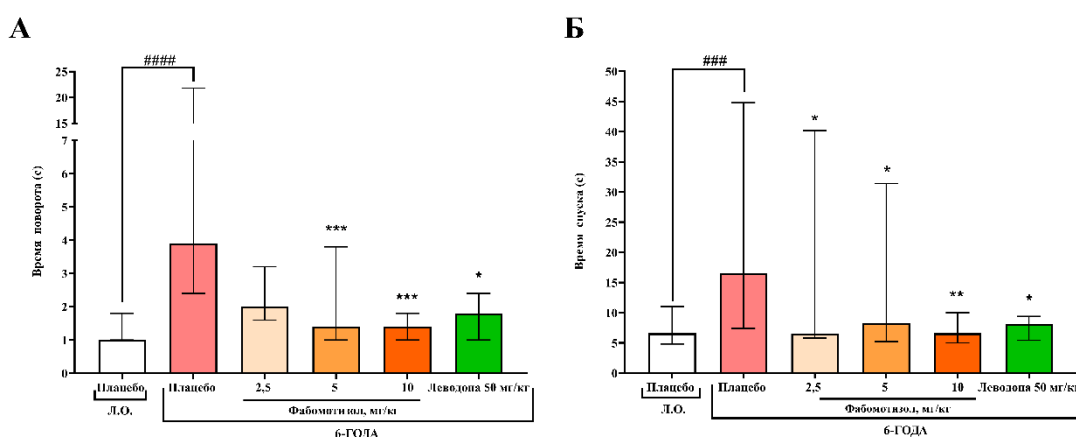
Рисунок 13 – Влияние фабомотизола на двигательную активность мышцей с 6-ГОДА-индуцированным паркинсоническим синдромом в тесте «вращающийся стержень» при постоянной (А) и нарастающей (Б) скорости вращения стержня

В тесте «вертикальный стержень» у группы контроля выявлена брадикинезия, которая выражалась в виде задержки во времени поворота и спуска с установки. Так, время поворота мышцей группы контроля было выше в 3,9 раза ($p < 0,0001$) (Рисунок 14 А), а время спуска в 2,5 раза ($p < 0,001$) по сравнению с Л.О. животными (Рисунок 14 Б).

Фабомотизол в дозе 2,5 мг/кг достоверно влиял только на время спуска животных, уменьшая его в 2,5 раза ($p < 0,05$) по сравнению с контролем (Рисунок 14 Б). На фоне введения фабомотизола в дозах 5 и 10 мг/кг выявлено достоверное снижение выраженности брадикинезии у мышцей, поскольку время поворота сокращалось в 2,8 раза ($p < 0,001$) (Рисунок 14 А), а время спуска в 2 раза ($p < 0,05$) и в 2,5 раза ($p < 0,01$) соответственно по сравнению с контролем (Рисунок 14 Б). При оценке влияния фабомотизола на время

поворота была установлена линейная дозовая зависимость ($p < 0,05$), которая не наблюдалась при действии фабомотизола на время спуска.

При этом леводопа снижала время поворота и спуска в 2,2 раза ($p < 0,05$) и 2 раза ($p < 0,05$) соответственно по сравнению с группой контроля (Рисунок 14 А, Б).



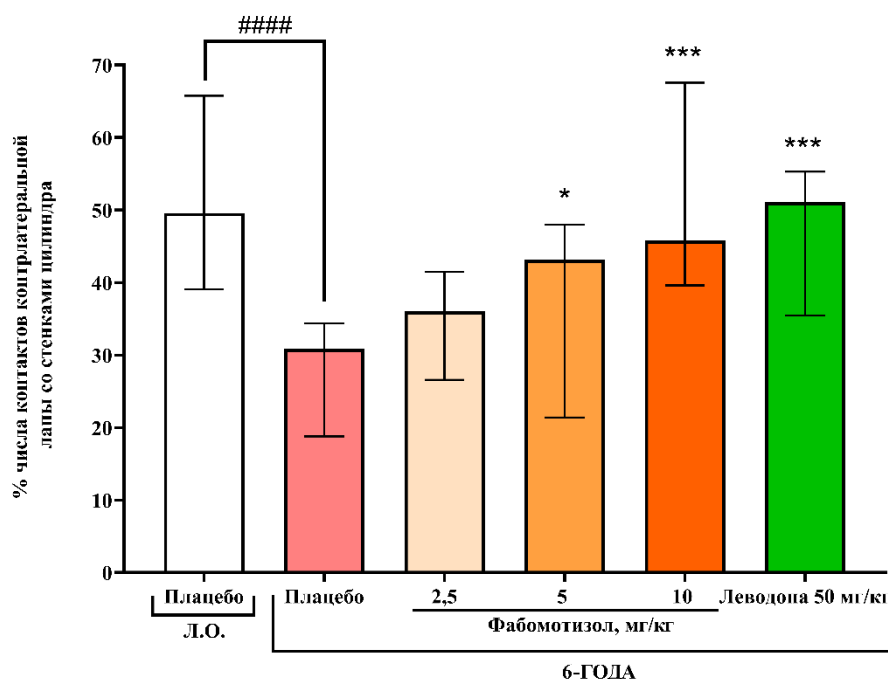
Примечание – Л.О. – ложно-оперированные животные с интрастриатным унилатеральным введением контрольного раствора, 6-ГОДА – животные с интрастриатным унилатеральным введением 6-ГОДА. Данные представлены в виде медианы (макс.–мин. значения): ##### – $p < 0,0001$, #### – $p < 0,001$ – статистически значимые различия по сравнению с ложно-оперированными животными (критерий Краскела–Уоллиса с последующим множественным сравнением по Данну); *** – $p < 0,001$, ** – $p < 0,01$, * – $p < 0,05$ – статистически значимые различия по сравнению с животными, претерпевшими интрастриатное введение 6-ГОДА и получавшими плацебо (критерий Краскела–Уоллиса с последующим множественным сравнением по Данну).

Рисунок 14 – Влияние фабомотизола на выраженность брадикинезии у мышей с 6-ГОДА-индуцированным паркинсоническим синдромом в тесте «вертикальный стержень»: время поворота (А), время спуска со стержня (Б)

В тесте «цилиндр» у мышей группы контроля была обнаружена моторная асимметрия, проявившаяся акинезией передней конечности, поскольку задействование контрлатеральной к стороне повреждения (левой) лапы составляло 30,9% случаев от общего числа контактов, что было в 1,6 раза ($p < 0,0001$) ниже по сравнению с Л.О. животными (Рисунок 15).

Фабомотизол в дозе 2,5 мг/кг не оказывал достоверного влияния на задействование контрлатеральной к стороне повреждения конечности, однако мыши использовали ее чаще (36% от общего числа контактов) по сравнению с

контролем (Рисунок 15). Фабомотизол в дозах 5 и 10 мг/кг достоверно восстанавливал способность мышей с ПС задействовать левую переднюю лапу до 43,2% и 45,8% от общего числа контактов, что было в 1,4 ($p < 0,05$) и 1,48 ($p < 0,001$) раза соответственно чаще по сравнению с контролем (Рисунок 15). Также в тесте «цилиндр» была установлена линейная дозовая зависимость эффектов фабомотизола ($p < 0,001$).



Примечание – Л.О. – ложно-оперированные животные с интрастриатным унилатеральным введением контрольного раствора, 6-ГОДА – животные с интрастриатным унилатеральным введением 6-ГОДА. Данные представлены в виде медианы (макс.–мин. значения): #### – $p < 0,0001$ – статистически значимые различия по сравнению с ложно-оперированными животными (критерий Краскела–Уоллиса с последующим множественным сравнением по Данну); *** – $p < 0,001$, * – $p < 0,05$ – статистически значимые различия по сравнению с животными, претерпевшими интрастриатное введение 6-ГОДА и получавшими плацебо (критерий Краскела–Уоллиса с последующим множественным сравнением по Данну).

Рисунок 15 – Влияние фабомотизола на выраженность моторной асимметрии передних конечностей у мышей с 6-ГОДА-индуцированным паркинсоническим синдромом в тесте «цилиндр»

В свою очередь, на фоне введения леводопы задействование контралатеральной передней конечности у мышей составляло 51,1% от общего числа контактов, что превышало в 1,65 раза данный показатель у контроля (Рисунок 15).

Таким образом, были выявлены различные двигательные нарушения у группы контроля, что свидетельствует о развитии ПС. Введение фабомотизола способствовало снижению выраженности всех фиксируемых проявлений ПС у мышей, причем наиболее эффективно в дозах 5 и 10 мг/кг.

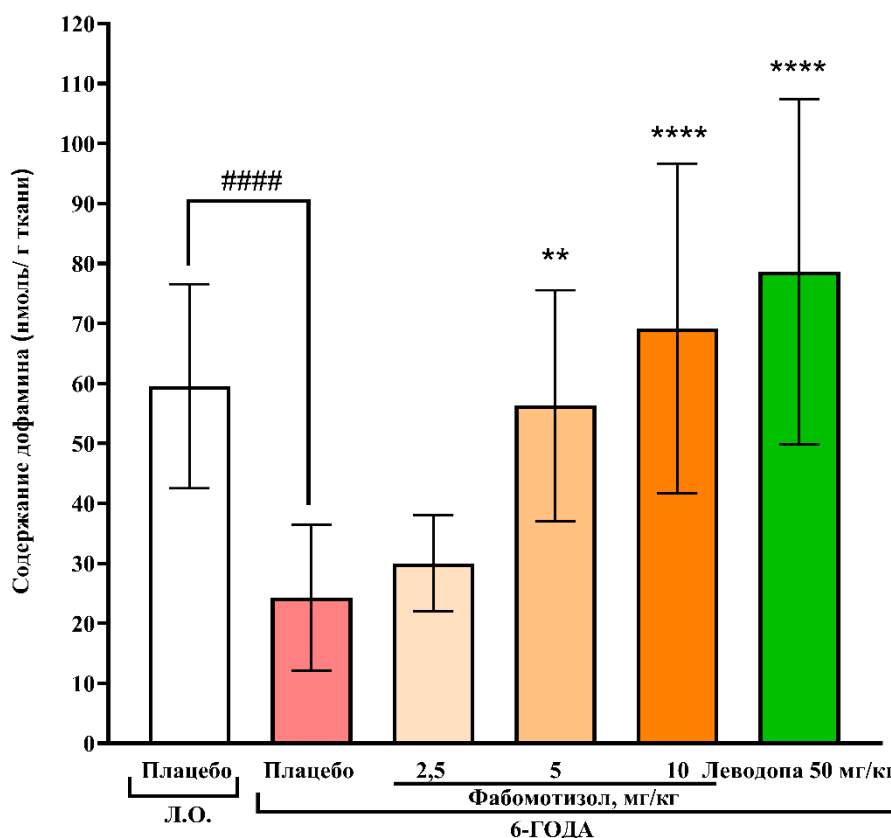
3.2.2 Нейрохимический анализ влияния субстанции фабомотизола на дофаминергическую систему головного мозга мышей на модели 6-гидроксидофамин-индуцированного паркинсонического синдрома

Как и в случае с изучением антипаркинсонического действия ладастена, на следующем этапе исследования оценивалось влияние субстанции фабомотизола при пероральном хроническом введении мышам на содержание ДА и его метаболитов в поврежденном (правом) и интактном (левом) ПТ, которые извлекались у животных по завершении поведенческих тестов спустя две недели после проведения стереотаксической операции с унилатеральным введением 6-ГОДА.

Нейрохимический анализ образцов группы контроля (6-ГОДА + плацебо) выявил снижение уровня ДА в 2,5 раза ($p < 0,01$), ДОФУК в 2 раза ($p < 0,05$), ГВК в 1,6 раза ($p < 0,01$) и 3-МТ в 1,7 раза ($p < 0,05$) по сравнению с Л.О. животными (контрольный раствор + плацебо) (Рисунок 16 и 17), что согласуется с результатами поведенческих тестов и свидетельствует о развитии ПС.

На фоне введения фабомотизола мышам в дозах 5 и 10 мг/кг наблюдалось достоверное увеличение содержания ДА в 2,3 раза ($p < 0,01$) и в 2,8 раза ($p < 0,0001$) соответственно по сравнению с контролем, в то время как при введении в дозе 2,5 мг/кг не было выявлено достоверного влияния на уровень ДА (Рисунок 16). Была установлена линейная дозовая зависимость ($p < 0,001$) влияния фабомотизола на содержание ДА в поврежденном ПТ.

Леводопа способствовала повышению содержания ДА в 3,2 раза ($p < 0,0001$) по сравнению с контролем (Рисунок 16).



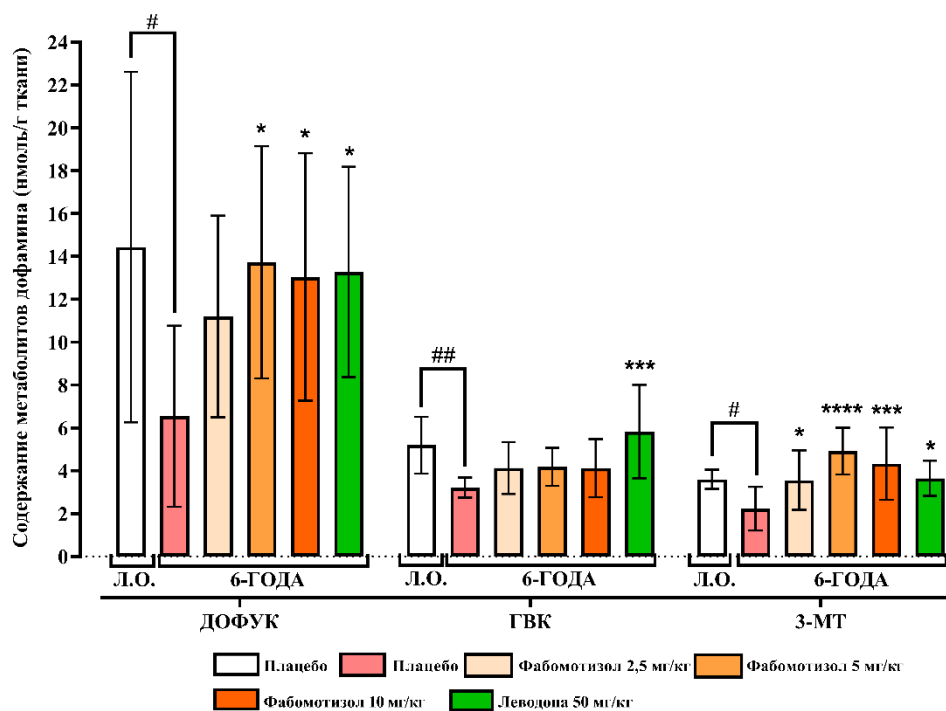
Примечание – Л.О. – ложно-оперированные животные с интратриатным унилатеральным введением контрольного раствора, 6-ГОДА – животные с интратриатным унилатеральным введением 6-ГОДА. Данные представлены в виде среднего \pm стандартное отклонение: ##### – $p < 0,0001$ – статистически значимые различия по сравнению с ложно-оперированными животными (однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) с множественным сравнением по Даннету); **** – $p < 0,0001$, ** – $p < 0,01$ – статистически значимые различия по сравнению с животными, претерпевшими интратриатное введение 6-ГОДА и получавшими плацебо (однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) с множественным сравнением по Даннету).

Рисунок 16 – Влияние фабототизола на уровень дофамина в поврежденном 6-ГОДА полосатом теле мышей после стереотаксической операции

Фабототизол также влиял на метаболизм ДА, поскольку содержание ДОФУК увеличилось в 2,1 раза ($p < 0,05$) и в 2 раза ($p < 0,05$) при введении в дозах 5 и 10 мг/кг, а уровень 3-МТ в 2,2 раза ($p < 0,0001$) и 1,95 раза ($p < 0,001$) соответственно по сравнению с контролем (Рисунок 17). При этом уровень ГВК повышался в 1,3 раза при введении фабототизола мышам в обеих дозах, однако данное изменение не было статистически значимым. Фабототизол в дозе 2,5 мг/кг достоверно не влиял на уровень метаболитов ДА (за исключением 3-МТ) по сравнению с контролем (Рисунок 17). При анализе

влияния фабомотизола на уровень метаболитов ДА в поврежденном ПТ линейная дозовая зависимость не была установлена.

Леводопа увеличивала содержание ДОФУК в 2 раза ($p < 0,05$), ГВК в 1,8 раза ($p < 0,001$) и 3-МТ в 1,6 раза ($p < 0,05$) по сравнению с контролем (Рисунок 17).



Примечание – Л.О. – ложно-оперированные животные с интрастриатным унилатеральным введением контрольного раствора, 6-ГОДА – животные с интрастриатным унилатеральным введением 6-ГОДА, ДОФУК – 3,4-диоксифенилуксусная кислота, ГВК – гомованилиновая кислота, 3-МТ – 3-метокситирамин. Данные представлены в виде среднего \pm стандартное отклонение: ## – $p < 0,01$, # – $p < 0,05$ – статистически значимые различия по сравнению с ложно-оперированными животными (однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) с множественным сравнением по Даннету); **** – $p < 0,0001$, *** – $p < 0,001$, * – $p < 0,05$ – статистически значимые различия по сравнению с животными, претерпевшими интрастриатное введение 6-ГОДА и получавшими плацебо (однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) с множественным сравнением по Даннету).

Рисунок 17 – Влияние фабомотизола на уровень метаболитов дофамина в поврежденном 6-ГОДА полосатом теле мышей после стереотаксической операции

Фабомотизол также оказывал влияние на индексы утилизации ДА, вызывая их снижение по сравнению с контролем, однако полученные данные

не были статистически значимыми, за исключением индекса ГВК/ДА ($p < 0,001$) на фоне фабомотизола в дозе 10 мг/кг (Таблица 6).

Таблица 6 – Влияние фабомотизола на метаболизм дофамина в поврежденном 6-ГОДА полосатом теле мышей после стереотаксической операции

Группа		Индексы утилизации ДА			
		ДОФУК/ДА	ГВК/ДА	3-МТ/ДА	ДОФУК+ ГВК+3- МТ/ДА
		Поврежденное полосатое тело			
Л.О.	Плацебо	0,19 (0,15– 0,33)	0,08 (0,07– 0,11)	0,07 (0,05– 0,08)	0,39 (0,28– 0,5)
	Плацебо	0,22 (0,15– 0,52)	0,15 (0,08– 0,24)	0,09 (0,06– 0,21)	0,53 (0,33– 0,77)
6-ГОДА	Фабомотизол 2,5 мг/кг	0,4 (0,26–0,48)	0,16 (0,14– 0,26)	0,13 (0,12– 0,22)	0,69 (0,49– 0,75)
	Фабомотизол 5 мг/кг	0,23 (0,2–0,31)	0,07 (0,07– 0,09)	0,09 (0,08–0,1)	0,39 (0,34– 0,56)
	Фабомотизол 10 мг/кг	0,19 (0,16– 0,24)	0,06 (0,05– 0,08) ***	0,07 (0,06– 0,07)	0,32 (0,26– 0,4)
	Леводопа 50 мг/кг	0,19 (0,1–0,31)	0,07 (0,06– 0,09) **	0,05 (0,04– 0,07)	0,33 (0,2– 0,45)

Примечание – Л.О. – ложно-оперированные животные с интрастриатным унилатеральным введением контрольного раствора, 6-ГОДА – животные с интрастриатным унилатеральным введением 6-ГОДА, ДА – дофамин, ДОФУК – 3,4-дигидроксифенилуксусная кислота, ГВК – гомованилиновая кислота, 3-МТ – 3-метокситирамин. Данные представлены в виде медианы и квартилей (median (q25–q75)): *** – $p < 0,001$, ** – $p < 0,01$ – статистически значимые различия по сравнению с животными, претерпевшими интрастриатное введение 6-ГОДА и получавшими плацебо.

Нейрохимический анализ интактного ПТ не выявил достоверных изменений в содержании ДА и его метаболитов на фоне терапии фабомотизолом во всем дозовом диапазоне или леводопой по сравнению с контролем (Таблица 7).

Таблица 7 – Влияние фабомотизола на содержание дофамина и его метаболитов, а также индексы утилизации дофамина в интактном полосатом теле мышей после стереотаксической операции

Группа		Содержание дофамина и его метаболитов (нмоль/г ткани) и индексы утилизации ДА							
		ДА	ДОФУК	ГВК	3-МТ	ДОФУК/ ДА	ГВК/ ДА	3- МТ/Д А	ДОФУК + ГВК+3- МТ/ДА
		Интактное полосатое тело							
Л.О.	Плацебо	62,4 ± 18,2	12,5 ± 4,46	4,49 ± 0,66	4,11 ± 0,53	0,19 (0,15– 0,29)	0,08 (0,06– 0,08)	0,07 (0,06– 0,08)	0,34 (0,28– 0,49)
	Плацебо	60,5 ± 10,5	14,6 ± 4,79	4,39 ± 1,27	4,2 ± 0,63	0,26 (0,21– 0,29)	0,09 (0,06– 0,11)	0,07 (0,07– 0,09)	0,4 (0,36– 0,45)
6-ГОДА	Фабомотизол 2,5 мг/кг	61,5 ± 17,3	15,6 ± 5,94	5,12 ± 1,47	4,37 ± 1,01	0,25 (0,19– 0,34)	0,11 (0,08– 0,14)	0,1 (0,07– 0,12)	0,41 (0,29– 0,55)
	Фабомотизол 5 мг/кг	63,9 ± 10,9	12,3 ± 4,95	4,4 ± 0,7	4,8 ± 1,31	0,23 (0,17– 0,25)	0,07 (0,068– 0,07)	0,08 (0,06– 0,1)	0,38 (0,32– 0,4)
	Фабомотизол 10 мг/кг	73,3 ± 16,9	16,1 ± 4,36	4,42 ± 0,55	4,78 ± 0,83	0,21 (0,19– 0,26)	0,06 (0,06– 0,07)	0,06 (0,06– 0,08)	0,33 (0,31– 0,41)
	Леводопа 50 мг/кг	75,1 ± 16,7	12,2 ± 1,9	5,43 ± 1,49	4 ± 0,94	0,18 (0,12– 0,19) *	0,08 (0,05– 0,08)	0,07 (0,04– 0,07)	0,3 (0,24– 0,34) *

Примечание – Л.О. – ложно-оперированные животные с интрастриатным унилатеральным введением контрольного раствора, 6-ГОДА – животные с интрастриатным унилатеральным введением 6-ГОДА, ДА – дофамин, ДОФУК – 3,4-дигидроксифенилуксусная кислота, ГВК – гомованилиновая кислота, 3-МТ – 3-метокситирамин. Данные представлены в виде среднего ± стандартное отклонение: * – $p < 0,05$ – статистически значимые различия по сравнению с животными, претерпевшими интрастриатное введение 6-ГОДА и получавшими плацебо.

Полученные данные указывают на способность фабомотизола предотвращать падение уровня ДА и его метаболитов в поврежденном ПТ в условиях нейродегенерации при моделировании ПС посредством унилатерального интрастриатного введения 6-ГОДА. Таким образом, учитывая устранение двигательных нарушений в поведенческих тестах с вышеописанным положительным влиянием на дофаминергическую систему в условиях нейродегенерации, можно сделать вывод о наличии антипаркинсонического действия у фабомотизола.

По полученным результатам исследования наличия антипаркинсонического действия у субстанции фабомотизола при пероральном хроническом введении на модели 6-ГОДА-индуцированного ПС у мышей опубликован тезис с соавторами:

Marievskaa, V. E. Fabomotizole recovers motor deficits in unilateral 6-OHDA-lesion model of Parkinson's disease in mice / **V. E. Marievskaa**, I. A. Kadnikov, L. F. Zainullina, Yu. V. Vakhitova [et al.] // 34th CINP World Congress of Neuropsychopharmacology: Abstract book, Montrael, Canada, 2023. – P. 174; P3.14.

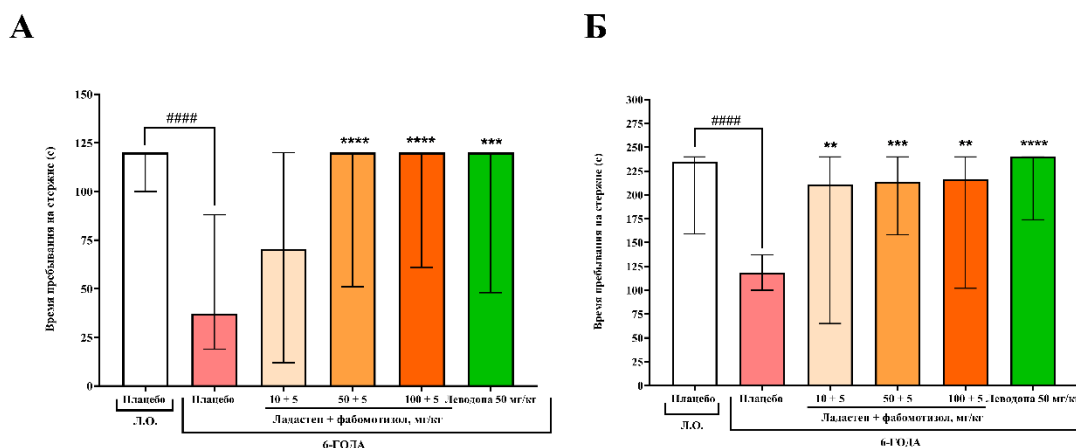
3.3 Исследование наличия антипаркинсонического действия у комбинаций субстанций ладастена с фабомотизолом при пероральном хроническом введении на модели 6-гидроксидофамин-индуцированного паркинсонического синдрома у мышей

Монотерапия ладастеном и фабомотизолом на модели ПС, вызванного унилатеральным интрастриатным введением 6-ГОДА, привела к снижению выраженности различных двигательных нарушений и положительному дофаминергическому воздействию, что свидетельствует о наличии антипаркинсонической активности в спектре действия ладастена и фабомотизола. При этом, наблюдалась линейная дозовая зависимость в некоторых поведенческих тестах, а также во влиянии данных ЛС на уровень ДА. Наибольшая эффективность была обнаружена при введении ладастена в дозах 50 и 100 мг/кг, а фабомотизола – в дозах 5 и 10 мг/кг, поэтому следующим этапом работы стало исследование антипаркинсонического действия комбинации данных субстанций в вышеперечисленных дозах.

3.3.1 Исследование антипаркинсонического действия комбинаций субстанций ладастена с фабомотизолом в батарее поведенческих тестов на модели 6-гидроксидофамин-индуцированного паркинсонического синдрома у мышей

Исследование антипаркинсонического действия комбинаций началось с совместного введения ладастена в дозах 10, 50 и 100 мг/кг с фабомотизолом в дозе 5 мг/кг на модели ПС, вызванного унилатеральным интрастриатным введением 6-ГОДА. По прошествии двух недель после стереотаксической операции у группы контроля (6-ГОДА + плацебо) были зафиксированы моторный дефицит и нарушенная координация движений в тесте «вращающийся стержень», поскольку время удержания мышей при постоянной скорости вращения стержня уменьшалось в 3,2 раза ($p < 0,0001$)

(Рисунок 18 А) по сравнению с группой Л.О. животных (контрольный раствор + плацебо), а время удержания при нарастающей скорости – в 2 раза ($p < 0,0001$) (Рисунок 18 Б). Подобные двигательные нарушения, как и в ранее проведенных исследованиях монотерапии ладастеном и фабомотизолом, указывают на развитие ПС.



Примечание – Л.О. – ложно-оперированные животные, с интратриатным унилатеральным введением контрольного раствора, 6-ГОДА – животные с интратриатным унилатеральным введением 6-ГОДА. Данные представлены в виде медианы (макс.–мин. значения): ##### – $p < 0,0001$ – статистически значимые различия по сравнению с ложно-оперированными животными (критерий Краскела–Уоллиса с последующим множественным сравнением по Данну); **** – $p < 0,0001$, *** – $p < 0,001$, ** – $p < 0,01$ – статистически значимые различия по сравнению с животными, претерпевшими интратриатное введение 6-ГОДА и получавшими плацебо (критерий Краскела–Уоллиса с последующим множественным сравнением по Данну).

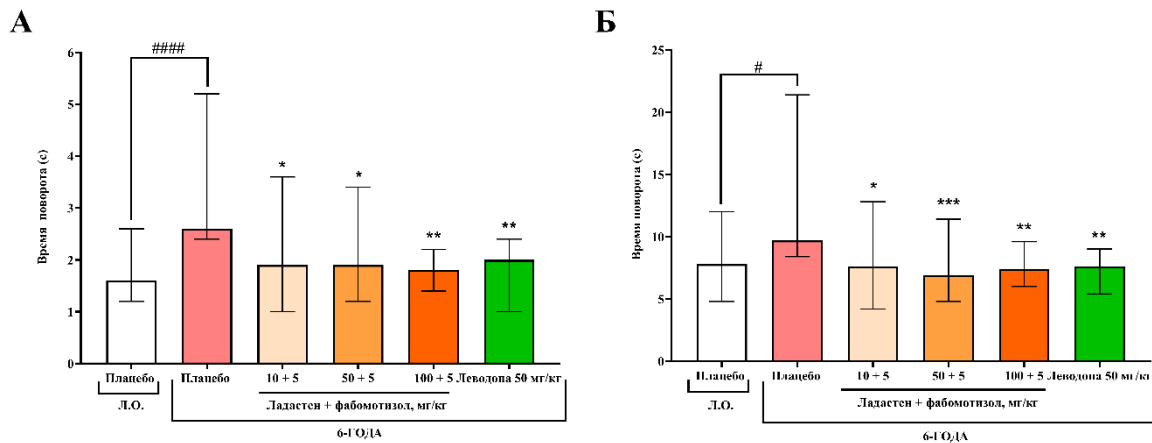
Рисунок 18 – Влияние комбинаций ладастена (10, 50, 100 мг/кг) с фабомотизолом (5 мг/кг) на двигательную активность мышей с 6-ГОДА-индуцированным паркинсоническим синдромом в тесте «вращающийся стержень» при постоянной (А) и нарастающей (Б) скорости вращения стержня

Комбинация ладастена в дозе 10 мг/кг с фабомотизолом в дозе 5 мг/кг достоверно увеличивала время удержания мышей только при нарастающей скорости вращения в 1,78 раза ($p < 0,01$) (Рисунок 18 Б), в то время как комбинации фабомотизола в дозе 5 мг/кг с ладастеном в дозах 50 и 100 мг/кг способствовали увеличению времени пребывания на стержне при постоянной скорости вращения, превышая показатели контрольной группы в 3,2 раза ($p < 0,0001$) (Рисунок 18 А), а при нарастающей – 1,8 раза ($p < 0,001$ для

комбинации с ладастеном в дозе 50 мг/кг; $p < 0,01$ для комбинации с ладастеном в дозе 100 мг/кг) (Рисунок 18 Б).

При введении препарата сравнения леводопы наблюдалось увеличение времени пребывания мышей на стержне в 3,2 раза ($p < 0,001$) при постоянной и в 2 раза ($p < 0,0001$) при нарастающей скорости вращения по сравнению с контролем (Рисунок 18 А, Б).

В тесте «вертикальный стержень» была зафиксирована брадикинезия, поскольку время поворота и спуска животных группы контроля превышало таковое у группы Л.О. животных в 1,6 ($p < 0,0001$) и 1,2 ($p < 0,05$) раза соответственно (Рисунок 19 А, Б).



Примечание – Л.О. – ложно-оперированные животные с интратриатным унилатеральным введением контрольного раствора, 6-ГОДА – животные с интратриатным унилатеральным введением 6-ГОДА. Данные представлены в виде медианы (макс.–мин. значения): ##### – $p < 0,0001$, # – $p < 0,05$ – статистически значимые различия по сравнению с ложно-оперированными животными (критерий Краскела–Уоллиса с последующим множественным сравнением по Данну); *** – $p < 0,001$, ** – $p < 0,01$, * – $p < 0,05$ – статистически значимые различия по сравнению с животными, претерпевшими интратриатное введение 6-ГОДА и получавшими плацебо (критерий Краскела–Уоллиса с последующим множественным сравнением по Данну).

Рисунок 19 – Влияние комбинаций ладастена (10, 50, 100 мг/кг) с фабомотизолом (5 мг/кг) на выраженность брадикинезии у мышей с 6-ГОДА-индуцированным паркинсоническим синдромом в тесте «вертикальный стержень»: время поворота (А), время спуска со стержня (Б)

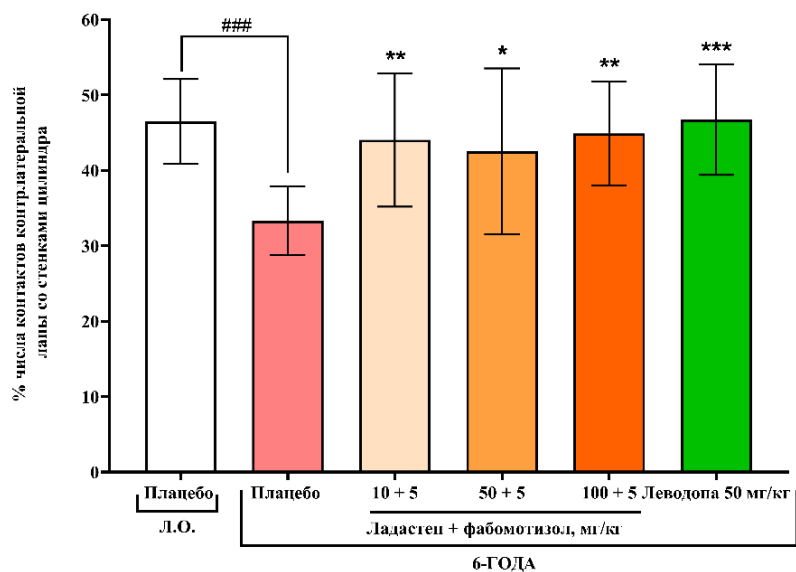
При введении комбинации ладастена в дозе 10 мг/кг с фабомотизолом в дозе 5 мг/кг время поворота сокращалось в 1,37 раза ($p < 0,05$), а время спуска в 1,28 раза ($p < 0,05$) по сравнению с контролем (Рисунок 19 А, Б), в то время

как фабомотизол в дозе 5 мг/кг с ладастеном в дозе 100 мг/кг сокращали время поворота в 1,4 раза ($p < 0,01$), а время спуска – в 1,3 раза ($p < 0,01$) по сравнению с контролем (Рисунок 19 А, Б). При этом введение ладастена в дозе 50 мг/кг с фабомотизолом в дозе 5 мг/кг наиболее эффективно снижало выраженность брадикинезии, поскольку наблюдалось снижение времени поворота в 1,37 раза ($p < 0,05$) (Рисунок 19 А) и времени спуска в 1,4 раза ($p < 0,001$) по сравнению с контролем (Рисунок 19 Б). Леводоба также достоверно устраняла брадикинезию у животных, уменьшая время поворота в 1,3 раза ($p < 0,01$), а время спуска в 1,28 раза ($p < 0,01$) по сравнению с группой контроля (Рисунок 19 А, Б).

Моторная асимметрия, проявившаяся акинезией контрлатеральной к стороне повреждения передней конечности (левой лапы), была зафиксирована у группы контроля в тесте «цилиндр», что выражалось в 33,3% контактов от общего числа, которое было ниже в 1,4 раза ($p < 0,001$) (Рисунок 20) по сравнению с группой Л.О. животных.

Комбинации ладастена с фабомотизолом во всем дозовом диапазоне достоверно восстанавливали способность мышей использовать левую лапу до значений, сопоставимых со значениями Л.О. животных (Рисунок 20). Наибольшее задействование левой лапы в тесте «цилиндр» у мышей наблюдалось при введении комбинации ладастена в дозе 100 мг/кг с фабомотизолом в дозе 5 мг/кг и составляло 44,9% от общего числа контактов, что превышало в 1,35 раза ($p < 0,01$) данный показатель группы контроля (Рисунок 20).

В свою очередь, леводоба также повышала процент задействования контрлатеральной к стороне повреждения конечности у мышей до значений Л.О. животных, а именно до 46,7% от общего числа контактов, что позволяло животным задействовать левую лапу в 1,4 раза ($p < 0,001$) чаще по сравнению с контролем (Рисунок 20).



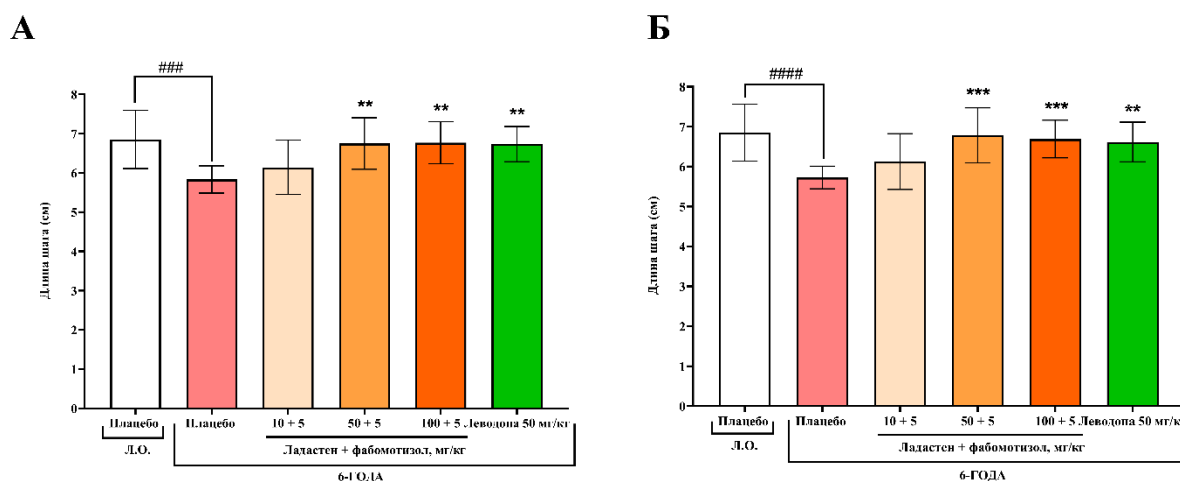
Примечание – Л.О. – ложно-оперированные животные с интрастриатным унилатеральным введением контрольного раствора, 6-ГОДА – животные с интрастриатным унилатеральным введением 6-ГОДА. Данные представлены в виде среднего \pm стандартное отклонение: ### – $p < 0,001$ – статистически значимые различия по сравнению с ложно-оперированными животными (однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) с множественным сравнением по Даннету); *** – $p < 0,001$, ** – $p < 0,01$, * – $p < 0,05$ – статистически значимые различия по сравнению с животными, претерпевшими интрастриатное введение 6-ГОДА и получавшими плацебо (однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) с множественным сравнением по Даннету).

Рисунок 20 – Влияние комбинаций ладастена (10, 50, 100 мг/кг) с фабомотизолом (5 мг/кг) на выраженность моторной асимметрии передних конечностей у мышей с 6-ГОДА-индуцированным паркинсоническим синдромом в тесте «цилиндр»

Экстрапирамидная ригидность проявилась в тесте «длина шага», поскольку длина шага передних и задних лап у мышей группы контроля была меньше на 1,1 см (15,9%; $p < 0,001$) (Рисунок 21 А) и 1,2 см (17,4%; $p < 0,0001$) соответственно (Рисунок 21 Б) по сравнению с Л.О. животными.

Комбинированное введение фабомотизола в дозе 5 мг/кг с ладастеном в дозе 10 мг/кг мышам не приводило к достоверным улучшениям походки животных (Рисунок 21 А, Б), в то время как комбинации ладастена в дозах 50 и 100 мг/кг с фабомотизолом в дозе 5 мг/кг снижали выраженность ригидности, увеличивая длину шага передних лап на 1 см ($p < 0,01$) (Рисунок 21 А), а задних – на 1,1 см (19,3%; $p < 0,001$) и на 1,0 см (17,5%; $p < 0,001$) соответственно по сравнению с группой контроля (Рисунок 21 Б).

Леводопа также снижала выраженность ригидности у мышей, увеличивая длину шага передних и задних лап на 0,9 см (15,5%; $p < 0,01$) и 0,9 см (15,8%; $p < 0,01$) соответственно по сравнению с контролем (Рисунок 21 А, Б).



Примечание – Л.О. – ложно-оперированные животные с интрастриатным унилатеральным введением контрольного раствора, 6-ГОДА – животные с интрастриатным унилатеральным введением 6-ГОДА. Данные представлены в виде среднего \pm стандартное отклонение: ##### – $p < 0,0001$, ### – $p < 0,001$ – статистически значимые различия по сравнению с ложно-оперированными животными (однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) с множественным сравнением по Даннету); *** – $p < 0,001$, ** – $p < 0,01$ – статистически значимые различия по сравнению с животными, претерпевшими интрастриатное введение 6-ГОДА и получавшими плацебо) (однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) с множественным сравнением по Даннету).

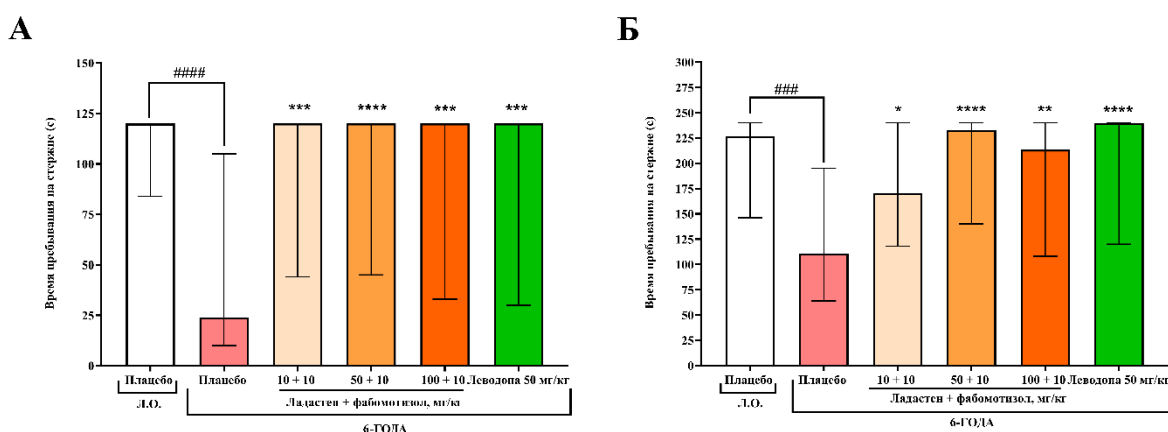
Рисунок 21 – Влияние комбинаций ладастена (10, 50, 100 мг/кг) с фабототизолом (5 мг/кг) на выраженность экстрапирамидной ригидности передних (А) и задних (Б) лап мышей с 6-ГОДА-индуцированным паркинсоническим синдромом в тесте «длина шага»

Таким образом, наиболее выраженное снижение различных проявлений БП, оцениваемых в поведенческих тестах, достигалось при комбинированном введении ладастена в дозах 50 и 100 мг/кг с фабототизолом в дозе 5 мг/кг на модели ПС, вызванного интрастриатным унилатеральным введением 6-ГОДА мышам.

Далее оценивалось антипаркинсоническое действие комбинаций ладастена в дозах 10, 50, 100 мг/кг с фабототизолом в дозе 10 мг/кг на модели ПС, вызванного унилатеральным интрастриатным введением 6-ГОДА. В тесте

«вращающийся стержень» время удержания мышей группы контроля было снижено в 5 раз ($p < 0,0001$) при постоянной (Рисунок 22 А) и в 2 раза ($p < 0,001$) при нарастающей (Рисунок 22 Б) скорости вращения стержня по сравнению с Л.О. животными.

Введение комбинаций ладастена с фабомотизолом во всем дозовом диапазоне в течение 14 дней способствовало улучшению двигательной активности мышей до значений группы Л.О. животных, поскольку в варианте при постоянной скорости вращения стержня время удержания было достоверно в 5 раз больше (Рисунок 22 А) по сравнению с контролем. Леводопа оказывала аналогичное действие на время удержания мышей при постоянной скорости вращения стержня (Рисунок 22 А).



Примечание – Л.О. – ложно-оперированные животные с интрастриатным унилатеральным введением контрольного раствора, 6-ГОДА – животные с интрастриатным унилатеральным введением 6-ГОДА. Данные представлены в виде медианы (макс.–мин. значения): ##### – $p < 0,0001$, ### – $p < 0,001$ – статистически значимые различия по сравнению с ложно-оперированными животными (критерий Краскела–Уоллиса с последующим множественным сравнением по Данну); **** – $p < 0,0001$, *** – $p < 0,001$, ** – $p < 0,01$, * – $p < 0,05$ – статистически значимые различия по сравнению с животными, претерпевшими интрастриатное введение 6-ГОДА и получавшими плацебо (критерий Краскела–Уоллиса с последующим множественным сравнением по Данну).

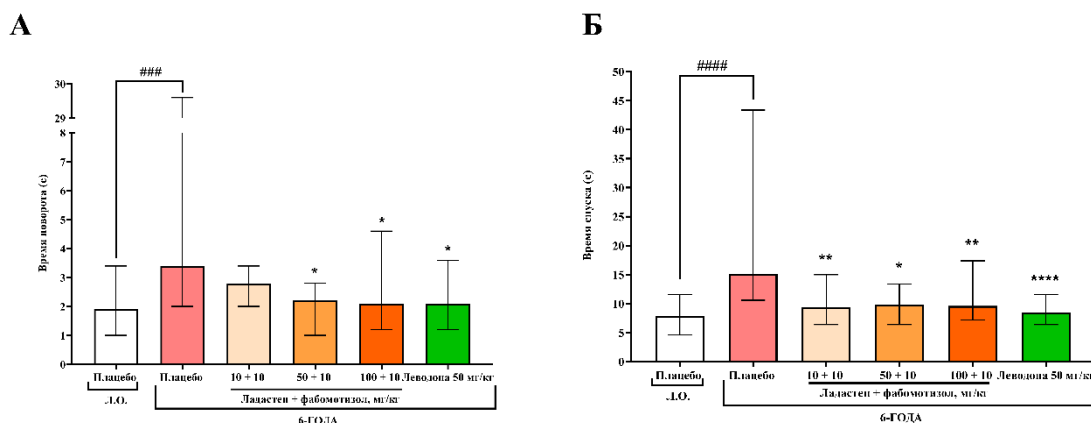
Рисунок 22 – Влияние комбинаций ладастена (10, 50, 100 мг/кг) с фабомотизолом (10 мг/кг) на двигательную активность мышей с 6-ГОДА-индуцированным паркинсоническим синдромом в тесте «вращающийся стержень» при постоянной (А) и нарастающей (Б) скорости вращения стержня

При нарастающей скорости вращения стержня наименьшее влияние оказала комбинация ладастена в дозе 10 мг/кг с фабомотизолом в дозе 10 мг/кг, увеличивая время удерживания в 1,5 раза ($p < 0,05$) по сравнению с контролем, в то время как наибольшее увеличение времени удерживания было зафиксировано в группе ладастен 50 мг/кг + фабомотизол 10 мг/кг, поскольку превышало в 2,1 раза ($p < 0,0001$) время удержания группы контроля (Рисунок 22 Б). Комбинация ладастена в дозе 100 мг/кг с фабомотизолом в дозе 10 мг/кг превышала данный показатель в 1,9 раза ($p < 0,01$) по сравнению с контролем (Рисунок 22 Б).

Также при нарастающей скорости вращения леводопа повышала время удержания мышей на стержне в 2,2 раза ($p < 0,0001$) по сравнению с контролем (Рисунок 22 Б).

Брадиканезия проявлялась замедлением выполнения движений на установке в тесте «вертикальный стержень», поскольку время поворота и спуска у группы контроля превышало в 1,8 раза (Рисунок 23 А) и 1,9 раза (Рисунок 23 Б) соответственно данные показатели группы Л.О. животных.

Наименьшая доза ладастена 10 мг/кг в комбинации с фабомотизолом 10 мг/кг достоверно снижала лишь время спуска у мышей, сокращая его в 1,6 раза ($p < 0,01$) по сравнению с контролем (Рисунок 23 Б). При этом наиболее эффективное воздействие оказала комбинации фабомотизола в дозе 10 мг/кг с ладастеном в дозах 50 и 100 мг/кг, поскольку время поворота сокращалось в 1,55 раза ($p < 0,05$) и 1,6 раза ($p < 0,05$) соответственно (Рисунок 23А), а время спуска – в 1,53 раза ($p < 0,05$) и в 1,56 раза ($p < 0,01$) соответственно (Рисунок 23 Б) по сравнению с контролем. В свою очередь, леводопа сокращала время поворота в 1,6 раза ($p < 0,05$) (Рисунок 23 А) и спуска в 1,76 раза ($p < 0,0001$) (Рисунок 23 Б) по сравнению с контролем.



Примечание – Л.О. – ложно-оперированные животные с интрастриатным унилатеральным введением контрольного раствора, 6-ГОДА – животные с интрастриатным унилатеральным введением 6-ГОДА. Данные представлены в виде медианы (макс.–мин. значения): ##### – $p < 0,0001$, #### – $p < 0,001$ – статистически значимые различия по сравнению с ложно-оперированными животными (критерий Краскела–Уоллиса с последующим множественным сравнением по Данну); **** – $p < 0,0001$, ** – $p < 0,01$, * – $p < 0,05$ – статистически значимые различия по сравнению с животными, претерпевшими интрастриатное введение 6-ГОДА и получавшими плацебо (критерий Краскела–Уоллиса с последующим множественным сравнением по Данну).

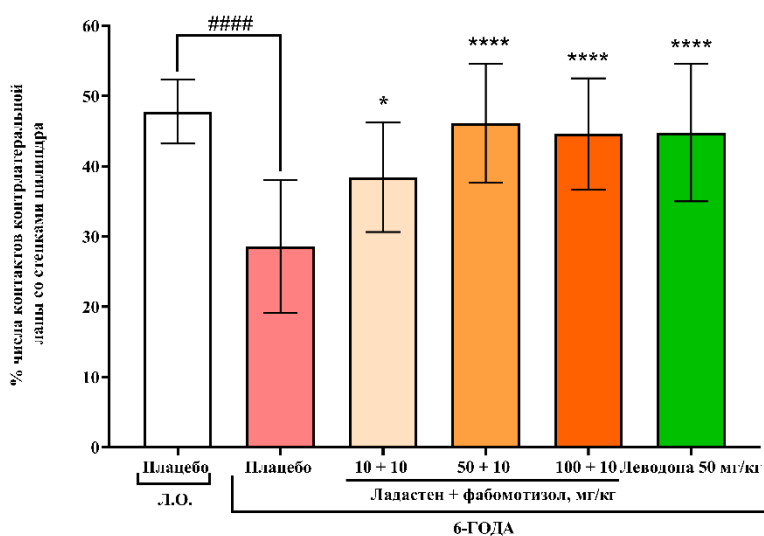
Рисунок 23 – Влияние комбинаций ладастена (10, 50, 100 мг/кг) с фабототизолом (10 мг/кг) на выраженность брадикинезии у мышей с 6-ГОДА-индуцированным паркинсоническим синдромом в тесте «вертикальный стержень»: время поворота (А), время спуска со стрежня (Б)

В тесте «цилиндр» наблюдалось развитие моторной асимметрии передних конечностей у мышей группы контроля, выражающееся в задействовании контрлатеральной к стороне повреждения (левой) лапы лишь в 28,6% от общего числа контактов, что было в 1,67 раза ($p < 0,0001$) ниже по сравнению с Л.О. животными (Рисунок 24).

Совместное введение ладастена с фабототизолом достоверно устраняло моторную асимметрию передних конечностей у мышей во всем диапазоне доз. Так, комбинация ладастена в дозе 10 мг/кг с фабототизолом в дозе 10 мг/кг увеличивала задействие левой лапы до 38,4%, что превышало в 1,34 раза ($p < 0,05$) данный показатель контрольной группы (Рисунок 24). Наибольшее улучшение наблюдалось на фоне комбинации ладастена в дозе 50 мг/кг с фабототизолом в дозе 10 мг/кг, поскольку использование левой лапы увеличилось до 46,2% от общего числа контактов, что было в 1,62 раза ($p <$

0,0001) чаще по сравнению с группой контроля (Рисунок 24). При этом комбинация ладастена в дозе 100 мг/кг с фабототизолом в дозе 10 мг/кг способствовала повышению задействования контрлатеральной к стороне повреждения передней конечности до 44,6% от общего числа контактов, что позволяло использовать левую лапу чаще в 1,56 раза ($p < 0,0001$) по сравнению с контролем (Рисунок 24).

Леводопа достоверно повышала задействование левой передней лапы до 44,8% от общего числа контактов, что превышало в 1,57 раза данный показатель контроля (Рисунок 24).

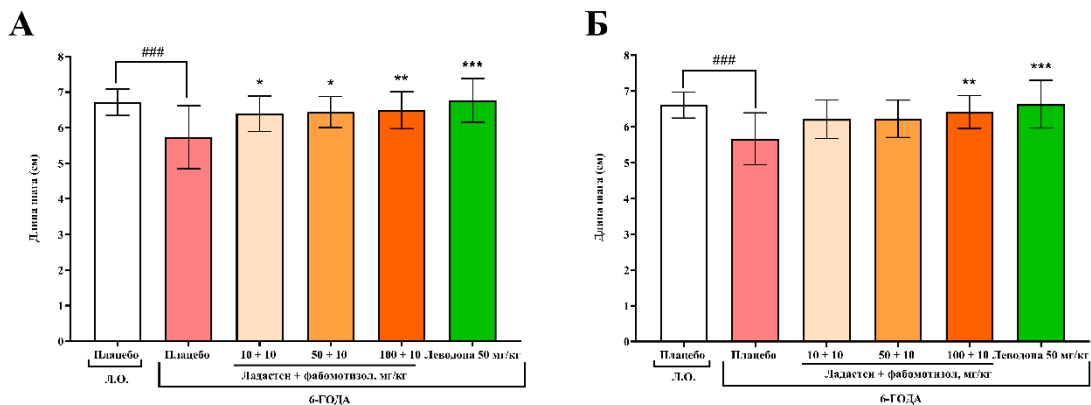


Примечание – Л.О. – ложно-оперированные животные с интрастриатным унилатеральным введением контрольного раствора, 6-ГОДА – животные с интрастриатным унилатеральным введением 6-ГОДА. Данные представлены в виде среднего \pm стандартное отклонение: #### – $p < 0,0001$ – статистически значимые различия по сравнению с ложно-оперированными животными (однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) с множественным сравнением по Даннету); **** – $p < 0,0001$, * – $p < 0,05$ – статистически значимые различия по сравнению с животными, претерпевшими интрастриатное введение 6-ГОДА и получавшими плацебо (однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) с множественным сравнением по Даннету).

Рисунок 24 – Влияние комбинаций ладастена (10, 50, 100 мг/кг) с фабототизолом (10 мг/кг) на выраженность моторной асимметрии передних конечностей у мышей с 6-ГОДА-индуцированным паркинсоническим синдромом в тесте «цилиндр»

В тесте «длина шага» наблюдалось развитие экстрапирамидной ригидности у контроля, поскольку длина шага передних лап была меньше на

1 см (14,9%) (Рисунок 25 А), а задних – на 0,9 см (13,6%) (Рисунок 25 Б) по сравнению с Л.О. животными. Во всем диапазоне доз комбинации ладастена с фабомотизолом наблюдали восстановление походки практически до значений Л.О. животных, поскольку комбинации ладастена в дозах 50 и 10 мг/кг с фабомотизолом в дозе 10 мг/кг увеличивали длину шага передних лап на 0,7 см (12,3%; $p < 0,05$) (Рисунок 25 А) по сравнению с контролем. Данные комбинации также влияли на длину шага задних лап мышей, увеличивая ее на 0,5 см (8,8%), однако данное воздействие не имело статистической значимости (Рисунок 25 Б). При этом достоверное влияние на ригидность оказывала также комбинация ладастена в дозе 100 мг/кг с фабомотизолом в дозе 10 мг/кг, увеличив длину шага передних лап на 0,8 см (14%; $p < 0,01$) (Рисунок 25 А) и задних лап на 0,7 см (12,3%; $p < 0,01$) (Рисунок 25 Б) по сравнению с контролем.



Примечание – Л.О. – ложно-оперированные животные с интратриатным унилатеральным введением контрольного раствора, 6-ГОДА – животные с интратриатным унилатеральным введением 6-ГОДА. Данные представлены в виде среднего \pm стандартное отклонение: ### – $p < 0,001$ – статистически значимые различия по сравнению с ложно-оперированными животными (однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) с множественным сравнением по Даннету); *** – $p < 0,001$, ** – $p < 0,01$, * – $p < 0,05$ – статистически значимые различия по сравнению с животными, претерпевшими интратриатное введение 6-ГОДА и получавшими плацебо (однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) с множественным сравнением по Даннету).

Рисунок 25 – Влияние комбинаций ладастена (10, 50, 100 мг/кг) с фабомотизолом (10 мг/кг) на выраженность экстрапирамидной ригидности передних (А) и задних (Б) лап мышей с 6-ГОДА-индуцированным паркинсоническим синдромом в тесте «длина шага»

Леводопа повышала длину шага передних лап на 1,1 см (19,3%; $p < 0,01$) (Рисунок 25 А), а задних – на 0,9 см (15,8%; $p < 0,01$) (Рисунок 25 Б) по сравнению с контролем.

По полученным результатам можно заключить, что наиболее выраженное снижение различных проявлений БП наблюдалось при комбинированном введении ладастена в дозах 50 и 100 мг/кг с фабомотизолом в дозе 10 мг/кг на модели ПС, вызванного интрастриатным унилатеральным введением 6-ГОДА. При этом эффективность вводимых комбинаций ладастена с фабомотизолом была сопоставима с эффективностью леводопы.

Обобщая результаты всех поведенческих тестов, можно заключить, что комбинации фабомотизола 10 мг/кг с ладастеном 50 и 100 мг/кг являются более эффективными, чем комбинации фабомотизола 5 мг/кг с ладастеном 50 и 100 мг/кг в снижении различных проявлений ПС. Так, комбинации ладастена в дозах 50 и 100 мг/кг с фабомотизолом в дозе 10 мг/кг снижали выраженность моторного дефицита и нарушенной координации движений в тесте «вращающийся стержень» в среднем в 5 раз ($p < 0,0001$) при постоянной скорости вращения стержня и 2 раза ($p < 0,001$) при нарастающей скорости вращения стержня по сравнению с контролем, в то время как комбинации ладастена в дозах 50 и 100 мг/кг с фабомотизолом в дозе 5 мг/кг снижали подобные проявления ПС в данном тесте в среднем в 3,2 раза ($p < 0,0001$) при постоянной скорости вращения стержня, при нарастающей скорости вращения – в 1,8 раза ($p < 0,001$) по сравнению с контролем. Сходным образом в тесте «вертикальный стержень» комбинации ладастена в дозах 50 и 100 мг/кг с фабомотизолом в дозе 10 мг/кг сокращали время поворота в среднем в 1,6 раза ($p < 0,05$) и время спуска в 1,5 раза ($p < 0,05$) по сравнению с контролем, в то время как комбинации ладастена в дозах 50 и 100 мг/кг с фабомотизолом в дозе 5 мг/кг сокращали время поворота в среднем в 1,4 раза ($p < 0,05$) и время спуска в 1,4 раза ($p < 0,001$) по сравнению с контролем. В тесте «цилиндр» на фоне комбинаций ладастена в дозах 50 и 100 мг/кг с фабомотизолом в дозе 10 мг/кг использование контрлатеральной лапы в среднем составляло 45,4% от

общего числа контактов, что превышало данный показатель контроля в 1,6 раза ($p < 0,0001$), а на фоне комбинаций ладастена в дозах 50 и 100 мг/кг с фабомотизолом в дозе 5 мг/кг использование контрлатеральной конечности в среднем составляло 43,7%, что было в 1,3 раза ($p < 0,01$) чаще по сравнению с контролем. Однако, в тесте «длина шага» комбинации ладастена в дозах 50 и 100 мг/кг с фабомотизолом в дозе 10 мг/кг оказались чуть менее эффективными, поскольку приводили к увеличению длины шага передних лап в среднем на 0,75 см (13,2%; $p < 0,05$), а задних – на 0,6 см (10,5%; $p < 0,001$) по сравнению с контролем, в то время как комбинации ладастена в дозах 50 и 100 мг/кг с фабомотизолом в дозе 5 мг/кг увеличивали длину шага передних конечностей в среднем на 1 см (17,2%; $p < 0,01$), а задних – на 1,1 см (19,3%; $p < 0,001$) по сравнению с контролем.

Синергизм в комбинациях ладастена в дозе 50 мг/кг с фабомотизолом в дозе 10 мг/кг и ладастена в дозе 100 мг/кг с фабомотизолом в дозе 10 мг/кг проявился в основном в виде аддитивного действия в тестах «вращающийся стержень» и «цилиндр» (Таблица 8), поскольку укладывается в формулу [18]: эффект комбинации ладастена с фабомотизолом $>$ эффекта ладастена, эффекта фабомотизола, но эффект комбинации ладастена с фабомотизолом $<$ эффекта ладастена + эффект фабомотизола. При этом синергизм в комбинациях ладастена с фабомотизолом в дозе 5 мг/кг практически не был выражен, за исключением теста «вращающийся стержень» при нарастающей скорости (Таблица 8). В тесте «вертикальный стержень» не было зафиксировано синергичного действия при комбинации ладастена (10, 50, 100 мг/кг) с фабомотизолом (5, 10 мг/кг).

Таблица 8 – Оценка синергичного влияния комбинаций ладастена с фабомотизолом в поведенческих тестах на модели 6-ГОДА-индуцированного паркинсонического синдрома у мышей

Группа	Эффект ожидаемый (в разях относительно группы 6-ГОДА + плацебо)	Эффект наблюдаемый (в разях относительно группы 6-ГОДА + плацебо)	Вид синергизма
Тест «вращающийся стержень» (постоянная скорость)			
Ладастен 10 мг/кг	Присутствует	Присутствует, 3,47	–
Ладастен 50 мг/кг	Присутствует	Присутствует, 4,90	–
Ладастен 100 мг/кг	Присутствует	Присутствует, 4,90	–
Фабомотизол 5 мг/кг	Присутствует	Присутствует, 2,92	–
Фабомотизол 10 мг/кг	Присутствует	Присутствует, 3,3	–
Ладастен 10 мг/кг + фабомотизол 5 мг/кг	Присутствует, 6,42	Присутствует, 1,91	Не выражен
Ладастен 10 мг/кг + фабомотизол 10 мг/кг	Присутствует, 6,80	Присутствует, 5,00	Аддитивное действие
Ладастен 50 мг/кг + фабомотизол 5 мг/кг	Присутствует, 7,81	Присутствует, 3,24	Не выражен
Ладастен 50 мг/кг + фабомотизол 10 мг/кг	Присутствует, 8,20	Присутствует, 5,00	Аддитивное действие
Ладастен 100 мг/кг + фабомотизол 5 мг/кг	Присутствует, 7,81	Присутствует, 3,24	Не выражен
Ладастен 100 мг/кг + фабомотизол 10 мг/кг	Присутствует, 8,20	Присутствует, 5,00	Аддитивное действие
Тест «вращающийся стержень» (нарастающая скорость)			
Ладастен 10 мг/кг	Присутствует	Присутствует, 1,30	–
Ладастен 50 мг/кг	Присутствует	Присутствует, 1,72	–
Ладастен 100 мг/кг	Присутствует	Присутствует, 1,47	–
Фабомотизол 5 мг/кг	Присутствует	Присутствует, 1,59	–
Фабомотизол 10 мг/кг	Присутствует	Присутствует, 1,63	–
Ладастен 10 мг/кг + фабомотизол 5 мг/кг	Присутствует, 2,89	Присутствует, 1,78	Аддитивное действие
Ладастен 10 мг/кг + фабомотизол 10 мг/кг	Присутствует, 2,93	Присутствует, 1,54	Не выражен
Ладастен 50 мг/кг + фабомотизол 5 мг/кг	Присутствует, 3,31	Присутствует, 1,81	Аддитивное действие
Ладастен 50 мг/кг + фабомотизол 10 мг/кг	Присутствует, 3,35	Присутствует, 2,10	Аддитивное действие
Ладастен 100 мг/кг + фабомотизол 5 мг/кг	Присутствует, 3,06	Присутствует, 1,82	Не выражен

Продолжение Таблицы 8

Ладастен 100 мг/кг + фабомотизол 10 мг/кг	Присутствует, 3,11	Присутствует, 1,93	Аддитивное действие
Тест «вертикальный стержень» (время поворота)			
Ладастен 10 мг/кг	Присутствует	Присутствует, 1,88	–
Ладастен 50 мг/кг	Присутствует	Присутствует, 2,04	–
Ладастен 100 мг/кг	Присутствует	Присутствует, 2,04	–
Фабомотизол 5 мг/кг	Присутствует	Присутствует, 2,79	–
Фабомотизол 10 мг/кг	Присутствует	Присутствует, 2,79	–
Ладастен 10 мг/кг + фабомотизол 5 мг/кг	Присутствует, 4,67	Присутствует, 1,37	Не выражен
Ладастен 10 мг/кг + фабомотизол 10 мг/кг	Присутствует, 4,67	Присутствует, 1,21	Не выражен
Ладастен 50 мг/кг + фабомотизол 5 мг/кг	Присутствует, 4,83	Присутствует, 1,37	Не выражен
Ладастен 50 мг/кг + фабомотизол 10 мг/кг	Присутствует, 4,83	Присутствует, 1,55	Не выражен
Ладастен 100 мг/кг + фабомотизол 5 мг/кг	Присутствует, 4,83	Присутствует, 1,44	Не выражен
Ладастен 100 мг/кг + фабомотизол 10 мг/кг	Присутствует, 4,83	Присутствует, 1,62	Не выражен
Тест «вертикальный стержень» (время спуска)			
Ладастен 10 мг/кг	Присутствует	Присутствует, 2,20	–
Ладастен 50 мг/кг	Присутствует	Присутствует, 2,50	–
Ладастен 100 мг/кг	Присутствует	Присутствует, 2,45	–
Фабомотизол 5 мг/кг	Присутствует	Присутствует, 1,99	–
Фабомотизол 10 мг/кг	Присутствует	Присутствует, 2,50	–
Ладастен 10 мг/кг + фабомотизол 5 мг/кг	Присутствует, 4,18	Присутствует, 1,28	Не выражен
Ладастен 10 мг/кг + фабомотизол 10 мг/кг	Присутствует, 4,70	Присутствует, 1,61	Не выражен
Ладастен 50 мг/кг + фабомотизол 5 мг/кг	Присутствует, 4,49	Присутствует, 1,41	Не выражен
Ладастен 50 мг/кг + фабомотизол 10 мг/кг	Присутствует, 5,00	Присутствует, 1,54	Не выражен
Ладастен 100 мг/кг + фабомотизол 5 мг/кг	Присутствует, 4,44	Присутствует, 1,31	Не выражен
Ладастен 100 мг/кг + фабомотизол 10 мг/кг	Присутствует, 4,95	Присутствует, 1,57	Не выражен
Тест «цилиндр»			
Ладастен 10 мг/кг	Присутствует	Присутствует, 1,20	–

Продолжение Таблицы 8

Ладастен 50 мг/кг	Присутствует	Присутствует, 1,42	–
Ладастен 100 мг/кг	Присутствует	Присутствует, 1,43	–
Фабомотизол 5 мг/кг	Присутствует	Присутствует, 1,40	–
Фабомотизол 10 мг/кг	Присутствует	Присутствует, 1,48	–
Ладастен 10 мг/кг + фабомотизол 5 мг/кг	Присутствует, 2,59	Присутствует, 1,32	Не выражен
Ладастен 10 мг/кг + фабомотизол 10 мг/кг	Присутствует, 2,68	Присутствует, 1,62	Аддитивное действие
Ладастен 50 мг/кг + фабомотизол 5 мг/кг	Присутствует, 2,82	Присутствует, 1,35	Не выражен
Ладастен 50 мг/кг + фабомотизол 10 мг/кг	Присутствует, 2,91	Присутствует, 1,62	Аддитивное действие
Ладастен 100 мг/кг + фабомотизол 5 мг/кг	Присутствует, 2,83	Присутствует, 1,35	Не выражен
Ладастен 100 мг/кг + фабомотизол 10 мг/кг	Присутствует, 2,91	Присутствует, 1,56	Аддитивное действие

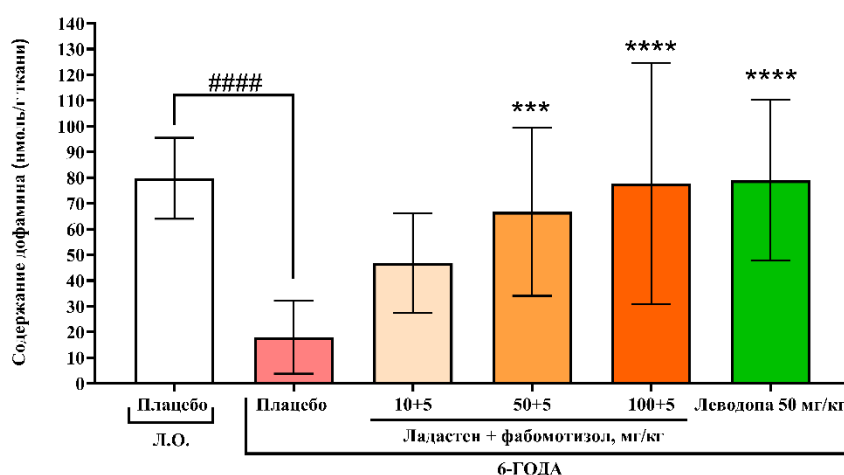
Таким образом, по совокупности имеющихся данных поведенческих тестов, наиболее эффективными относительно контроля являлись комбинации ладастена в дозах 50 и 100 мг/кг с фабомотизолом в дозе 10 мг/кг.

3.3.2 Нейрохимический анализ влияния комбинаций субстанций ладастена с фабомотизолом на дофаминергическую систему головного мозга мышей на модели 6-гидроксидофамин-индуцированного паркинсонического синдрома

Через 14 дней после однократной инъекции 6-ГОДА в правое ПТ у мышей группы контроля (6-ГОДА + плацебо) было зафиксировано снижение ДА в 4,43 раза ($p < 0,0001$) по сравнению с Л.О. животными (Рисунок 26).

Комбинации ладастена (10, 50, 100 мг/кг) с фабомотизолом (5 мг/кг) способствовали предотвращению снижения уровней ДА в поврежденном ПТ. Комбинация ладастена в дозе 10 мг/кг с фабомотизолом в дозе 5 мг/кг увеличивала уровень ДА в 2,6 раза по сравнению с контролем, однако данное воздействие не было статистически достоверным (Рисунок 26), а комбинация

ладастена в дозе 50 мг/кг с фабомотизолом в дозе 5 мг/кг повышала содержание ДА в 3,7 раза ($p < 0,001$) (Рисунок 26) по сравнению с контролем. Увеличение содержания ДА до значений Л.О. животных наблюдалось при введении ладастена в дозе 100 мг/кг с фабомотизолом в дозе 5 мг/кг, поскольку превышало в 4,3 раза ($p < 0,0001$) значения контроля (Рисунок 26). При этом на фоне введения леводопы зафиксировано увеличение уровня ДА в 4,4 раза ($p < 0,0001$) по сравнению с контролем (Рисунок 26).



Примечание – Л.О. – ложно-оперированные животные с интрастриатным унилатеральным введением контрольного раствора, 6-ГОДА – животные с интрастриатным унилатеральным введением 6-ГОДА. Данные представлены в виде среднего \pm стандартное отклонение: ##### – $p < 0,0001$ – статистически значимые различия по сравнению с ложно-оперированными животными (однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) с множественным сравнением по Даннету); **** – $p < 0,0001$, *** – $p < 0,001$ – статистически значимые различия по сравнению с животными, претерпевшими интрастриатное введение 6-ГОДА и получавшими плацебо (однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) с множественным сравнением по Даннету).

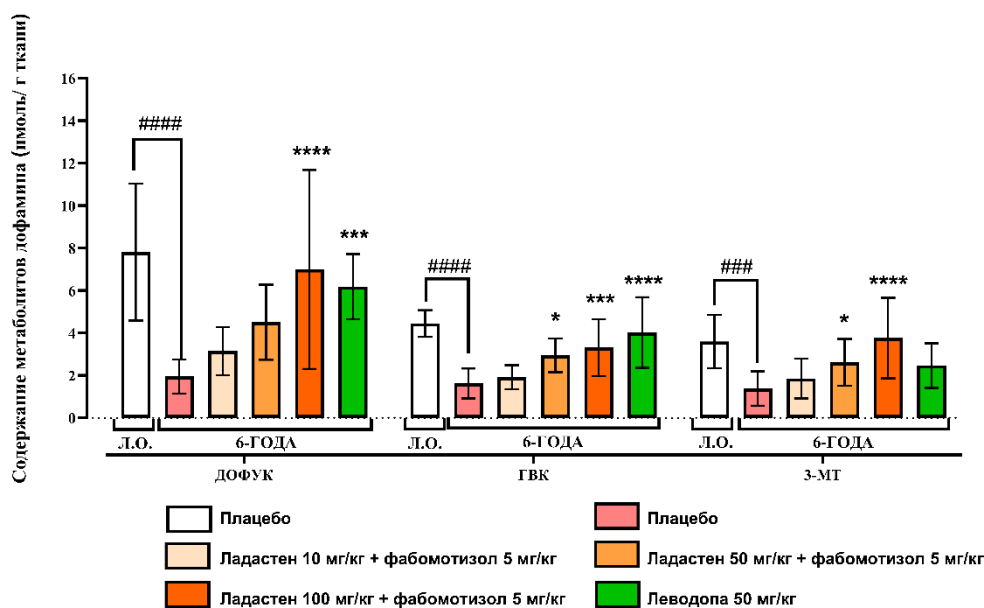
Рисунок 26 – Влияние комбинаций ладастена (10, 50, 100 мг/кг) с фабомотизолом (5 мг/кг) на уровень дофамина в поврежденном 6-ГОДА полосатом теле мышей после стереотаксической операции

Помимо выраженного уменьшения содержания ДА, у группы контроля также наблюдалось снижение уровней его метаболитов, а именно ДОФУК в 3,98 ($p < 0,0001$) и ГВК в 2,7 ($p < 0,0001$) раза по сравнению с группой Л.О. животных (Рисунок 27).

Комбинация ладастена в дозе 10 мг/кг с фабомотизолом в дозе 5 мг/кг статистически незначимо повышала уровни вышеперечисленных метаболитов ДА по сравнению с контролем, при этом на фоне комбинации ладастена в дозе

50 мг/кг с фабомотизолом в дозе 5 мг/кг наблюдалось увеличение содержания ДОФУК в 2,3 раза и ГВК в 1,8 раза ($p < 0,05$) по сравнению с контролем. В то же время, комбинация ладастена в дозе 100 мг/кг с фабомотизолом в дозе 5 мг/кг повышала уровни ДОФУК в 3,6 раза ($p < 0,0001$) и ГВК – в 2 раза ($p < 0,001$) по сравнению с контролем (Рисунок 27).

Леводопа увеличивала содержание ДОФУК в 3,15 раза ($p < 0,001$), а ГВК – в 2,47 раза ($p < 0,0001$) по сравнению с контролем (Рисунок 27).



Примечание – Л.О. – ложно-оперированные животные с интрастриатным унилатеральным введением контрольного раствора, 6-ГОДА – животные с интрастриатным унилатеральным введением 6-ГОДА. Данные представлены в виде среднего \pm стандартное отклонение: ##### – $p < 0,0001$, ### – $p < 0,001$ – статистически значимые различия по сравнению с ложно-оперированными животными (однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) с множественным сравнением по Даннету); **** – $p < 0,0001$, *** – $p < 0,001$, * – $p < 0,05$ – статистически значимые различия по сравнению с животными, претерпевшими интрастриатное введение 6-ГОДА и получавшими плацебо (однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) с множественным сравнением по Даннету).

Рисунок 27 – Влияние комбинаций ладастена (10, 50, 100 мг/кг) с фабомотизолом (5 мг/кг) на уровень метаболитов дофамина в поврежденном 6-ГОДА полосатом теле мышей после стереотаксической операции

Кроме того, у группы контроля обнаружено достоверное снижение содержания 3-МТ в 2,6 раза ($p < 0,001$) по сравнению с Л.О. животными (Рисунок 27). Уровень данного метаболита изменялся под действием комбинаций ладастена с фабомотизолом. Так, введение ладастена в дозе 10

мг/кг с фабомотизолом в дозе 5 мг/кг статистически незначимо увеличивало содержание 3-МТ в 1,3 раза, а введение ладастена в дозе 50 мг/кг с фабомотизолом в дозе 5 мг/кг повышало уровень 3-МТ в 1,9 раза ($p < 0,05$) по сравнению с контролем. Наиболее выраженное увеличение уровня 3-МТ наблюдалось при введении ладастена в дозе 100 мг/кг с фабомотизолом в дозе 5 мг/кг – в 2,7 раза ($p < 0,0001$) по сравнению с контролем (Рисунок 27).

На фоне введения леводопы зафиксировано повышение содержания 3-МТ в 1,78 раза (Рисунок 27), однако данное влияние не было достоверным по сравнению с группой контроля.

Снижение уровня ДА и его метаболитов у контроля также прослеживается в повышении индексов утилизации ДА (Таблица 9).

Комбинированное введение ладастена (10, 50, 100 мг/кг) с фабомотизолом (5 мг/кг) оказывало воздействие на индексы утилизации ДА в поврежденном ПТ, причем во всем дозовом диапазоне, поскольку наблюдалось достоверное снижение ДОФУК/ДА, ГВК/ДА, ДОФУК+ГВК+3-МТ/ДА, что согласуется с описанной ранее динамикой изменения ДА и его метаболитов (Таблица 9). Введение леводопы мышам приводило к достоверному снижению всех метаболических отношений в поврежденном ПТ (Таблица 9).

Таблица 9 – Влияние комбинаций ладастена (10, 50, 100 мг/кг) с фабомотизолом (5 мг/кг) на метаболизм дофамина в поврежденном 6-ГОДА полосатом теле мышей после стереотаксической операции

Группа		Индексы утилизации ДА			
		ДОФУК/ДА	ГВК/ДА	3-МТ/ДА	ДОФУК+ ГВК+3- МТ/ДА
		Поврежденное полосатое тело			
Л.О.	Плацебо	0,082 (0,074–0,12)	0,056 (0,05–0,066)	0,043 (0,036–0,058)	11,4 (9,63–14,4)
	Плацебо	0,14 (0,089–0,24)	0,08 (0,067–0,3)	0,058 (0,035–0,26)	3,73 #### (2,85–4,29)
6-ГОДА	Ладастен 10 мг/кг + фабомотизол 5 мг/кг	0,071** (0,054–0,087)	0,042 *** (0,038–0,054)	0,04 (0,03–0,044)	5,4 (3,42–6,5)
	Ладастен 50 мг/кг + фабомотизол 5 мг/кг	0,07 ** (0,054–0,093)	0,041 ** (0,036–0,083)	0,04 (0,033–0,052)	7,73 * (4,94–9,48)
	Ладастен 100 мг/кг + фабомотизол 5 мг/кг	0,1 (0,065–0,13)	0,045 ** (0,037–0,065)	0,047 (0,04–0,061)	8,33 *** (5,12–17,3)
	Леводопа 50 мг/кг	0,074 * (0,062–0,12)	0,055 * (0,037–0,072)	0,03 ** (0,026–0,037)	10,2 **** (8,29–11,7)
	Леводопа 50 мг/кг	0,074 * (0,062–0,12)	0,055 * (0,037–0,072)	0,03 ** (0,026–0,037)	10,2 **** (8,29–11,7)

Примечание – Л.О. – ложно-оперированные животные, 6-ГОДА – животные с унилатеральным интрастриатным введением 6-ГОДА, ДА – дофамин, ДОФУК – 3,4-дигидроксифенилуксусная кислота, ГВК – гомованилиновая кислота, 3-МТ – 3-метокситирамин. Данные представлены в виде медианы и квартилей (median (q25–75)): #### – $p < 0,0001$ – статистически значимые различия по сравнению с ложно-оперированными животными (критерий Краскела–Уоллиса с множественным сравнением по Данну); **** – $p < 0,0001$, *** – $p < 0,001$, ** – $p < 0,01$, * – $p < 0,05$ – статистически значимые различия по сравнению с животными, претерпевшими интрастриатное введение 6-ГОДА и получавшими плацебо (критерий Краскела–Уоллиса с множественным сравнением по Данну).

Нейрохимический анализ интактного ПТ мышей не выявил статистически значимых различий между контрольной группой и Л.О. животными, а также между опытными группами, получавшими комбинации ладастена (10, 50, 100 мг/кг) с фабомотизолом (5 мг/кг) или леводопу. Аналогично не было зафиксировано статистически значимых различий в индексах утилизации ДА (Таблица 10).

Таблица 10 – Влияние комбинаций ладастена (10, 50, 100 мг/кг) с фабомотизолом (5 мг/кг) на содержание дофамина и его метаболитов, а также индексы утилизации дофамина в интактном полосатом теле мышей после стереотаксической операции

Группа		Содержание дофамина и его метаболитов (нмоль/г ткани) и индексы утилизации ДА							
		ДА	ДОФУК	ГВК	3-МТ	ДОФУК/ ДА	ГВК/ ДА	3- МТ/ДА	ДОФУК + ГВК+ 3- МТ/ДА
		Интактное полосатое тело							
Л.О.	Плацебо	76,1 ± 26,6	7,14 ± 2,01	4,52 ± 0,93	4,18 ± 1,58	0,099 (0,072– 0,13)	0,059 (0,04– 0,082)	0,053 (0,038– 0,086)	11,8 (11,2– 13,4)
	Плацебо	67,5 ± 9,92	5,91 ± 1,24	4,05 ± 0,94	3,1 ± 0,87	0,086 (0,071– 0,098)	0,057 (0,049 – 0,075)	0,048 (0,034– 0,053)	9,48 (8,19– 12,2)
6-ГОДА	Ладастен 10 мг/кг + фабомотизол 5 мг/кг	65,2 ± 19,9	5,26 ± 1,15	3,80 ± 1,35	3,19 ± 0,98	0,071 (0,058– 0,13)	0,059 (0,034 – –0,1)	0,045 (0,041– 0,065)	9,19 (7,97– 1,94)
	Ладастен 50 мг/кг + фабомотизол 5 мг/кг	86,6 ± 31,8	5,48 ± 1,87	4,16 ± 1,44	3,41 ± 1,33	0,06 (0,046– 0,081)	0,047 (0,036 – 0,059)	0,037 (0,035– 0,048)	9,76 (7,74– 11,7)
	Ладастен 100 мг/кг + фабомотизол 5 мг/кг	84,2 ± 41,1	7,76 ± 3,26	3,77 ± 1,01	4,4 ± 1,89	0,092 (0,091– 0,12)	0,046 (0,034 – 0,064)	0,047 (0,04– 0,072)	12,1 (8,7– 14,7)
	Леводопа 50 мг/кг	85 ± 39,1	8,5 ± 2,26 *	4,22 ± 0,69	4,31 ± 1,0	0,094 (0,063– 0,21)	0,047 (0,039 – 0,084)	0,056 (0,04– 0,087)	12,6 (12,0– 14,2)

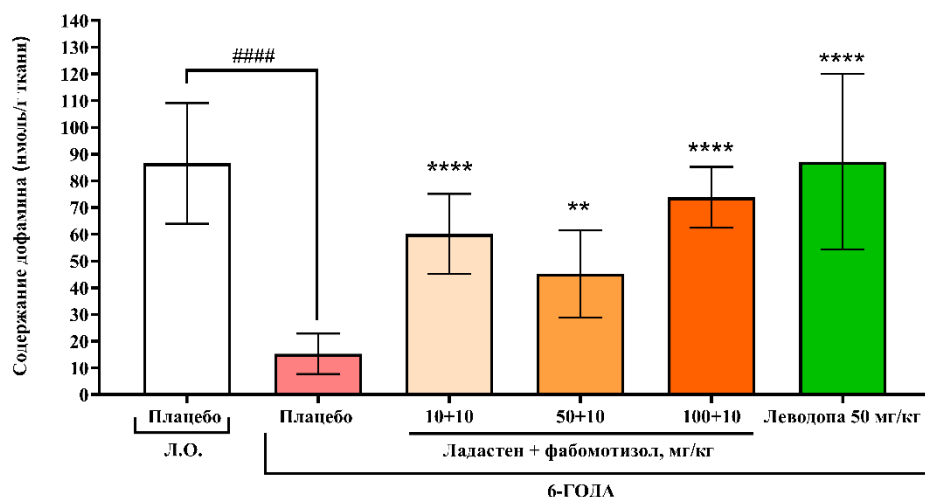
Примечание – Л.О. – ложно-оперированные животные, 6-ГОДА – животные с унилатеральным интратриатным введением 6-ГОДА, ДА – дофамин, ДОФУК – 3,4-дигидроксифенилуксусная кислота, ГВК – гомованилиновая кислота, 3-МТ – 3-метокситирамин. Данные уровня ДА и его метаболитов представлены в виде среднего ± стандартное отклонение: * – $p < 0,05$ – статистически значимые различия по сравнению с животными с интратриатным введением 6-ГОДА и получавшими плацебо (контроль) (однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) с множественным сравнением по Даннету); данные индексов утилизации представлены в виде медианы и квартилей (median (q25–75)).

Далее проводился нейрхимический анализ действия комбинаций ладастена в дозах 10, 50, 100 мг/кг с фабомотизолом в дозе 10 мг/кг. Аналогично ранее описанным изменениям на используемой модели 6-ГОДА-индуцированного ПС у мышей, у группы контроля снова было зафиксировано

достоверное снижение содержания ДА и его метаболитов по сравнению с Л.О. животными в поврежденном ПТ (Рисунок 28), а также увеличение метаболических отношений (Таблица 11).

Введение комбинаций ладастена (10, 50, 100 мг/кг) с фабомотизолом (10 мг/кг) приводило к положительному дофаминпозитивному воздействию в поврежденном ПТ, поскольку было установлено достоверное увеличение уровня ДА во всем дозовом диапазоне комбинаций. Комбинация ладастена в дозе 10 мг/кг с фабомотизолом в дозе 10 мг/кг увеличивала уровень ДА в 3,9 раза ($p < 0,0001$) по сравнению с контролем, в то время как наиболее выраженное повышение ДА наблюдалось в группе ладастен 100 мг/кг + фабомотизол 10 мг/кг и превышало в 4,8 раза ($p < 0,0001$) уровень данного моноамина в группе контроля (Рисунок 28). Интересно отметить, что увеличение содержания ДА при введении комбинации ладастена в дозе 50 мг/кг с фабомотизолом в дозе 10 мг/кг было менее выражено и было выше в 2,96 раза ($p < 0,01$) (Рисунок 27) по сравнению с контролем, однако у животных этой опытной группы зафиксировано наибольшее повышение содержания метаболитов ДА – ДОФУК в 4,7 раза ($p < 0,0001$) и 3-МТ в 4,17 раза ($p < 0,0001$) по сравнению с контролем, что, вероятно, свидетельствует об усилении метаболизма ДА (Рисунок 29).

В то же время на фоне введения леводопы уровень ДА возрастал в 5,72 раза ($p < 0,0001$) по сравнению с контролем (Рисунок 28).



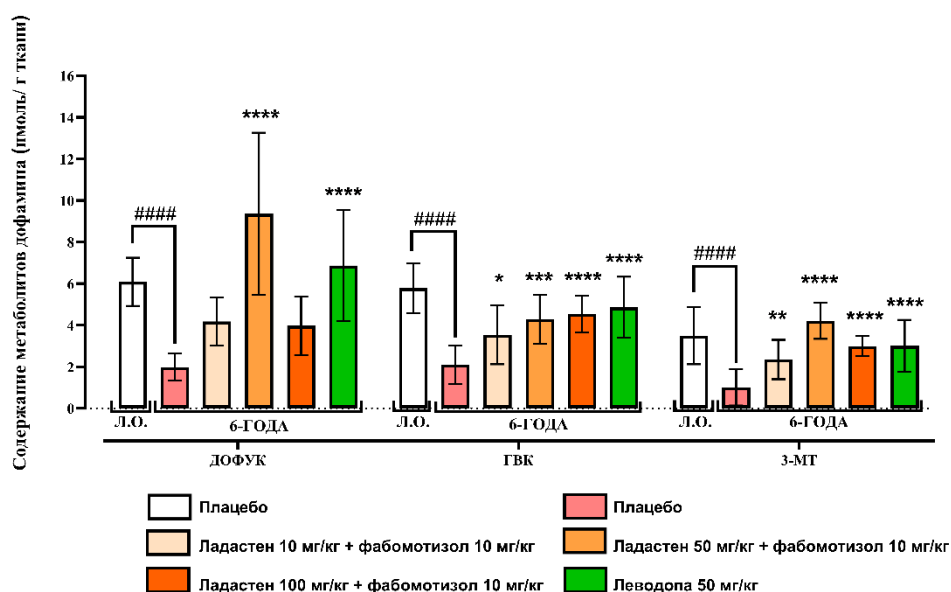
Примечание – Л.О. – ложно-оперированные животные с интрастриатным унилатеральным введением контрольного раствора, 6-ГОДА – животные с интрастриатным унилатеральным введением 6-ГОДА. Данные представлены в виде среднего \pm стандартное отклонение: ##### – $p < 0,0001$ – статистически значимые различия по сравнению с ложно-оперированными животными (однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) с множественным сравнением по Даннету); **** – $p < 0,0001$, ** – $p < 0,01$ – статистически значимые различия по сравнению с животными, претерпевшими интрастриатное введение 6-ГОДА и получавшими плацебо (однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) с множественным сравнением по Даннету).

Рисунок 28 – Влияние комбинаций ладастена (10, 50, 100 мг/кг) с фабомотизолом (10 мг/кг) на уровень дофамина в поврежденном 6-ГОДА полосатом теле мышей после стереотаксической операции

Касательно метаболитов ДА, содержание ГВК также повышалось на фоне введения ладастена в дозе 50 мг/кг с фабомотизолом в дозе 10 мг/кг и ладастена в дозе 100 мг/кг с фабомотизолом в дозе 10 мг/кг. Так, установлено превышение ГВК в 2,04 раза ($p < 0,001$) и в 2,16 раза ($p < 0,0001$) соответственно по сравнению с контролем (Рисунок 29). Комбинация ладастена в дозе 10 мг/кг с фабомотизолом в дозе 10 мг/кг приводила к увеличению содержания ГВК в 1,7 раза, однако подобное влияние не было достоверным по сравнению с контролем. При введении комбинаций ладастена в дозах 10 и 100 мг/кг с фабомотизолом в дозе 10 мг/кг возрастало содержание ДОФУК в 2,1 и 2 раза соответственно (Рисунок 29) по сравнению с группой контроля. Однако данное влияние комбинаций не было статистически значимым вследствие разброса данных, полученных в группе ладастен 50 мг/кг + фабомотизол 10 мг/кг. В то же время содержание 3-МТ повышалось

при введении комбинаций ладастена в дозах 10 мг/кг и 100 мг/кг с фабомотизолом в дозе 10 мг/кг в 2,33 ($p < 0,01$) и 2,97 ($p < 0,0001$) раза соответственно по сравнению с контролем (Рисунок 29).

На фоне введения леводопы также зафиксировано достоверное повышение содержания метаболитов ДА: ДОФУК – в 3,45 раза ($p < 0,0001$), ГВК – в 2,31 раза ($p < 0,0001$), 3-МТ – в 2,98 раза ($p < 0,0001$) по сравнению с контролем (Рисунок 29).



Примечание – Л.О. – ложно-оперированные животные с интратриатным унилатеральным введением контрольного раствора, 6-ГОДА – животные с интратриатным унилатеральным введением 6-ГОДА. Данные представлены в виде среднего \pm стандартное отклонение: ##### – $p < 0,0001$ – статистически значимые различия по сравнению с ложно-оперированными животными (однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) с множественным сравнением по Даннету); **** – $p < 0,0001$, *** – $p < 0,001$, ** – $p < 0,01$, * – $p < 0,05$ – статистически значимые различия по сравнению с животными, претерпевшими интратриатное введение 6-ГОДА и получавшими плацебо (однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) с множественным сравнением по Даннету).

Рисунок 29 – Влияние комбинаций ладастена (10, 50, 100 мг/кг) с фабомотизолом (10 мг/кг) на уровень метаболитов дофамина в поврежденном 6-ГОДА полосатом теле мышей после стереотаксической операции

Описанные выше изменения в содержании ДА и его метаболитов в поврежденном ПТ прослеживаются в виде достоверного снижения метаболических отношений при введении комбинации ладастена (10, 50 и 100 мг/кг) с фабомотизолом (10 мг/кг) по сравнению с контролем (Таблица 11).

Сходным образом при введении леводопы также зафиксировано достоверное снижение всех рассматриваемых метаболических отношений (Таблица 11).

Таблица 11 – Влияние комбинаций ладастена (10, 50, 100 мг/кг) с фабомотизолом (10 мг/кг) на метаболизм дофамина в поврежденном 6-ГОДА полосатом теле мышей после стереотаксической операции

Группа		Индексы утилизации ДА			
		ДОФУК/ДА	ГВК/ДА	3-МТ/ДА	ДОФУК+ ГВК+3- МТ/ДА
		Поврежденное полосатое тело			
Л.О.	Плацебо	0,072 (0,055–0,1)	0,074 (0,045–0,089)	0,039 (0,032–0,046)	11,7 (10,2– 13,3)
	Плацебо	0,14 # (0,1–0,19)	0,13 # (0,079–0,23)	0,049 (0,032–0,087)	4,34 ##### (3,3–5,07)
6-ГОДА	Ладастен 10 мг/кг + фабомотизол 10 мг/кг	0,072 ** (0,059– 0,081)	0,06 *** (0,052–0,075)	0,038 (0,03–0,047)	7,48 (6,89– 8,49)
	Ладастен 50 мг/кг + фабомотизол 10 мг/кг	0,22 (0,18–0,24)	0,09 (0,083–0,11)	0,091 * (0,079–0,11)	14,6 **** (10,3– 16,6)
	Ладастен 100 мг/кг + фабомотизол 10 мг/кг	0,062 **** (0,037– 0,071)	0,062 *** (0,055–0,068)	0,041 (0,035–0,046)	8,45 * (7,32– 9,93)
	Леводопа 50 мг/кг	0,083 (0,056–0,11)	0,065 ** (0,034–0,10)	0,032 (0,021–0,059)	10,8 **** (9,17– 14,1)

Примечание – Л.О. – ложно-оперированные животные, 6-ГОДА – животные с унилатеральным интратриатным введением 6-ГОДА, ДА – дофамин, ДОФУК – 3,4-дигидроксифенилуксусная кислота, ГВК – гомованилиновая кислота, 3-МТ – 3-метокситирамин. Данные представлены в виде медианы и квартилей (median (q25–75)): ##### – $p < 0,0001$, # – $p < 0,05$ – статистически значимые различия по сравнению с ложно-оперированными животными (критерий Краскела–Уоллиса с множественным сравнением по Данну); **** – $p < 0,0001$, *** – $p < 0,001$, ** – $p < 0,01$, * – $p < 0,05$ – статистически значимые различия по сравнению с животными, претерпевшими интратриатное введение 6-ГОДА и получавшими плацебо (критерий Краскела–Уоллиса с множественным сравнением по Данну).

Нейрохимический анализ интактного ПТ мышей не выявил статистически значимых различий между контролем и Л.О. животными, а также между контрольной и опытными группами, получавшими комбинации ладастена в дозах 10 и 100 мг/кг с фабомотизолом в дозе 10 мг/кг или леводопу (Таблица 11). Кроме того, не было зафиксировано достоверных различий в

индексах утилизации ДА для перечисленных экспериментальных групп (Таблица 11). Однако, в группе ладастен 50 мг/кг + фабомотизол 10 мг/кг зафиксировано повышение уровня ДОФУК в 1,36 раза ($p < 0,01$) и 3-МТ в 1,28 раза ($p < 0,05$) (Таблица 12).

Таблица 12 – Влияние комбинаций ладастена (10, 50, 100 мг/кг) с фабомотизолом (10 мг/кг) на содержание дофамина и его метаболитов, а также индексы утилизации дофамина в интактном полосатом теле мышей после стереотаксической операции

Группа		Содержание дофамина и его метаболитов (нмоль/г ткани) и индексы утилизации ДА							
		ДА	ДОФУК	ГВК	3-МТ	ДОФУК/ ДА	ГВК/ ДА	3- МТ/ДА	ДОФУК+ ГВК/ДА
		Интактное полосатое тело							
Л.О.	Плацебо	78,1 ± 13,2	7,59 ± 1,49	5,74 ± 1,06	3,55 ± 0,82	0,11 (0,082– 0,11)	0,074 (0,06– 0,09)	0,045 (0,037– 0,055)	13,3 (11,5–15)
	Плацебо	68,6 ± 10,3	6,38 ± 0,8	5,32 ± 0,78	3,02 ± 0,89	0,094 (0,084– 0,10)	0,076 (0,075 – 0,082)	0,041 (0,036– 0,049)	11,9 (10,7–2,5)
6-ГОДА	Ладастен 10 мг/кг + фабомотизол 5 мг/кг	70,0 ± 12,4	5,98 ± 0,73	5,37 ± 1,05	2,76 ± 0,69	0,085 (0,076– 0,098)	0,081 (0,062 – 0,096)	0,039 (0,03– 0,048)	11,6 (10–12,3)
	Ладастен 50 мг/кг + фабомотизол 5 мг/кг	64,4 ± 9,59	8,66 ± 2,55 **	4,75 ± 0,83	3,88 ± 0,76 *	0,14 (0,11– 0,18)	0,077 (0,062 – 0,082)	0,059 (0,051– 0,071)	14,1 (11,7– 15,4)
	Ладастен 100 мг/кг + фабомотизол 5 мг/кг	77,6 ± 6,57	6,09 ± 0,96	5,64 ± 0,9	3,2 ± 0,54	0,08 (0,071– 0,089)	0,073 (0,062 – 0,083)	0,04 (0,037– 0,047)	11,7 (10,7– 12,4)

Продолжение Таблицы 12

6-ГОДА	Леводопа 50 мг/кг	74,6 ± 26,9	6,72 ± 2,53	5,96 ± 1,33	2,9 ± 1,01	0,091 (0,082– 0,12)	0,078 (0,072– 0,09)	0,035 (0,027 – 0,055)	12,7 (9,9–16)
--------	----------------------	----------------	----------------	-------------------	---------------	---------------------------	---------------------------	--------------------------------	------------------

Примечание – Л.О. – ложно-оперированные животные, 6-ГОДА – животные с унилатеральным интрастриатным введением 6-ГОДА, ДА – дофамин, ДОФУК – 3,4-дигидроксифенилукусная кислота, ГВК – гомованилиновая кислота, 3-МТ – 3-метокситирамин. Данные уровня ДА и его метаболитов представлены в виде среднего ± стандартное отклонение (однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) с множественным сравнением по Даннету): ** – $p < 0,01$, * – $p < 0,05$ – статистически значимые различия по сравнению с животными с интрастриатным введением 6-ГОДА и получавшими плацебо, (однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) с множественным сравнением по Даннету); данные индексов утилизации представлены в виде медианы и квартилей (median (q25–75)) (критерий Краскела–Уоллиса с множественным сравнением по Данну).

Синергичное действие ладастена с фабомотизолом в комбинации проявлялось во влиянии на уровень ДА и практически всех его метаболитов в поврежденном ПТ, кроме ГВК (Таблица 13). Причем синергизм был выражен в основном в виде аддитивного действия, поскольку укладывается в формулу [18]: эффект комбинации ладастена с фабомотизолом > эффекта ладастена, эффекта фабомотизола, но эффект комбинации ладастена с фабомотизолом < эффекта ладастена + эффект фабомотизола. Однако, синергичное действие комбинации ладастена в дозе 50 мг/кг с фабомотизолом в дозе 10 мг/кг на уровень ДОФУК в поврежденном ПТ было выражено в виде потенцирования, поскольку наблюдаемый эффект превосходил ожидаемый (Таблица 13). Аддитивное влияние на уровень 3-МТ было выражено только у комбинаций ладастена 50 и 100 мг/кг с фабомотизолом 10 мг/кг.

Таблица 13 – Оценка синергичного влияния комбинаций ладастена с фабомотизолом на дофаминергическую систему на модели 6-ГОДА-индуцированного паркинсонического синдрома у мышей

Группа	Эффект ожидаемый (в разях относительно группы 6-ГОДА + плацебо)	Эффект наблюдаемый (в разях относительно группы 6-ГОДА + плацебо)	Вид синергизма
Уровень дофамина			
Ладастен 10 мг/кг	Присутствует	Присутствует, 1,83	–
Ладастен 50 мг/кг	Присутствует	Присутствует, 2,92	–
Ладастен 100 мг/кг	Присутствует	Присутствует, 3,37	–
Фабомотизол 5 мг/кг	Присутствует	Присутствует, 2,32	–
Фабомотизол 10 мг/кг	Присутствует	Присутствует, 2,85	–
Ладастен 10 мг/кг + фабомотизол 5 мг/кг	Присутствует, 4,15	Присутствует, 2,59	Аддитивное действие
Ладастен 10 мг/кг + фабомотизол 10 мг/кг	Присутствует, 4,68	Присутствует, 3,94	Аддитивное действие
Ладастен 50 мг/кг + фабомотизол 5 мг/кг	Присутствует, 5,23	Присутствует, 3,37	Аддитивное действие
Ладастен 50 мг/кг + фабомотизол 10 мг/кг	Присутствует, 5,77	Присутствует, 2,96	Аддитивное действие
Ладастен 100 мг/кг + фабомотизол 5 мг/кг	Присутствует, 5,69	Присутствует, 4,31	Аддитивное действие
Ладастен 100 мг/кг + фабомотизол 10 мг/кг	Присутствует, 6,22	Присутствует, 4,84	Аддитивное действие
Уровень 3,4-диоксифенилуксусной кислоты			
Ладастен 10 мг/кг	Присутствует	Присутствует, 1,64	–
Ладастен 50 мг/кг	Присутствует	Присутствует, 1,81	–
Ладастен 100 мг/кг	Присутствует	Присутствует, 2,28	–
Фабомотизол 5 мг/кг	Присутствует	Присутствует, 2,10	–
Фабомотизол 10 мг/кг	Присутствует	Присутствует, 1,99	–
Ладастен 10 мг/кг + фабомотизол 5 мг/кг	Присутствует, 3,74	Присутствует, 1,61	Не выражен
Ладастен 10 мг/кг + фабомотизол 10 мг/кг	Присутствует, 3,62	Присутствует, 2,10	Аддитивное действие
Ладастен 50 мг/кг + фабомотизол 5 мг/кг	Присутствует, 3,91	Присутствует, 2,30	Аддитивное действие
Ладастен 50 мг/кг + фабомотизол 10 мг/кг	Присутствует, 3,80	Присутствует, 4,70	Потенцирование
Ладастен 100 мг/кг + фабомотизол 5 мг/кг	Присутствует, 4,38	Присутствует, 3,57	Аддитивное действие

Продолжение Таблицы 13

Ладастен 100 мг/кг + фабомотизол 10 мг/кг	Присутствует, 4,27	Присутствует, 2,00	Не выражен
Уровень гомованилиновой кислоты			
Ладастен 10 мг/кг	Присутствует	Присутствует, 1,69	–
Ладастен 50 мг/кг	Присутствует	Присутствует, 2,35	–
Ладастен 100 мг/кг	Присутствует	Присутствует, 2,28	–
Фабомотизол 5 мг/кг	Присутствует	Присутствует, 1,30	–
Фабомотизол 10 мг/кг	Присутствует	Присутствует, 1,28	–
Ладастен 10 мг/кг + фабомотизол 5 мг/кг	Присутствует, 2,98	Присутствует, 1,18	Не выражен
Ладастен 10 мг/кг + фабомотизол 10 мг/кг	Присутствует, 2,96	Присутствует, 1,69	Не выражен
Ладастен 50 мг/кг + фабомотизол 5 мг/кг	Присутствует, 3,65	Присутствует, 1,81	Не выражен
Ладастен 50 мг/кг + фабомотизол 10 мг/кг	Присутствует, 3,63	Присутствует, 2,01	Не выражен
Ладастен 100 мг/кг + фабомотизол 5 мг/кг	Присутствует, 3,58	Присутствует, 2,04	Не выражен
Ладастен 100 мг/кг + фабомотизол 10 мг/кг	Присутствует, 3,56	Присутствует, 2,16	Не выражен
Уровень 3-метокситирамина			
Ладастен 10 мг/кг	Присутствует	Присутствует, 1,57	–
Ладастен 50 мг/кг	Присутствует	Присутствует, 2,41	–
Ладастен 100 мг/кг	Присутствует	Присутствует, 2,82	–
Фабомотизол 5 мг/кг	Присутствует	Присутствует, 2,21	–
Фабомотизол 10 мг/кг	Присутствует	Присутствует, 1,95	–
Ладастен 10 мг/кг + фабомотизол 5 мг/кг	Присутствует, 3,78	Присутствует, 1,33	Не выражен
Ладастен 10 мг/кг + фабомотизол 10 мг/кг	Присутствует, 3,52	Присутствует, 2,33	Аддитивное действие
Ладастен 50 мг/кг + фабомотизол 5 мг/кг	Присутствует, 4,63	Присутствует, 1,88	Не выражен
Ладастен 50 мг/кг + фабомотизол 10 мг/кг	Присутствует, 4,37	Присутствует, 4,17	Аддитивное действие
Ладастен 100 мг/кг + фабомотизол 5 мг/кг	Присутствует, 5,03	Присутствует, 2,71	Не выражен
Ладастен 100 мг/кг + фабомотизол 10 мг/кг	Присутствует, 4,77	Присутствует, 2,97	Аддитивное действие

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о наличии синергичного дофаминпозитивного действия, в основном проявляющегося в виде аддитивного влияния, у комбинаций субстанций ладастена с фабомотизолом на унилатеральной 6-ГОДА модели ПС. В первую очередь, это выражается в способности фабомотизола в большей дозе 10 мг/кг усиливать действие ладастена, даже при совместном введении с его наименьшей дозой в 10 мг/кг. При этом эффективность комбинаций ладастена с фабомотизолом сопоставима с таковой у леводопы.

По полученным результатам исследования наличия антипаркинсонического действия у комбинаций субстанций ладастена с фабомотизолом при пероральном хроническом введении на модели 6-ГОДА-индуцированного ПС у мышей опубликованы статьи с соавторами:

1. **Мариевский, В. Е.** Исследование антипаркинсонического действия комбинации ладастена с фабомотизолом на модели паркинсонического синдрома, вызванного 6-гидроксидофамином / **В. Е. Мариевский**, Л. Ф. Зайнуллина // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2024. – Т. 87, № 9. – С. 9-14.

2. **Mariveskii, V. E.** Neurochemical analysis of the effect of the combination of ladasten with fabomotizole on the dopaminergic system of the mouse brain in 6-hydroxydopamine model of parkinsonian syndrome / **V. E. Mariveskii**, I. A. Lubanskii, L. F. Zainullina, V. L. Dorofeev // Neurochemical Journal. – 2025. – Vol. 19. – No. 4. – P. 891–901.

По полученным результатам исследования наличия антипаркинсонического действия у комбинаций субстанций ладастена с фабомотизолом при пероральном хроническом введении на модели 6-ГОДА-индуцированного ПС у мышей опубликован тезис с соавторами:

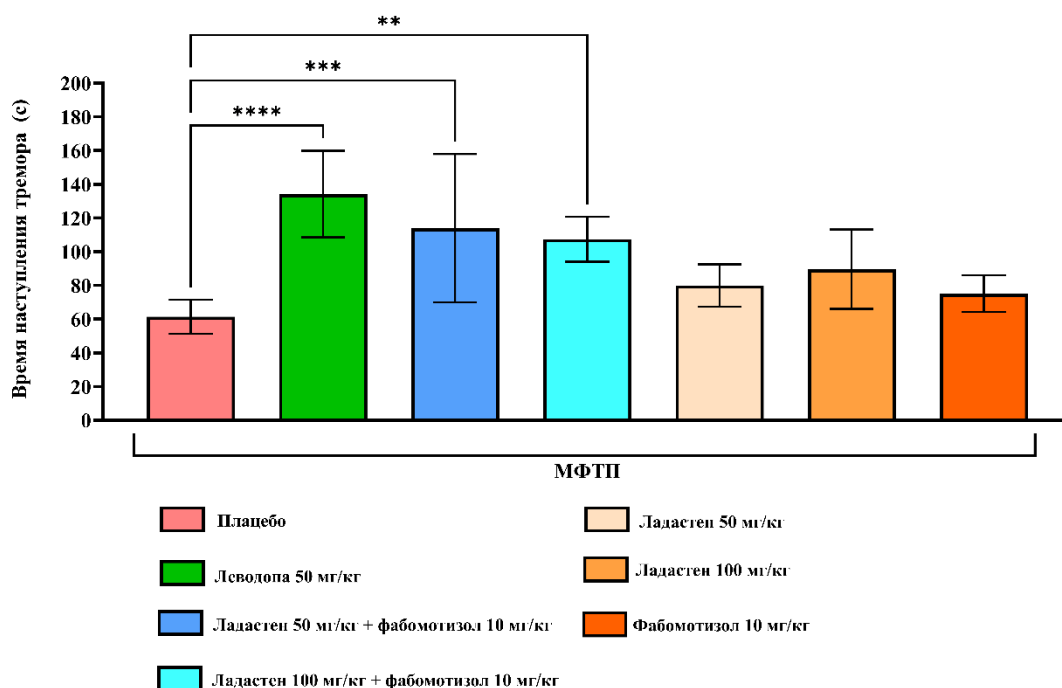
Мариевский, В. Е. Комбинация ладастена с фабомотизолом снижает выраженность двигательных нарушений на модели паркинсонического синдрома, вызванного 6-гидроксидофамином / **В. Е. Мариевский**, Л. Ф.

Зайнуллина // Сборник тезисов 28-й Пущинской школы-конференции молодых ученых с международным участием «Биология – наука XXI века» – Пущино: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки "Федеральный исследовательский центр "Пущинский научный центр биологических исследований Российской академии наук", 2025. – С. 600-601.

3.4 Исследование наличия антипаркинсонического действия у комбинаций субстанций ладастена с фабомотизолом при пероральном остром введении на модели МФТП-индуцированного паркинсонического синдрома у мышей

Согласно [23], исследование антипаркинсонических ЛС следует проводить на нескольких различных моделях ПС. Важно установить наличие антипаркинсонической активности при остром введении комбинации ладастена с фабомотизолом на подходящей модели ПС, например, при помощи широко используемого в экспериментах нейротоксина МФТП. Поэтому, учитывая вышеописанные результаты поведенческих испытаний и нейрохимического анализа на модели 6-ГОДА-индуцированного ПС, исследование антипаркинсонического действия комбинации проводилось при совместном введении в больших дозах ладастена 50 и 100 мг/кг с фабомотизолом 10 мг/кг.

Острое введение мышам МФТП в дозе 30 мг/кг приводило к незамедлительному развитию ПС. Так, у группы МФТП + плацебо (здесь и далее – группа контроля) наблюдалось возникновение тремора в среднем в течение 60 секунд после введения МФТП (Рисунок 30). Наиболее эффективное устранение тремора зафиксировано при введении комбинации ладастена в дозе 50 мг/кг с фабомотизолом в дозе 10 мг/кг, поскольку наблюдалось задерживание время наступления тремора в 1,9 раза ($p < 0,001$) по сравнению с контролем. При этом введение комбинации ладастена в дозе 100 мг/кг с фабомотизолом в дозе 10 мг/кг увеличивало время наступления тремора в 1,7 раза ($p < 0,01$) по сравнению с контролем (Рисунок 30). На фоне монотерапии ладастеном или фабомотизолом также увеличивалось время наступления тремора, однако данные влияния не были достоверными по сравнению с контролем. В то же время введение леводопы мышам приводило к увеличению времени наступления тремора в 2,2 раза ($p < 0,0001$) по сравнению с контролем (Рисунок 30).

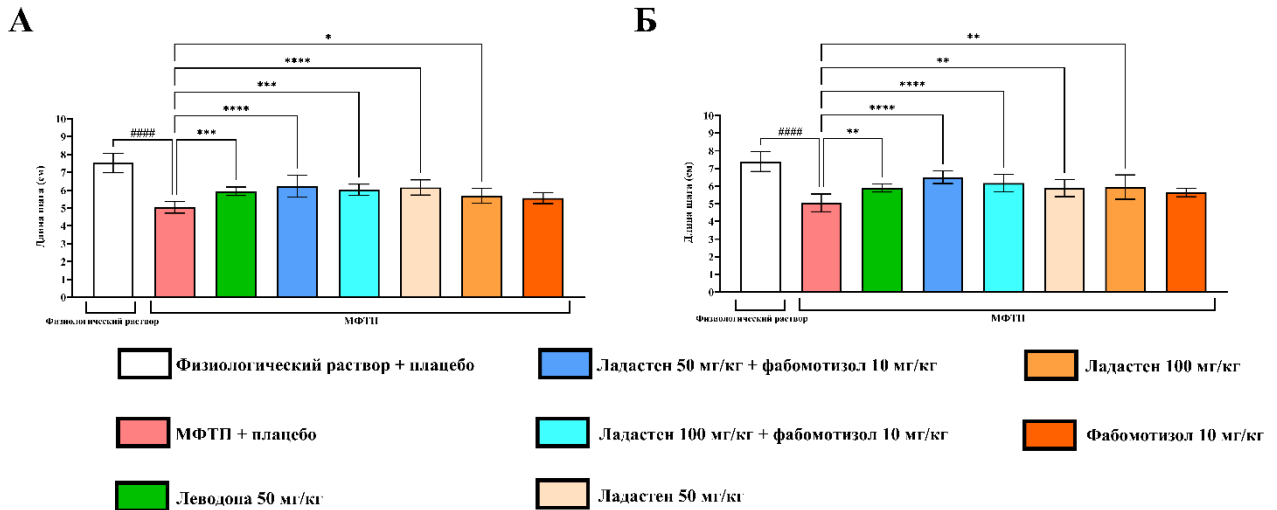


Примечание – Данные представлены в виде среднего \pm стандартное отклонение: **** – $p < 0,0001$, *** – $p < 0,001$, ** – $p < 0,01$ – статистически значимые различия по сравнению с контролем (МФТП + плацебо) (однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) с множественным сравнением по Даннету).

Рисунок 30 – Влияние комбинаций ладастена с фабомотизолом на время развития тремора у мышей с МФТП-индуцированным паркинсоническим синдромом

Сразу после регистрации тремора в тесте «длина шага» фиксировалось развитие экстрапирамидной ригидности, которая проявилась в виде снижения длины шага передних и задних лап у группы контроля на 2,5 см (49,1%; $p < 0,0001$) (Рисунок 31 А) и 2,3 см (46,5%; $p < 0,0001$) соответственно (Рисунок 31 Б) по сравнению с группой физиологический раствор + плацебо. При этом наиболее выраженное улучшение походки наблюдалось у мышей на фоне введения комбинации ладастена в дозе 50 мг/кг с фабомотизолом в дозе 10 мг/кг, поскольку длина шага передних лап увеличивалась на 1,2 см (23,3%; $p < 0,0001$) (Рисунок 31 А), а задних – на 1,4 см (28,7%; $p < 0,0001$) (Рисунок 31 Б) по сравнению с контролем. Введение мышам комбинации ладастена в дозе 100 мг/кг с фабомотизолом в дозе 10 мг/кг способствовало увеличению длины шага передних и задних лап на 1,2 см (19,7%; $p < 0,001$) (Рисунок 31 А) и 1,2

см (22,8%; $p < 0,0001$) соответственно по сравнению с контролем (Рисунок 31 Б). Монотерапия ладастеном в дозах 50 и 100 мг/кг приводила к увеличению длины шага передних лап на 1,2 см (22,5%; $p < 0,0001$) и 0,67 см (13,3%; $p < 0,05$) (Рисунок 31 А), а длину шага задних лап на 0,85 см (16,8%; $p < 0,01$) и 0,89 см (17,6%; $p < 0,01$) соответственно по сравнению с контролем (Рисунок 31 Б). Однако, монотерапия фабототизолом не показала достоверного влияния на длину шага передних и задних лап по сравнению с контролем. Леводопа достоверно увеличивала длину шага передних и задних лап на 0,87 см (17,3%; $p < 0,001$) (Рисунок 31 А) и 0,84 см (16,6%; $p < 0,01$) соответственно (Рисунок 31 Б) по сравнению с контролем.

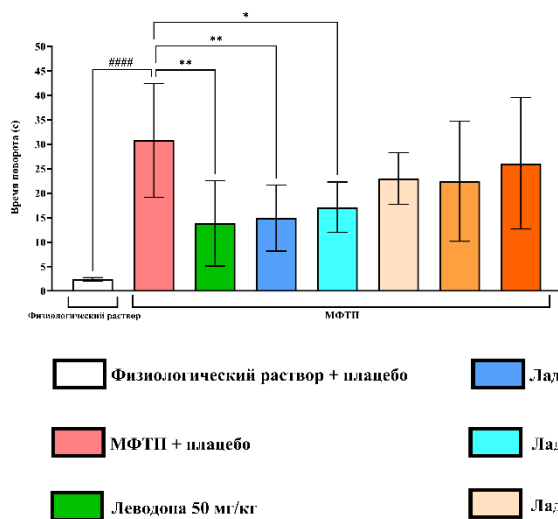
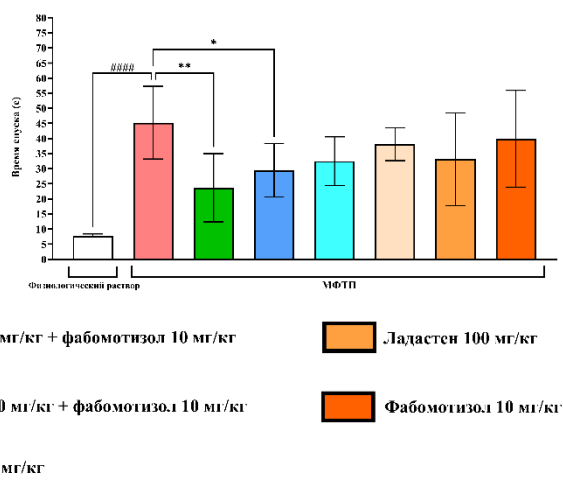


Примечание – Данные представлены в виде среднего \pm стандартное отклонение: ##### – $p < 0,0001$ – статистически значимые различия по сравнению с группой физиологический раствор + плацебо (однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) с множественным сравнением по Даннету); **** – $p < 0,0001$, *** – $p < 0,001$, ** – $p < 0,01$, * – $p < 0,05$ – статистически значимые различия по сравнению с контролем (МФТП + плацебо) (однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) с множественным сравнением по Даннету).

Рисунок 31 – Влияние комбинаций ладастена с фабототизолом на выраженность экстрапирамидной ригидности передних (А) и задних лап (Б) мышцей с МФТП-индуцированным паркинсоническим синдромом в тесте «длина шага»

Брадиканезия была зафиксирована у мышей группы контроля в тесте «вертикальный стержень» и проявлялась в виде достоверного увеличения времени поворота в 12,9 раза ($p < 0,0001$) (Рисунок 32 А) и спуска в 5,8 раза ($p < 0,0001$) (Рисунок 32 Б) по сравнению с группой физиологический раствор + плацебо.

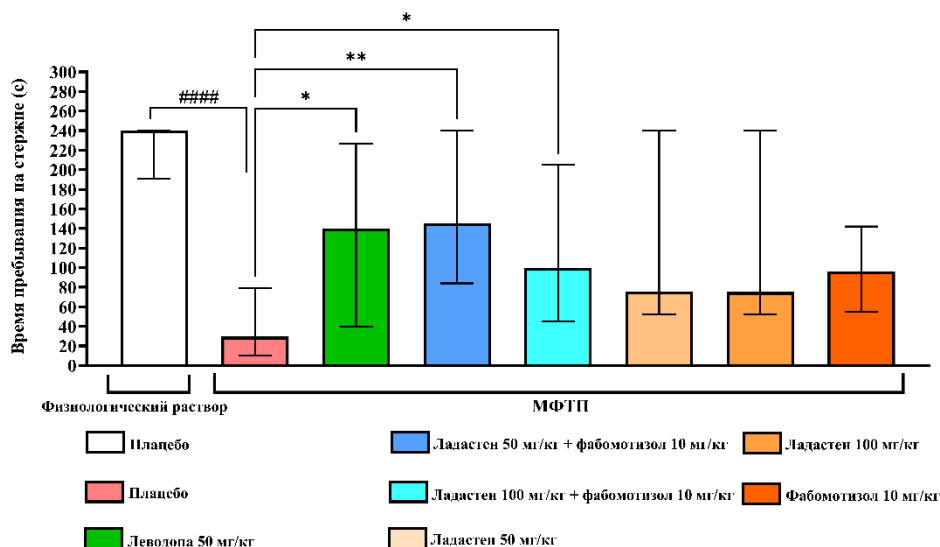
Наиболее выражено брадиканезия снижалась при введении комбинации ладастена в дозе 50 мг/кг с фабомотизолом в дозе 10 мг/кг, так как время поворота сокращалось в 2,1 раза ($p < 0,01$) (Рисунок 32 А), а время спуска – в 1,5 раза ($p < 0,05$) (Рисунок 32 Б) по сравнению с контролем. При этом комбинация ладастена в дозе 100 мг/кг с фабомотизолом в дозе 10 мг/кг влияла только на время поворота, сокращая его в 1,8 раза ($p < 0,05$) по сравнению с контролем (Рисунок 32 А). Время спуска на фоне данной комбинации уменьшалось в 1,4 раза по сравнению с контролем (Рисунок 32 Б), однако данное изменение не было достоверно. Кроме того, время спуска у мышей, получавших монотерапию ладастеном или фабомотизолом, сокращалось по сравнению с контролем, однако подобное влияние не было статистически достоверным (Рисунок 32 А, Б). Препарат сравнения леводопа сокращала время поворота и спуска у мышей в 2,2 раза ($p < 0,01$) (Рисунок 32 А) и в 1,8 раза ($p < 0,01$) соответственно (Рисунок 32 Б) по сравнению с контролем.

А**Б**

Примечание – Данные представлены в виде среднего \pm стандартное отклонение: ##### – $p < 0,0001$ – статистически значимые различия по сравнению с группой физиологический раствор + плацебо (однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) с множественным сравнением по Даннету); ** – $p < 0,01$, * – $p < 0,05$ – статистически значимые различия по сравнению с контролем (МФТП + плацебо) (однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) с множественным сравнением по Даннету).

Рисунок 32 – Влияние комбинаций ладастена с фабомотизолом на выраженность брадикинезии у мышей с МФТП-индуцированным паркинсоническим синдромом в тесте «вертикальный стержень»: время поворота (А), время спуска со стержня (Б)

Помимо вышеописанных проявлений ПС, у группы контроля был зафиксирован моторный дефицит, а также нарушения в координации движений в тесте «вращающийся стержень», что выразилось снижением времени удержания мышей на стержне в 8,1 раза ($p < 0,001$) по сравнению с группой физиологический раствор + плацебо (Рисунок 33).



Примечание – Данные представлены в виде медианы (макс.–мин. значения): ##### – $p < 0,0001$ – статистически значимые различия по сравнению с группой физиологический раствор + плацебо (критерий Краскела–Уоллиса с последующим множественным сравнением по Данну); ** – $p < 0,01$, * – $p < 0,05$ – статистически значимые различия по сравнению с группой контроля (МФТП + плацебо) (критерий Краскела–Уоллиса с последующим множественным сравнением по Данну).

Рисунок 33 – Влияние комбинаций ладастена с фабомотизолом на двигательную активность мышцей с МФТП-индуцированным паркинсоническим синдромом в тесте «вращающийся стержень»

Введение комбинации ладастена в дозе 50 мг/кг с фабомотизолом в дозе 10 мг/кг увеличивало время удержания на стержне при его постоянной скорости вращения 4,9 раза ($p < 0,01$), а комбинация ладастена в дозе 100 мг/кг с фабомотизолом в дозе 10 мг/кг – в 3,4 раза ($p < 0,01$) по сравнению с контролем, тем самым восстанавливая активность животных до уровня группы физиологический раствор + плацебо (Рисунок 33). Монотерапия ладастеном или фабомотизолом увеличивала время нахождения животных на установке, однако данное влияние не было достоверным по сравнению контролем (Рисунок 33). Введение леводопы способствовало увеличению времени пребывания мышцей на стержне в 4,7 раза ($p < 0,05$) по сравнению с контролем (Рисунок 33).

Синергичное действие комбинаций ладастена в дозе 50 мг/кг с фабомотизолом в дозе 10 мг/кг и ладастена в дозе 100 мг/кг с фабомотизолом в дозе 10 мг/кг проявилось в виде аддитивного влияния на все анализируемые

параметры в проведенных тестах, за исключением показателя времени поворота в «вертикальном стержене». Установленные эффекты комбинаций ладастена с фабомотизолом укладываются в формулу [18]: эффект комбинации ладастена с фабомотизолом > эффекта ладастена, эффекта фабомотизола, но эффект комбинации ладастена с фабомотизолом < эффекта ладастена + эффект фабомотизола. При этом синергизм между комбинацией ладастена в дозе 50 мг/кг с фабомотизолом в дозе 10 мг/кг был более выражен, чем между комбинацией ладастена в дозе 100 мг/кг с фабомотизолом в дозе 10 мг/кг (Таблица 14).

Таблица 14 – Оценка синергичного влияния комбинаций ладастена с фабомотизолом в поведенческих тестах на модели МФТП-индуцированного паркинсонического синдрома у мышей

Группа	Время наступления тремора		
	Эффект ожидаемый (в разях относительно группы МФТП + плацебо)	Эффект наблюдаемый (в разях относительно группы МФТП + плацебо)	Вид синергизма
Время наступления тремора			
Ладастен 50 мг/кг	Присутствует	Присутствует, 1,30	–
Ладастен 100 мг/кг	Присутствует	Присутствует, 1,46	–
Фабомотизол 10 мг/кг	Присутствует	Присутствует, 1,22	–
Ладастен 50 мг/кг + фабомотизол 10 мг/кг	Присутствует, 2,53	Присутствует, 1,86	Аддитивное действие
Ладастен 100 мг/кг + фабомотизол 10 мг/кг	Присутствует, 2,68	Присутствует, 1,75	Аддитивное действие
Тест «длина шага», передние лапы			
Ладастен 50 мг/кг	Присутствует	Присутствует, 1,23	–
Ладастен 100 мг/кг	Присутствует	Присутствует, 1,13	–
Фабомотизол 10 мг/кг	Присутствует	Присутствует, 1,10	–
Ладастен 50 мг/кг + фабомотизол 10 мг/кг	Присутствует, 2,34	Присутствует, 1,23	Не выражен
Ладастен 100 мг/кг + фабомотизол 10 мг/кг	Присутствует, 2,23	Присутствует, 1,19	Не выражен

Продолжение Таблицы 14

Тест «длина шага», задние лапы			
Ладастен 50 мг/кг	Присутствует	Присутствует, 1,17	–
Ладастен 100 мг/кг	Присутствует	Присутствует, 1,18	–
Фабомотизол 10 мг/кг	Присутствует	Присутствует, 1,12	–
Ладастен 50 мг/кг + фабомотизол 10 мг/кг	Присутствует, 2,28	Присутствует, 1,29	Аддитивное действие
Ладастен 100 мг/кг + фабомотизол 10 мг/кг	Присутствует, 2,30	Присутствует, 1,22	Аддитивное действие
Тест «вертикальный стержень», время поворота			
Ладастен 50 мг/кг	Присутствует	Присутствует, 1,34	–
Ладастен 100 мг/кг	Присутствует	Присутствует, 1,37	–
Фабомотизол 10 мг/кг	Присутствует	Присутствует, 1,18	–
Ладастен 50 мг/кг + фабомотизол 10 мг/кг	Присутствует, 2,52	Присутствует, 2,07	Аддитивное действие
Ладастен 100 мг/кг + фабомотизол 10 мг/кг	Присутствует, 2,55	Присутствует, 1,80	Аддитивное действие
Тест «вертикальный стержень», время спуска			
Ладастен 50 мг/кг	Присутствует	Присутствует, 1,19	–
Ладастен 100 мг/кг	Присутствует	Присутствует, 1,37	–
Фабомотизол 10 мг/кг	Присутствует	Присутствует, 1,13	–
Ладастен 50 мг/кг + фабомотизол 10 мг/кг	Присутствует, 2,32	Присутствует, 1,54	Аддитивное действие
Ладастен 100 мг/кг + фабомотизол 10 мг/кг	Присутствует, 2,50	Присутствует, 1,39	Аддитивное действие
Тест «вращающийся стержень»			
Ладастен 50 мг/кг	Присутствует	Присутствует, 2,56	–
Ладастен 100 мг/кг	Присутствует	Присутствует, 2,54	–
Фабомотизол 10 мг/кг	Присутствует	Присутствует, 3,25	–
Ладастен 50 мг/кг + фабомотизол 10 мг/кг	Присутствует, 5,81	Присутствует, 4,93	Аддитивное действие
Ладастен 100 мг/кг + фабомотизол 10 мг/кг	Присутствует, 5,8	Присутствует, 3,37	Аддитивное действие

Таким образом, полученные данные указывают на способность комбинации ладастена с фабомотизолом успешно снижать выраженность различных проявлений ПС, индуцированного МФТП, причем эффективнее,

чем монотерапия ладастеном или фабомотизолом. При этом на данной модели при остром введении наибольшую эффективность в устранении двигательных нарушений продемонстрировала комбинация ладастена 50 мг/кг с фабомотизолом 10 мг/кг. Стоит отметить, что снижение выраженности ПС под действием данной комбинации было сопоставимо с влиянием леводопы.

По полученным результатам исследования наличия антипаркинсонического действия у комбинаций субстанций ладастена с фабомотизолом при пероральном остром введении на модели МФТП-индуцированного ПС у мышей опубликована статья с соавторами:

Мариевский, В. Е. Исследование антипаркинсонического действия комбинации ладастена с фабомотизолом на модели МФТП-индуцированного паркинсонического синдрома / **В. Е. Мариевский**, И. А. Любанский, Л. Ф. Зайнуллина // Химико-фармацевтический журнал. – 2025. – Т. 59, № 10. – С. 10-15.

3.5 Исследование наличия антипаркинсонического действия у комбинации субстанций ладастена с фабомотизолом при пероральном хроническом введении на модели паракват-индуцированного паркинсонического синдрома у мышей

На следующем этапе работы оценивалось антипаркинсоническое действие комбинации ладастена с фабомотизолом на паракват-индуцированной модели ПС, предполагающая развитие двигательных нарушений на фоне потери дофаминергических нейронов ЧС [48] по аналогии с ранее используемым моделями. Однако, паракват является пестицидом, в отличие от ранее используемых токсинов, а его действие не ограничивается дофаминергической системой, поскольку он способен поражать периферические органы вне ЦНС, особенно легкие и почки [81]. Тем не менее, на различных экспериментальных моделях, в том числе на мышинных, он широко используется для создания различных патологических проявлений БП [195]. Токсическое действие параквата развивается после того, как он переносится через мембраны с помощью нейтрального переносчика аминокислот [106] и окисляется никотинамидадениндинуклеотидфосфат-зависимой редуктазой, что приводит к образованию свободного радикала и дальнейшему формированию супероксид радикала и пероксида водорода. В свою очередь, образовавшийся пероксид гидролизуется с выделением АФК, которые взаимодействуют с липидной мембраной и вызывают перекисное окисление липидов, в итоге приводящее к гибели нейронов [143]. Помимо этого, имеются доказательства влияния параквата на накопление α -син, что также приводит к гибели дофаминергических нейронов в ЧС [48]. Паракват способен подавлять аутофагию, конкурентно нарушая формирование комплекса между амфотерином (HMGB1) и Beclin1, а также усиливать взаимодействие между HMGB1 и α -син [228]. Таким образом, учитывая вышеописанные эффекты параквата, он может быть использован как средство моделирования ПС.

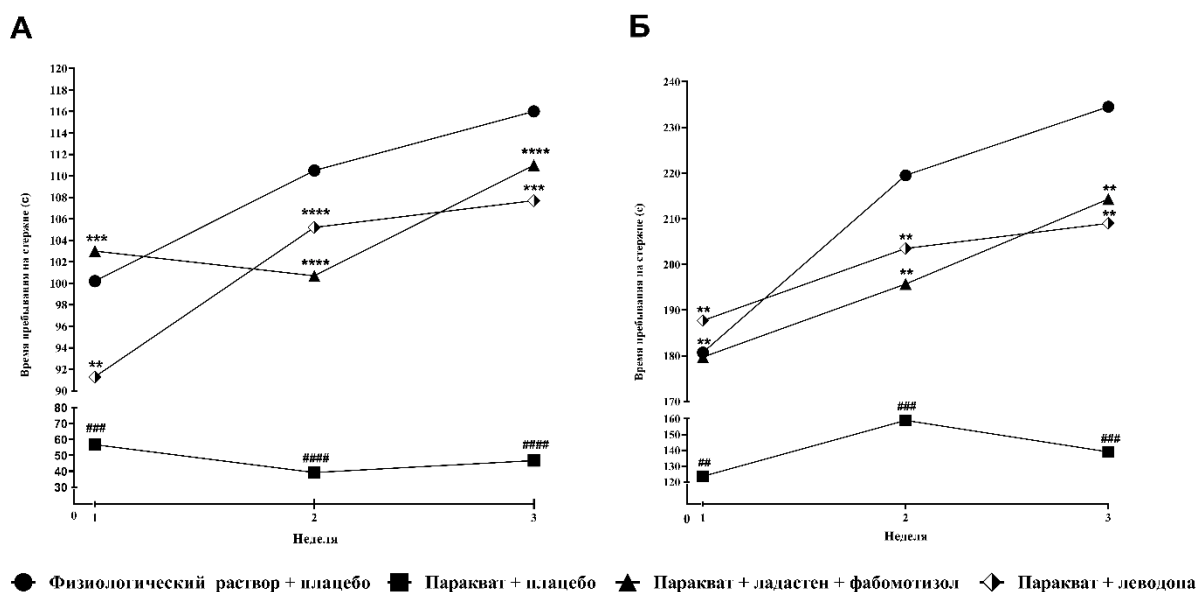
В качестве исследуемой комбинации была выбрана комбинация ладастена в дозе 50 мг/кг с фабомотизолом в дозе 10 мг/кг, показавшая, как описывалось выше, наилучшее устранение двигательных нарушений на модели МФТП-индуцированного ПС. Кроме того, данная комбинация была эффективной в устранении различных проявлений ПС на модели 6-ГОДА-индуцированного ПС.

Длительное введение параквата привело к развитию выраженного моторного дефицита и нарушенной координации движений в тесте «вращающийся стержень» у мышей группы контроля (паракват + плацебо), который наблюдался на протяжении всех 3-х недель эксперимента (Таблица 12). Уже на 1-й неделе (после двух инъекций параквата) время удержания на установке в тесте «вращающийся стержень» у мышей группы паракват + плацебо (далее группа контроля) при его постоянной скорости вращения достоверно уменьшалось в 1,8 раза ($p < 0,001$) (Рисунок 34 А), в то время как при нарастающей скорости – в 1,5 раза ($p < 0,01$) по сравнению с группой физиологический раствор + плацебо (Рисунок 34 Б). Подобное нарушение двигательной активности сохранялось на 2-й экспериментальной неделе (после четырех инъекций параквата), поскольку время удержания при постоянной скорости вращения стержня уменьшалось у контроля в 2,8 раза ($p < 0,0001$) (Рисунок 34 А) по сравнению с группой физиологический раствор + плацебо, а при нарастающей скорости – в 1,4 раза ($p < 0,001$) (Рисунок 34 Б). На 3-й неделе (после шести инъекций параквата) двигательная активность мышей группы контроля при постоянной скорости вращения стержня снизилась в 2,5 раза ($p < 0,0001$) (Рисунок 34 А), а при нарастающей скорости – в 1,7 раза ($p < 0,001$) (Рисунок 34 Б) по сравнению с группой физиологический раствор + плацебо.

Введение комбинации ладастена в дозе 50 мг/кг с фабомотизолом в дозе 10 мг/кг способствовало устранению моторного дефицита и нарушенной координации движений в тесте «вращающийся стержень» на протяжении всего эксперимента (Таблица 12). При постоянной скорости вращения на 1-й

неделе эксперимента время удержания на фоне введения комбинации было достоверно выше в 1,8 раза ($p < 0,001$) по сравнению с контролем, а на 2-й и 3-й неделе – в 2,57 раза ($p < 0,0001$) и в 2,38 раза ($p < 0,0001$) соответственно (Рисунок 34 А). Препарат сравнения леводопа нормализовывал двигательную активность животных, увеличивая время удержания на вращающемся с постоянной скоростью стержне в 1,6 раза ($p < 0,01$) на 1-й неделе, в 2,68 раза ($p < 0,0001$) на 2-й неделе и в 2,3 раза ($p < 0,001$) на 3-й неделе (Рисунок 34 А) по сравнению с контролем.

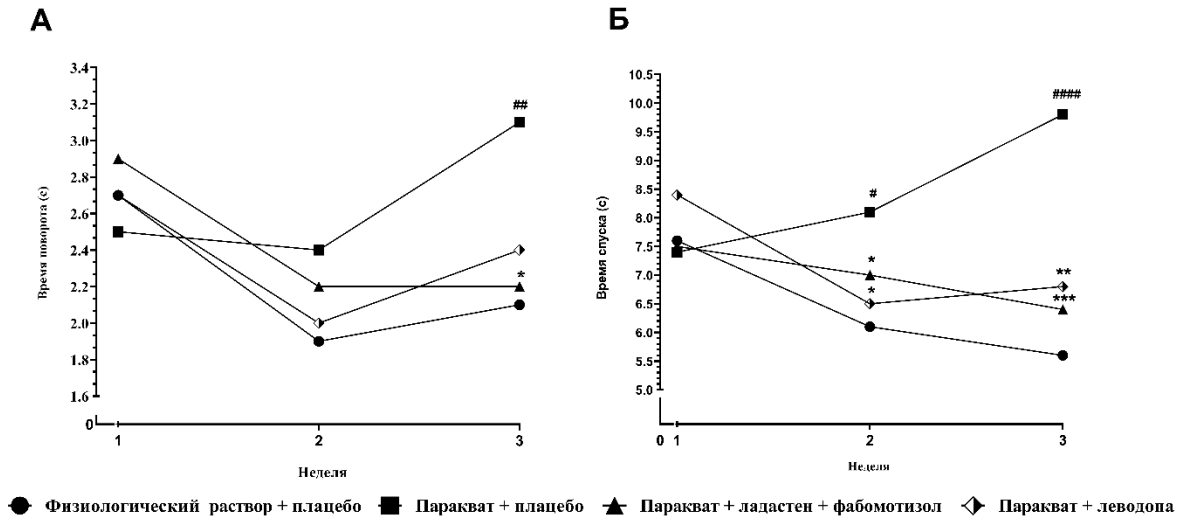
В варианте тестирования при нарастающей скорости вращения стержня также наблюдалось снижение выраженности моторного дефицита и улучшение способности сохранять координацию движений на фоне применения комбинации ладастена с фабомотизолом и леводопы (Таблица 12). Так, введение комбинации ладастена с фабомотизолом приводило к увеличению времени удерживания в 1,5 раза ($p < 0,01$) на 1-й неделе, в 1,23 раза ($p < 0,01$) на 2-й неделе и в 1,5 раза ($p < 0,01$) на 3-й неделе эксперимента по сравнению с контролем (Рисунок 34 Б). В свою очередь, введение леводопы улучшало двигательную активность на протяжении всех 3-х недель эксперимента и было сопоставимо с действием комбинации ладастена с фабомотизолом (Рисунок 34 Б, Таблица 12).



Примечание – Данные представлены в виде медианы: ##### – $p < 0,0001$, ### – $p < 0,001$, ## – $p < 0,01$ – статистически значимые различия по сравнению с группой физиологический раствор + плацебо (однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) с множественным сравнением по Даннету); **** – $p < 0,0001$, *** – $p < 0,001$, ** – $p < 0,01$ – статистически значимые различия с группой контроля (паракват + плацебо) (однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) с множественным сравнением по Даннету).

Рисунок 34 – Влияние комбинации ладастена с фабототизолом на двигательную активность мышей с паракват-индуцированным паркинсоническим синдромом в тесте «вращающийся стержень» при постоянной (А) и нарастающей (Б) скорости вращения стержня

Брадикинезия, фиксируемая в тесте «вертикальный стержень», развивалась не столь выражено, как моторный дефицит, поскольку достоверно проявилась лишь на 2-й неделе эксперимента у контрольной группы животных (Таблица 12). Брадикинезия проявилась только в увеличении времени спуска в 1,3 раза ($p < 0,05$) (Рисунок 35 Б) на 2-ой неделе эксперимента. К 3-й неделе эксперимента была зафиксирована брадикинезия, проявившаяся в виде замедления совершаемых движений на установке, а именно в увеличении времени поворота в 1,5 раза (Рисунок 35 А) и времени спуска в 1,75 раза по сравнению с группой физиологический раствор + плацебо (Рисунок 35 Б).



Примечание – Данные представлены в виде медианы: ##### – $p < 0,0001$, ## – $p < 0,01$, # – $p < 0,05$ – статистически значимые различия по сравнению с группой физиологический раствор + плацебо (однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) с множественным сравнением по Даннету); *** – $p < 0,001$, ** – $p < 0,01$, * – $p < 0,05$ – статистически значимые различия с группой контроля (паракват + плацебо) (однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) с множественным сравнением по Даннету).

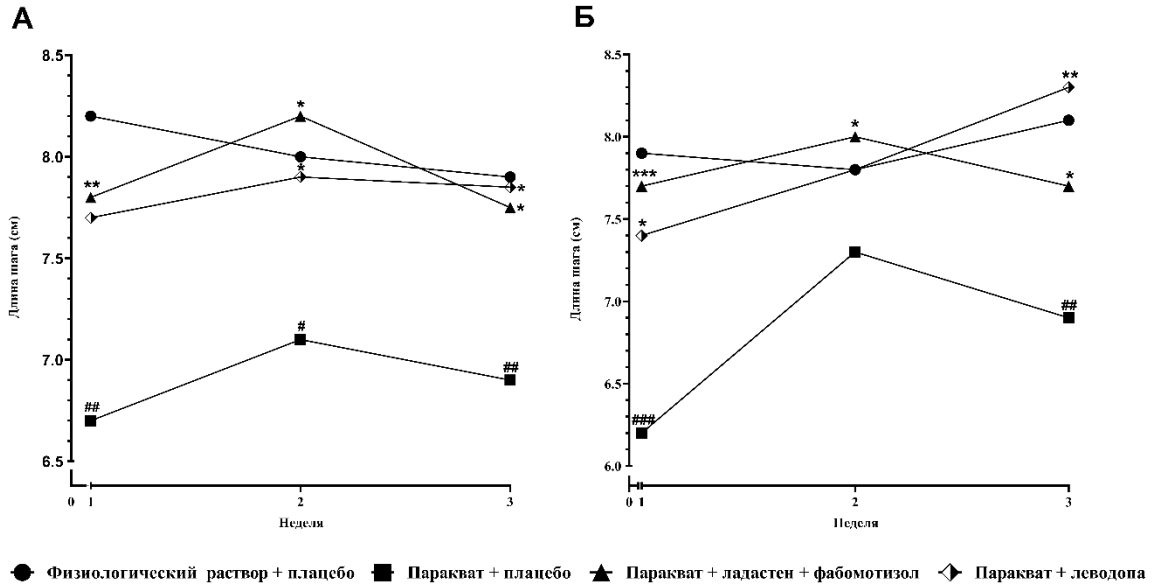
Рисунок 35 – Влияние комбинации ладастена с фабомотизолом на выраженность брадикинезии у мышей с паракват-индуцированным паркинсоническим синдромом в тесте «вертикальный стержень»: время поворота (А), время спуска со стержня (Б)

Введение комбинации ладастена с фабомотизолом приводило к снижению выраженности брадикинезии и улучшению ориентации животных на стержне, при этом эффективность комбинации была сопоставима с таковой у леводопы (Таблица 12). На 2-й неделе эксперимента выявлено достоверное влияние вводимых субстанций только на время спуска, поскольку комбинация ладастена с фабомотизолом сокращала данный показатель в 1,2 раза ($p < 0,05$), а леводопа – в 1,25 раза ($p < 0,05$) по сравнению с контролем (Рисунок 35 Б). На 3-й неделе эксперимента введение комбинации приводило к сокращению времени поворота в 1,4 раза ($p < 0,05$) (Рисунок 35 А), а времени спуска – в 1,53 раза ($p < 0,001$) (Рисунок 35 Б) по сравнению с контролем. При этом введение леводопы достоверно влияло лишь на время спуска, сокращая его в 1,4 раза ($p < 0,01$) по сравнению с контролем (Рисунок 35 Б).

Экстрапирамидная ригидность была установлена уже на 1-й неделе исследования, поскольку длина шага передних лап контроля была меньше на 1,5 см (18,3%; $p < 0,01$) (Рисунок 36 А), а задних лап – на 1,7 см (21,5%; $p < 0,001$) по сравнению с группой физиологический раствор + плацебо (Рисунок 36 Б). На 2-й неделе у мышей контрольной группы зафиксировано небольшое увеличение длины шага передних (Рисунок 36 А) и задних лап (Рисунок 36 Б), переходящее в резкое снижение данного показателя на 3-й неделе. На 3-й неделе эксперимента у мышей группы контроля было зафиксировано снижение длины шага передних лап на 1,05 см (13,3%; $p < 0,01$) (Рисунок 36 А), а задних – на 1,2 см (14,9%; $p < 0,01$) по сравнению с группой физиологический раствор + плацебо (Рисунок 36 Б).

Комбинация ладастена с фабомотизолом снижала выраженность экстрапирамидной ригидности у мышей, причем до состояния, сопоставимого с группой физиологический раствор + плацебо (Таблица 12). Эффективность комбинации ладастена с фабомотизолом отмечалась на 1-й неделе применения, поскольку было зафиксировано увеличение длины шага передних лап на 1,1 см (16,4%; $p < 0,01$) (Рисунок 36 А), а задних – на 1,5 см (24,2%; $p < 0,001$) (Рисунок 36 Б) по сравнению с контролем

На 2-й неделе эксперимента на фоне комбинации ладастена с фабомотизолом было установлено увеличение длины шага передних лап на 1,1 см (15,5%; $p < 0,05$) (Рисунок 36 А) и задних лап на 0,7 см (9,6%; $p < 0,05$) (Рисунок 36 Б) по сравнению с контролем, в то время как введение комбинации на 3-й неделе привело к увеличению длины между передними и задними лапами на 0,85 см (12,4%; $p < 0,05$) (Рисунок 36 А, Б). При этом вышеописанное влияние комбинации ладастена с фабомотизола было сопоставимо с леводопой. Наибольшая эффективность леводопы была зафиксирована на 3-й неделе эксперимента, поскольку длина шага передних лап превышала на 1 см (14,6%; $p < 0,05$) (Рисунок 36 А), а задних – на 1,45 см (21,2%; $p < 0,01$) длину шага мышей группы контроля (Рисунок 36 Б).



Примечание – Данные представлены в виде медианы: ### – $p < 0,001$, ## – $p < 0,01$, # – $p < 0,05$ – статистически значимые различия по сравнению с группой физиологический раствор + плацебо (однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) с множественным сравнением по Даннету); *** – $p < 0,001$, ** – $p < 0,01$, * – $p < 0,05$ – статистически значимые различия с группой контроля (паракват + плацебо) (однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) с множественным сравнением по Даннету).

Рисунок 36 – Влияние комбинации ладастена с фабомотизолом на выраженность экстрапирамидной ригидности передних (А) и задних (Б) лап у мышей с паракват-индуцированным паркинсоническим синдромом в тесте «длина шага»

Обобщение полученных результатов в виде среднего арифметического приведено в таблице 15.

Таблица 15 – Влияние комбинации ладастена 50 мг/кг с фабомотизолом 10 мг/кг на выраженность различных проявлений паркинсонического синдрома, индуцированного паракватом

Неделя	Группа	Поведенческие тесты					
		«Вращающийся стержень» (время удержания, с)		«Вертикальный стержень»		«Длина шага» (длина шага, см)	
		20 об/мин	4–30 об/мин	Время поворота (с)	Время спуска (с)	Передние лапы	Задние лапы
1-я неделя (2 инъекции параквата)	Физиологический раствор + плацебо	98,6 ± 15,1	179,6 ± 17,4	2,5 ± 0,5	7,7 ± 1,2	8 ± 0,5	7,85 ± 0,5

Продолжение Таблицы 15

1-я неделя (2 инъекции параквата)	Паракват + плацебо	56,7 ± 20,5 ####	125,6 ± 37,1 ##	3,3 ± 1,6	8,6 ± 2,3	6,6 ± 0,8 ##	6,5 ± 0,6 ####
	Паракват + ладастен 50 мг/кг + фабомотизол 10 мг/кг	101,8 ± 10,5 ***	180,4 ± 10,3 **	2,9 ± 0,3	7,6 ± 0,7	7,9 ± 0,4 **	7,75 ± 0,4 ***
	Паракват + леводопа 50 мг/кг	91,2 ± 10,3 **	184,9 ± 28,2 **	2,87 ± 0,6	8,1 ± 1,4	7,4 ± 0,6	7,28 ± 0,5 *
2-я неделя (4 инъекции параквата)	Физиологи- ческий раствор + плацебо	107,2 ± 14,4	217,9 ± 21,5	1,9 ± 0,6	6,5 ± 1,1	7,9 ± 0,4	7,8 ± 0,4
	Паракват + плацебо	46 ± 20,3 #####	157,6 ± 14,6 ###	2,7 ± 0,9	8,97 ± 2,2 #	6,97 ± 0,7 #	7,1 ± 0,7
	Паракват + ладастен 50 мг/кг + фабомотизол 10 мг/кг	99,2 ± 16,1 ****	202,4 ± 28,7 **	2,4 ± 0,6	6,7 ± 1,7 *	7,97 ± 0,5 *	7,8 ± 0,4 *
	Паракват + леводопа 50 мг/кг	102,5 ± 15,2 ****	207,4 ± 14,7 **	2,1 ± 0,3	6,6 ± 0,7 *	7,87 ± 0,6 *	7,7 ± 0,6
3-я неделя (6 инъекций параквата)	Физиологи- ческий раствор + плацебо	109,8 ± 13,4	226,1 ± 20,8	2,13 ± 0,2	5,7 ± 1,4	7,95 ±0,6	8 ± 0,5
	Паракват + плацебо	51,4 ± 28,4 #####	141,6 ± 48,3 ###	3,1 ± 0,8 ##	10,2 ± 2,2 #####	6,9 ± 0,18 ##	6,9 ± 0,2 ##
	Паракват + ладастен 50 мг/кг + фабомотизол 10 мг/кг	109,2 ± 11,95 ****	208,8 ± 21,4 **	2,17 ± 0,2 *	6,2 ± 0,7 ***	7,73 ± 0,2 *	7,8 ± 0,2 *
	Паракват + леводопа 50 мг/кг	106,8 ± 13,6 ***	204,1 ± 15,4 **	2,5 ± 0,5	6,8 ± 0,8 **	7,72 ± 0,8 *	8,2 ± 0,95 **

Примечание – Данные представлены в виде среднего ± стандартное отклонение: ##### – p < 0,0001, ### – p < 0,001, ## – p < 0,01, # – p < 0,05 – статистически значимые различия по сравнению с группой физиологический раствор + плацебо (однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) с множественным сравнением по Даннету); **** – p < 0,0001, *** – p < 0,001, ** – p < 0,01, * – p < 0,05 статистически значимые различия по сравнению с контролем (паракват + плацебо) (однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) с множественным сравнением по Даннету).

Таким образом, комбинированное введение ладастена 50 мг/кг с фабомотизолом 10 мг/кг приводило к успешному снижению выраженности всех двигательных нарушений на модели ПС, индуцированного паракватом, причем эффективность комбинации была сопоставима с таковой у леводопы.

По полученным результатам исследования наличия антипаркинсонического действия у комбинации субстанций ладастена с фабомотизолом при пероральном хроническом введении на модели паракват-индуцированного ПС у мышей опубликована статья с соавторами:

Мариевский, В. Е. Исследование антипаркинсонической активности комбинации ладастена с фабомотизолом на модели паракват-индуцированного паркинсонического синдрома / **В. Е. Мариевский, И. А. Любанский, С. В. Шангин, Л. Ф. Зайнуллина** [и др.] // Фармакокинетика и фармакодинамика. – 2025. – № 1. – С. 43-52.

3.6 Обсуждение полученных результатов

В эксперименте с монотерапией ладастеном на модели 6-ГОДА-индуцированного ПС у мышей было продемонстрировано наличие антипаркинсонического действия, проявившегося в способности снижать выраженность различных двигательных нарушений, а также оказывать дофаминпозитивное влияние. Подобное влияние ладастена можно объяснить его комплексным фармакологическим воздействием. Прежде всего известно о способности ладастена оказывать стимулирующее влияние на синтез ДА, что было продемонстрировано на здоровых лабораторных грызунах. Так, ладастен оказывает стимулирующее влияние на синтез ДА *de novo*, что подтверждается усилением экспрессии гена ТГ с последующим возрастанием уровня мРНК и белка в лимбических структурах головного мозга [6, 24]. Кроме того, на фоне введения ладастена отмечалась тенденция к повышению уровня ДА и его метаболитов в ПТ [19], а также увеличение уровня предшественника ДА – ДОФА в фронтальной коре, гипоталамусе, прилежащем ядре и ПТ [11]. Помимо этого, стимулирующее влияние ладастена на дофаминергическую систему проявляется его способностью ингибировать обратный захват ДА [11, 21]. Наличие положительного дофаминергического действия ладастена также подтверждается преобразованием кратковременной потенциации в долговременную на фоне введения этого ЛС, что приводит к более эффективной активации D₁/D₅-рецепторов ДА и созданию возбуждающего постсинаптического потенциала (ВПП) в области СА1 гиппокампа [147]. В свою очередь, ВПП зависит от синтеза белка *de novo*. Помимо вышеописанных прямых влияний на дофаминергическую систему, имеется ряд косвенных данных, свидетельствующих о положительном влиянии препарата на биосинтез ДА. Например, ладастен повышает активность РКС, поскольку на фоне его введения наблюдалось увеличение активности данного белка более чем в два раза на начальных этапах действия ЛС. Более того, активность РКС не зависела от экзогенных ионов кальция и ингибировалась блокаторами

кальциевых каналов [2]. В этом же исследовании была продемонстрирована вовлеченность Ca^{2+} -АТФазы в поддержание оптимальной концентрации Ca^{2+} в первые часы действия ладастена [2]. Кроме того, было установлено, что ладастен активирует ERK1/2, что, принимая во внимание вышеизложенное, свидетельствует в пользу преимущественной Ca^{2+} -опосредованной активации этих киназ [24]. Можно предположить, что воздействие ладастена на указанные сигнальные пути способствует увеличению уровня ДА за счет фосфорилирования ТГ, осуществляемого протеинкиназами. Таким образом, вышеперечисленные данные указывают на то, что ладастен стимулирует синтез ДА, а также ускоряет метаболизм и снижает обратный захват данного моноамина. По всей видимости, способность ладастена оказывать положительную дофаминергическую стимуляцию сохраняется в условиях нейродегенерации, а возможно даже усиливается, поскольку уровень ДА на фоне введения ладастена в большой дозе был близок к контрольным значениям Л.О. животных, многократно превосходя таковой у группы контроля (6-ГОДА + плацебо). Подобное влияние ладастена согласуется со снижением выраженности ПС у мышей в батарее используемых в работе поведенческих тестов. Стоит отметить, что в тестах «вертикальный стержень» и «цилиндр» была установлена линейная дозовая зависимость эффектов ладастена.

В эксперименте с фабомотизолом было продемонстрировано наличие у него антипаркинсонической активности, поскольку обнаружено уменьшение различных проявлений ПС и восстановление содержания ДА и его метаболитов на модели 6-ГОДА-индуцированного ПС у мышей. Стоит отметить, что наибольшее положительное действие достигалось при пероральном введении фабомотизола в дозах 5 и 10 мг/кг, в то время как в дозе 2,5 мг/кг не было выявлено достоверного улучшения состояния животных. Ранее было показано, что фабомотизол при внутрибрюшинном введении в дозе 2,5 мг/кг на аналогичной модели 6-ГОДА-индуцированного ПС оказывает восстанавливающее действие на содержание ДА в поврежденном ПТ [225]. Эффективность более высоких доз фабомотизола при пероральном введении

на данной модели ПС можно объяснить особенностью его фармакокинетики, поскольку известно, что фабомотизол обладает эффектом первого прохождения, в связи с чем в системный кровоток поступает около 40% от введенной дозы [28]. Для объяснения же механизма, лежащего в основе наблюдаемого антипаркинсонического действия, необходимо углубиться во влияние фабомотизола на ряд мишеней. В первую очередь, фабомотизол является лигандным активатором Sigma-1R, который играет важную нейропротективную роль в условиях нейродегенерации [29]. Данное предположение подтверждается исследованием, в котором показано, что монотерапия фабомотизолом на унилатеральной модели 6-ГОДА-индуцированного ПС оказывала сходное с агонистом Sigma-1R PRE-084 положительное действие, выражающееся в нормализации двигательной функции и предотвращении снижения уровня ДА в поврежденном стриатуме [225]. В этом же исследовании показано, что на фоне введения антагониста Sigma-1R BD-1047 активность фабомотизола и PRE-084 была заметно снижена [225].

Второй мишенью для фабомотизола является NQO2, вовлеченная в развитие окислительного стресса в нейродегенеративных условиях при БП [64]. Фабомотизол способен ингибировать NQO2, что было установлено *in vitro* [13], а в дальнейшем показано на 6-ГОДА-индуцированной модели ПС у мышей [16].

Помимо вышеописанных мишеней, фабомотизол повышает уровень нейротрофина BDNF [1, 9, 28], который выполняет нейропротекторные функции. Нейропротекторные свойства фабомотизола также были показаны на различных нейротоксических моделях, например, на модели окислительного стресса и глутаматной токсичности [10], на модели фокальной ишемии головного мозга крыс [27] и повреждении, вызванном амилоидом A β 25-35 [51]. Таким образом, антипаркинсоническое действие фабомотизола объясняется его комплексным воздействием, в первую очередь, на Sigma-1R и NQO2. Стоит отметить, что в тестах «вращающийся стержень» при

постоянной скорости, «вертикальный стержень» (время поворота) и «цилиндр» была установлена линейная дозовая зависимость эффектов фабомотизола.

В экспериментах с комбинациями ладастена с фабомотизолом на унилатеральной модели 6-ГОДА-индуцированного ПС у мышей было продемонстрировано выраженное антипаркинсоническое действие, которое проявилось как на поведенческом, так и на нейрохимическом уровнях. В батарее поведенческих тестов наилучшую эффективность продемонстрировали комбинации ладастена в дозах 50 и 100 мг/кг с фабомотизолом в дозе 10 мг/кг, выраженно снижая моторный дефицит, брадикинезию, акинезию передней конечности и экстрапирамидную ригидность, причем улучшения на фоне комбинации сопоставимы с таковыми на фоне применения препарата сравнения леводопы. Кроме того, комбинации ладастена с фабомотизолом превосходят по действию монотерапию каждым по отдельности, поскольку даже самая низкая доза ладастена (10 мг/кг) в комбинации с фабомотизолом была более эффективной в устранении некоторых проявлений ПС. Вышеперечисленные двигательные улучшения животных сопоставимы с положительной дофаминергической динамикой, выявленной при нейрохимическом анализе. Исходя из вышеописанных механизмов действия ладастена и фабомотизола, можно объяснить полученные результаты на унилатеральной модели 6-ГОДА-индуцированного ПС синергизмом ЛС в составе комбинации, проявившимся в виде аддитивного действия. Стоит отметить, что комплексное влияние ладастена и фабомотизола на дофаминергическую систему особенно четко проявляется при введении комбинации в больших дозах, а именно ладастена в дозе 100 мг/кг с фабомотизолом в дозах 5 или 10 мг/кг, что может быть обусловлено большей конечной концентрацией ладастена. Как известно, ладастен обладает сравнительно низкой биодоступностью, но при этом проникает через ГЭБ [21]. Интересно, что комбинация ладастена с фабомотизолом способствовала положительной дофаминергической модуляции при введении в меньших

дозах, в отличие от монотерапии данными ЛС на используемой модели ПС. Стоит отметить, что наименьшая доза ладастена (10 мг/кг) была более эффективной в составе комбинации с фабомотизолом в дозе 10 мг/кг, нежели чем с фабомотизолом в дозе 5 мг/кг.

Примечательно, что сочетанное введение ладастена в дозе 50 мг/кг с фабомотизолом в дозе 10 мг/кг демонстрирует наиболее существенное повышение уровня ДОФУК (что свидетельствует о потенцировании в синергичном действии этой комбинации) и 3-МТ по сравнению с другими вариантами комбинаций данных ЛС, при этом уровень ГВК остается примерно равным таковому на фоне использования комбинации ладастена в дозе 100 мг/кг с фабомотизолом в дозе 10 мг/кг. При этом уровень ДА при применении ладастена в дозе 50 мг/кг с фабомотизолом в дозе 10 мг/кг значительно превышает уровень группы контроля, и примерно соответствует содержанию ДА на фоне применения комбинации ладастена в дозе 10 мг/кг с фабомотизолом в дозе 5 мг/кг. Подобные изменения говорят о том, что, возможно, не происходит полной утилизации ДА, а наблюдаемая динамика изменения содержания ДА и его метаболитов свидетельствует об усилении метаболизма ДА при одновременном повышении его синтеза. Кроме того, поведенческие тесты у животных на фоне введения комбинации ладастена в дозе 50 мг/кг с фабомотизолом в дозе 10 мг/кг также свидетельствуют о выраженном антипаркинсоническом эффекте, который вряд ли бы был столь выражен при истощении пула ДА. Вероятно, если учитывать влияние ладастена на биосинтез ДА и ДОФА, происходит компенсаторное ускорение утилизации ДА за счет вновь синтезируемых молекул этого катехоламина. Помимо этого, еще одним объяснением может выступать предполагаемое ингибирующее влияние комбинации на КОМТ, причем на форму фермента, связанную с ЭПР, которая представлена в нейронах. Поскольку на фоне комбинации ладастена в дозе 50 мг/кг с фабомотизолом в дозе 10 мг/кг наблюдается сильное увеличение содержания ДОФУК при увеличении уровня 3-МТ, можно предполагать ингибирующее влияние именно на КОМТ,

связанную с ЭПР, в результате чего происходит сдвиг метаболизма нейронального ДА в сторону MAO-B-зависимого окислительного пути, при этом мало затрагивая метаболизм внеклеточного ДА. Данная гипотеза подтверждается наличием у фабомотизола слабой и легко обратимой ингибирующей активности MAO-A [29]. Таким образом, данные нейрохимического анализа сопоставимы со снижением выраженности двигательных нарушений на фоне введения комбинаций ладастена с фабомотизолом, что указывает на дофаминпозитивное воздействие (Рисунок 37).

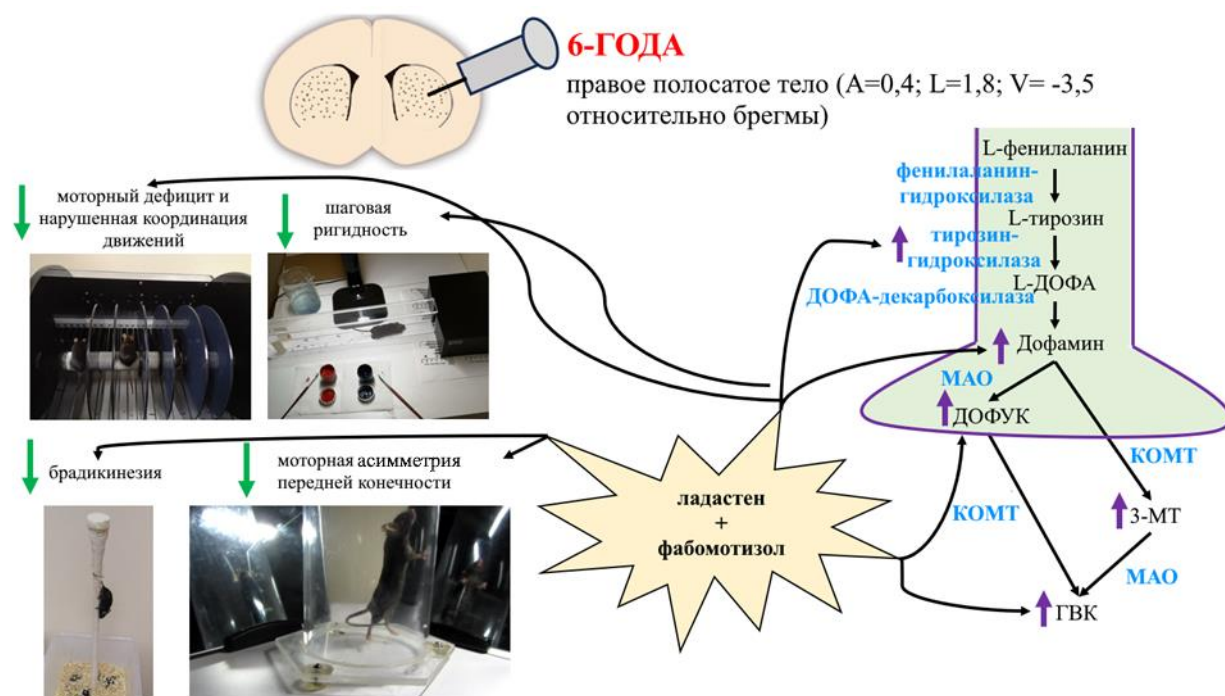


Рисунок 37 – Схематическое обобщение антипаркинсонического действия комбинации ладастена с фабомотизолом на поведенческом и нейрохимическом уровнях

Действие комбинаций в больших дозах на дофаминергическую систему сопоставимо с действием препарата сравнения леводопы, что определяет их перспективность для дальнейших исследований в качестве антипаркинсонического средства.

В эксперименте с изучением действия комбинаций ладастена с фабомотизолом на модели МФТП-индуцированного ПС было установлено антипаркинсоническое действие, наиболее выраженное у комбинации

ладастена в дозе 50 мг/кг с фабомотизолом в дозе 10 мг/кг. Стоит отметить, что данная комбинация была более эффективной по сравнению с монотерапией ладастеном или фабомотизолом в данной модели, а также превосходила по эффективности комбинацию ладастена в дозе 100 мг/кг с фабомотизолом в дозе 10 мг/кг. Однако, в отличие от ранее используемых моделей, в рамках протокола МФТП-индуцированного ПС субстанции вводились однократно за 30 минут до введения нейротоксина, в связи с чем можно предполагать в основе наблюдаемого антипаркинсонического действия быстрые механизмы предотвращения нейродегенеративных изменений. Объяснением такого эффекта может служить влияние ладастена на экспрессию гена ТГ. Так, при однократном введении ладастена в дозе 50 мг/кг здоровым крысам наблюдалось увеличение экспрессии генов ТГ в ПТ уже через 30 минут после введения, которое сохранялось на том же уровне через 1,5 ч после начала эксперимента [4]. Принимая во внимание способность МФТП индуцировать образование супероксидных радикалов, которые вступают в реакцию с NO с образованием пероксинитрита, в свою очередь, инактивирующего ТГ [172] с дальнейшим снижением продукции ДА, можно предположить, что ладастен, вероятно, препятствует негативному действию МФТП посредством усиления экспрессии гена ТГ. Учитывая, что МФТП является избирательным токсином по отношению к дофаминергическим нейронам ЧС, можно утверждать, что наблюдаемые под действием комбинации ладастена с фабомотизолом улучшения могут быть вызваны воздействием на компоненты экстрапирамидной системы головного мозга. Кроме того, принимая во внимание вышеописанные дофаминпозитивные эффекты ладастена и нейропротекторные свойства фабомотизола, можно заключить, что выявленное антипаркинсоническое действие комбинации этих ЛС обусловлено их комплексным воздействием. В заключение стоит отметить, что действие комбинации ладастена в дозе 50 мг/кг с фабомотизолом в дозе 10 мг/кг на модели МФТП-индуцированного ПС было сопоставимо с таковым у

леводопы, что подтверждает наличие у комбинации выраженной антипаркинсонической активности.

В эксперименте с изучением активности комбинации ладастена в дозе 50 мг/кг с фабомотизолом в дозе 10 мг/кг на модели паракват-индуцированного ПС у мышей было показано наличие антипаркинсонического действия, проявившегося в устранении различных двигательных нарушений, что соотносится с вышеописанными эффектами у данной комбинации на других моделях ПС. Также данная комбинация по эффективности была сопоставима с леводопой, что тоже согласуется с результатами экспериментов на других моделях ПС. Однако, следует учитывать некоторые отличия модели паракват-индуцированного ПС от моделей 6-ГОДА- и МФТП-индуцированных ПС. Так, паракват обладает системным воздействием, что выражается в его способности поражать периферические органы вне ЦНС. Тем не менее, поскольку леводопа успешно устраняла различные проявления ПС, вызванные паракватом, можно утверждать, что в большей степени повреждения затрагивали nigrostriatalный путь, а значит положительное влияние комбинации ладастена с фабомотизолом обусловлено их комплексным дофаминпозитивным и нейропротекторным действием.

Таким образом, учитывая все вышеперечисленные антипаркинсонические эффекты у комбинации ладастена с фабомотизолом, выявленные на моделях 6-ГОДА-, МФТП- и паракват-индуцированных ПС, можно заключить, что совместное введение данных ЛС приводит к синергичному дофаминпозитивному воздействию, которое выражается в виде аддитивного действия в условиях нейродегенерации, что определяет терапевтическую перспективность данной комбинации по сравнению с монотерапией ладастеном и фабомотизолом. Комбинации ладастена с фабомотизолом были эффективными на всех используемых моделях ПС, при этом наибольшее положительное влияние продемонстрировала комбинация ладастена в дозе 50 мг/кг с фабомотизолом в дозе 10 мг/кг. Стоит отметить, что

эффективность комбинаций ладастена с фабомотизолом в высоких дозах на всех исследованных моделях ПС была сопоставима с таковой у леводопы.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На ранних этапах исследования было установлено наличие антипаркинсонического действия монотерапии ладастена и фабомотизола при хроническом пероральном введении на унилатеральной модели 6-ГОДА-индуцированного ПС. Противопаркинсоническое действие проявлялось в устранении различных двигательных нарушений, оцененных в батарее поведенческих тестов, а также в положительном влиянии на дофаминергическую систему головного мозга животных в условиях нейродегенерации. По полученным результатам для дальнейшего исследования антипаркинсонических эффектов комбинации ладастена с фабомотизолом были выбраны дозы 10, 50 и 100 мг/кг для ладастена, а также 5 и 10 мг/кг для фабомотизола.

На аналогичной модели 6-ГОДА-индуцированного ПС было установлено, что комбинация ладастена с фабомотизолом снижала выраженность двигательных проявлений ПС, а именно моторного дефицита и нарушенной координации движений в тесте «вращающийся стержень», брадикинезии в тесте «вертикальный стержень», акинезии передней конечности в тесте «цилиндр» и ригидности в тесте «длина шага». Данные поведенческих тестов были сопоставимы с дальнейшим нейрохимическим анализом и указывали на наличие у исследуемых комбинаций дофаминпозитивного воздействия, поскольку на фоне совместного введения ладастена с фабомотизолом наблюдалось увеличение содержания ДА и его метаболитов по сравнению с контролем. При этом наибольшей эффективностью при хроническом пероральном введении обладали комбинации ладастена в дозах 50 и 100 мг/кг с фабомотизолом в дозе 10 мг/кг. Кроме того, совместное введение ладастена в дозе 10 мг/кг с фабомотизолом в дозе 10 мг/кг было более эффективным, чем его введение с фабомотизолом в дозе 5 мг/кг. Таким образом, установлен синергизм ладастена с фабомотизолом в дозе 10 мг/кг, проявляющийся в виде аддитивного действия.

Стоит также отметить, что как на поведенческом, так и на нейрохимическом уровнях, действие комбинации ладастена с фабомотизолом было сопоставимо с таковым у препарата сравнения леводопы.

В связи с установленным синергизмом в виде аддитивного действия комбинаций ладастена с фабомотизолом для дальнейшего исследования изучались противопаркинсонические эффекты комбинации фабомотизола в дозе 10 мг/кг с ладастеном в больших дозах 50 и 100 мг/кг, как показавших наибольшую эффективность на модели 6-ГОДА-индуцированного ПС. На следующем этапе исследования изучалась способность комбинаций ладастена с фабомотизолом оказывать антипаркинсоническое действие на модели МФТП-индуцированного ПС. В отличие от ранее проведенных экспериментов на модели 6-ГОДА индуцированного ПС, исследуемые вещества вводились однократно за 30 минут до инъекции нейротоксина. По полученным результатам было выявлено, что монотерапия ладастеном и фабомотизолом теряет свою эффективность в подобных условиях тестирования, в то время как комбинации ладастена в дозах 50 и 100 мг/кг с фабомотизолом в дозе 10 мг/кг демонстрируют антипаркинсоническую активность. Важно отметить, что именно комбинация ладастена в дозе 50 мг/кг с фабомотизолом в дозе 10 мг/кг была наиболее эффективной в устранении всех оцениваемых двигательных нарушений на модели МФТП-индуцированного ПС сопоставимо с действием леводопы.

В основе наблюдаемых противопаркинсонических эффектов комбинации ладастена с фабомотизолом лежит синергичное влияние этих ЛС, выражающееся в виде аддитивного действия, которое, вероятно, обусловлено однонаправленным дофаминпозитивным влиянием при действии на ряд мишеней: со стороны ладастена на процессы синтеза, высвобождения и метаболизма ДА, а со стороны фабомотизола – на Sigma-1R, NQO2 и нейротрофины. Именно комплексное влияние ладастена и фабомотизола оказало достоверное положительное влияние на снижение выраженности таких проявлений ПС, индуцированного МФТП, как тремор, ригидность,

моторный дефицит и нарушенная координация движений, а также брадикинезия.

На заключительном этапе исследования оценивалось антипаркинсоническое действие комбинации ладастена с фабомотизолом на паракват-индуцированном ПС при пероральном хроническом введении. Выбор в качестве тестируемой комбинации ладастена в дозе 50 мг/кг с фабомотизолом в дозе 10 мг/кг обусловлен ее наилучшей эффективностью на ранее используемых моделях ПС. Аналогично предыдущим экспериментам, комбинация успешно снижала выраженность таких двигательных нарушений, как моторный дефицит, брадикинезия и ригидность, а ее эффективность была сопоставима с таковой у леводопы.

Таким образом, в работе впервые было продемонстрировано наличие антипаркинсонического действия у комбинации ладастена с фабомотизолом на моделях 6-ГОДА-, МФТП- и паракват-индуцированных ПС. Подобное действие охарактеризовано как синергичное, а именно аддитивное дофаминпозитивное, в условиях развившейся нейродегенерации. Во всех используемых моделях противопаркинсонические эффекты ладастена с фабомотизолом были сопоставимы с таковыми у леводопы, что определяет терапевтическую перспективность данной комбинации.

ВЫВОДЫ

1. Установлено антипаркинсоническое действие у субстанции ладастена на модели 6-ГОДА-индуцированного ПС у мышей, наиболее выражено проявляющееся при пероральном хроническом введении в дозах 50 и 100 мг/кг.

2. Установлено антипаркинсоническое действие у субстанции фабомотизола на модели 6-ГОДА-индуцированного ПС у мышей, наиболее выражено проявляющееся при пероральном хроническом введении в дозах 5 и 10 мг/кг.

3. С помощью нейрохимического анализа показано, что монотерапия субстанциями ладастена (50 и 100 мг/кг) и фабомотизола (5 и 10 мг/кг) и их комбинированное введение приводят к предотвращению падения уровня ДА и его метаболитов в поврежденном ПТ при моделировании ПС посредством унилатерального интрастриатного введения 6-ГОДА.

4. Проведен подбор наиболее эффективных доз субстанций ладастена (50 и 100 мг/кг) с фабомотизолом (10 мг/кг) в составе комбинации на модели 6-ГОДА-индуцированного ПС у мышей.

5. Установлено антипаркинсоническое действие комбинации субстанций ладастена с фабомотизолом на модели МФТП-индуцированного ПС у мышей, наиболее выражено проявляющееся при пероральном остром введении ладастена в дозе 50 мг/кг с фабомотизолом в дозе 10 мг/кг.

6. Установлено антипаркинсоническое действие комбинации субстанций ладастена в дозе 50 мг/кг с фабомотизолом в дозе 10 мг/кг на модели паракват-индуцированного ПС у мышей.

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

Результаты диссертационной работы обосновывают наличие выраженной антипаркинсонической активности у комбинации ладастена с фабомотизолом, определяя ее терапевтическую перспективность. Полученные данные могут в дальнейшем быть использованы для решения вопроса о возможности расширения показаний к применению у данных ЛС в рамках комбинированной фармакотерапии БП.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

- АТФ – аденозинтрифосфат
- АФК – активные формы кислорода
- БА – болезнь Альцгеймера
- БП – болезнь Паркинсона
- ВПП – возбуждающий постсинаптический потенциал
- ГАМК – γ -аминомасляная кислота
- ГВК – гомованилиновая кислота
- 6-ГОДА – 6-гидроксидофамин
- ГТФ – гуанозинтрифосфат
- ГЭБ – гематоэнцефалический барьер
- ЕЭК – Евразийская экономическая комиссия
- ДА – дофамин
- ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота
- ДОФА – 3,4-дигидроксифенилаланин
- ДОФАЛ – 3,4-дигидроксифенилацетальдегид
- ДОФУК – 3,4-дигидроксифенилуксусная кислота
- КОМТ – катехол-О-метилтрансфераза
- Л.О. – ложно-оперированные
- ЛС – лекарственные средства
- МАО – моноаминоксидаза
- мРНК – матричная рибонуклеиновая кислота
- 3-МТ – 3-метокситирамин
- МФП⁺ – 1-метил-4-фенилпиридиний
- МФТП – 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридин
- НВ – нейровоспаление
- ПС – паркинсонический синдром

ПТ – полосатое тело

ТГ – тирозингидроксилаза

ТГ⁺ – ТГ позитивные

ТЛ – тельца Леви

УТФ – уридинтрифосфат

цАМФ – циклический аденозинмонофосфат

ЦНС – центральная нервная система

ЧС – черная субстанция

ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота

ЭПР – эндоплазматический ретикулум

α -син – α -синуклеин

BDNF – нейротрофический фактор мозга

Drp1 – динамин-подобный белок 1

ERK1/2 – регулируемые внеклеточными сигналами MAPK ERK1 и ERK2

GAPDH – глицеральдегид-3-фосфат-дегидрогеназа

HMGB1 - амфотерин

LRRK2 – дардарин, богатая лейциновыми повторами киназа 2

MAPK – митоген-активируемые протеинкиназы

MFN – митофузин-1

NAC – неамилоидный компонент

NGF – фактор роста нервов

NMDA – N-метил-D-аспарагиновая кислота

NQO2 – хинон-редуктаза 2

PGC-1 – гамма-коактиватор рецептора 1, активируемого пролифератором пероксисом

PKA – протеинкиназа A

PKC – протеинкиназа C

Sigma-1R – Sigma-1 рецептор

TrkB – тропомиозин-рецепторная киназа B

VDAC – потенциалзависимый анионный канал

VMAT2 – везикулярный переносчик моноаминов 2-го типа

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Антипова, Т. А. Селективный анксиолитик афобазол увеличивает содержание BDNF и NGF в культуре гиппокампальных нейронов линии НТ-22 / Т. А. Антипова, Д. С. Сапожникова, Л. Ю. Бахтина, С. Б. Середенин // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2009. – Т. 72, № 1. – С. 12-14.
2. Вахитова, Ю.В. Влияние ладастена на активность протеинкиназы С в клетках головного мозга крыс / Ю. В. Вахитова, М. Х. Салимгареева, С. Б. Середенин // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2004. – Т. 67, № 2. – С. 12-15.
3. Вахитова, Ю. В. Влияние ладастена на активность сАМР - зависимых протеинкиназ и фосфорилирование белков в клетках головного мозга крыс/ Ю. В. Вахитова, М. Х. Салимгареева, С. Б. Середенин // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2004. – Т. 67, № 3. – С. 7-9.
4. Вахитова, Ю. В. Ладастен индуцирует экспрессию генов, регулирующих биосинтез дофамина в различных структурах мозга крыс / Ю. В. Вахитова, Р. С. Ямиданов, С. Б. Середенин // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2004. – Т. 67, № 4. – С. 7-11.
5. Вахитова, Ю. В. Влияние ладастена на экспрессию генов в мозге крыс / Ю. В. Вахитова, Р. С. Ямиданов, В. А. Вахитов, С. Б. Середенин // Доклады Академии наук. – 2005. – Т. 401, № 5. – С. 692-695.
6. Вахитова, Ю. В. О механизмах действия ладастена / Ю. В. Вахитова // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2021. – Т. 84, № 2. – С. 34-40.
7. Воронин, М. В. Молекулярные механизмы нейротропного действия афобазола / М. В. Воронин, И. А. Кадников, Е. В. Абрамова // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2021. – Т. 84, № 2. – С. 15-22.

8. Давыдова, А. И. Нейрохимическое изучение влияния афобазола и ладастена на синтез и метаболизм моноаминов и их метаболитов в структурах мозга крыс в условиях действия ингибитора декарбоксилазы ароматических кислот NSD-1015 / А. И. Давыдова, П. М. Клодт, В. С. Кудрин [и др.] // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2010. – Т. 73, № 3. – С. 2-6.
9. Дорофеева, О. А. Эффективность и безопасность фабомотизола (АФОБАЗОЛ® РЕТАРД) у пациентов с расстройствами адаптации после перенесенной коронавирусной инфекции (COVID-19): результаты многоцентрового рандомизированного двойного слепого плацебо-контролируемого исследования / О. А. Дорофеева, В. А. Некрасов, В. Э. Медведев [и др.] // Современная терапия психических расстройств. – 2025. – № 1. – С. 11-23.
10. Зенина, Т. А. Изучение нейропротекторных свойств афобазола в опытах *in vitro* / Т. А. Зенина, И. В. Гавриш, Д. С. Мелкумян [и др.] // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2005. – Т. 140, № 8. – С. 161-163.
11. Зимин, И. А. Участие дофамин- и серотонинергических систем мозга в реализации психофармакологических эффектов ладастена и сиднокарба / И. А. Зимин, Д. А. Абаимов, Е. А. Будыгин [и др.] // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2010. – Т. 73, № 2. – С. 2-5.
12. Иллариошкин, С. Н. Современные подходы к лечению болезни Паркинсона / С. Н. Иллариошкин // Атмосфера. Нервные болезни. – 2004. – № 4. – С. 14-21.
13. Кадников, И. А. Влияние афобазола на активность хинонредуктазы 2 / И. А. Кадников, М. В. Воронин, С. Б. Середенин // Химико-фармацевтический журнал. – 2013. – Т. 47, № 10. – С. 9-11.
14. Кадников, И. А. Метаболит афобазола М-11 ингибирует хинонредуктазу-2 / И. А. Кадников, М. В. Воронин, С. Б. Середенин // Фармакокинетика и фармакодинамика. – 2018. – № 3. – С. 27-30.

15. Кадников, И. А. Цитопротекторное действие афобазола и его основного метаболита М-11 / И. А. Кадников, М. В. Воронин, С. Б. Середенин // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2015. – Т. 159, № 1. – С. 52-55.
16. Кадников, И. А. Анализ роли хинонредуктазы 2 в механизме противопаркинсонического действия афобазола / И. А. Кадников, Д. Н. Воронков, М. В. Воронин, С. Б. Середенин // Нейрохимия. – 2020. – Т. 37, № 2. – С. 173-182.
17. Капица, И. Г. Активность афобазола на экспериментальных моделях болезни Паркинсона / И. Г. Капица, Е. А. Иванова, Е. А. Вальдман, Т. А. Воронина // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2017. – Т. 80, № 6. – С. 3-7.
18. Кукес, В. Г. Клиническая фармакология / под ред. В. Г. Кукеса, Д. А. Сычева – 6-е изд., испр. п доп. – Москва: ГЭОТАР-Медия, 2021. – 1024 с.
19. Мирошниченко, И. И. Влияние бромантана на дофамин- и серотонинергическую систему головного мозга крыс / И. И. Мирошниченко, В. С. Кудрин, С. А. Сергеева [и др.] // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 1995. – Т. 58, № 4. – С. 8-11.
20. Морозов, И. С. Механизмы нейротропного действия бромантана / И. С. Морозов, Г. С. Пухова, Н. А. Авдулов [и др.] // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 1999. – Т. 62, № 1. – С. 11-14.
21. Морозов, И.С. Фармакология адамантанов / Морозов И. С., Петров В. И., Сергеева С. А. – Волгоград: Волгоградская медицинская академия, 2001. – 320 с.
22. Незнамов, Г. Г. Генерализованное тревожное расстройство: сравнительное клиническое исследование нового анксиолитика афобазола с диазепамом / Г. Г. Незнамов, С. А. Сюняков, Д. В. Чумаков [и др.] // Справочник поликлинического врача. – 2006. – № 10. – С. 71-75.

23. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая. / под ред. А.Н. Миронова, Н.Д. Бунятяна, А.Н. Васильева [и др.] – Москва: Гриф и К., 2012. – 944 с.

24. Салимгареева, М. Х. К механизмам действия Ладастена: активация экспрессии генов нейротрофинов и митогенактивируемых киназ / М. Х. Салимгареева, Р. С. Ямиданов, Ю. В. Вахитова, С. Б. Середенин // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2011. – Т. 152, № 9. – С. 281-285.

25. Середенин, С. Б., Фармакогенетическая концепция анксиоселективного эффекта / С. Б. Середенин, Т. А. Воронина, Г. Г. Незнамов // Вестник РАМН. – 1998. – Т. 11. – С. 3-9.

26. Середенин, С. Б. Влияние афобазола на содержание BDNF в структурах мозга инбредных мышей с различным фенотипом эмоционально-стрессовой реакции / С. Б. Середенин, Д. С. Мелкумян, Е. А. Вальдман [и др.] // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2006. – Т. 69, № 3. – С. 3-6.

27. Середенин, С. Б. Доказательство нейропротекторных свойств афобазола на экспериментальной модели фокальной ишемии головного мозга / С. Б. Середенин, О. В. Поварова, О. С. Медведев [и др.] // Новости науки и техники. Серия: Медицина. Психиатрия. – 2007. – № 2. – С. 24.

28. Середенин, С. Б. Фармакокинетика афобазола у крыс / С. Б. Середенин, А. О. Виглинская, Г. Б. Колыванов [и др.] // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2007. – Т. 70, № 2. – С. 59-64.

29. Середенин, С. Б. Нейрорецепторные механизмы действия афобазола / С. Б. Середенин, М. В. Воронин // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2009. – Т. 72, № 1. – С. 3-11.

30. Середенин, С. Б. Нейропротекторные свойства афобазола при экспериментальном моделировании геморрагического инсульта / С. Б. Середенин, В. А. Крайнева // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2009. – Т. 72, № 1. – С. 24-28.

31. Середенин, С. Б. Антидепрессивное действие афобазола в тестах Porsolt и Nomura / С. Б. Середенин, Г. М. Молодавкин, М. В. Воронин, Т. А. Воронина // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2009. – Т. 72, № 1. – С. 19-21
32. Страчунская, Е. Я. Современные подходы к лечению болезни Паркинсона / Е. Я. Страчунская, Н. П. Грибова // РМЖ. – 2017. – Т. 25, № 13. – С. 957-962.
33. Таппахов, А. А. Эпидемиология болезни Паркинсона в мире и в России / А. А. Таппахов, Т. Е. Попова, Т. Я. Николаева [и др.] // Забайкальский медицинский вестник. – 2016. – № 4. – С. 151-159.
34. Ямиданов, Р. С. Протеомный анализ и идентификация белков-мишеней ладастена в головном мозге крыс / Р. С. Ямиданов, М. Х. Салимгареева, С. В. Садовников [и др.] // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2010. – Т. 149, № 6. – С. 717-720.
35. Яркова, М. А. Изучение механизма действия ладастена / М. А. Яркова, М. В. Воронин, С. Б. Середенин // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2005. – Т. 68, № 3. – С. 3-6.
36. Яркова, М. А. Анализ связывающей способности бензодиазепинового участка ГАМК_A рецептора у мышей C57BL/6 и BALB/c при введении анксиолитиков / М. А. Яркова // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2011. – Т. 74, № 8. – С. 3-7.
37. Aarsland, D. Parkinson disease-associated cognitive impairment / D. Aarsland, L. Batzu, G. M. Halliday [et al.] // Nature reviews Disease primers. – 2021. – Vol. 7, № 1. – P. 47.
38. Albin, M. Astrocytes and brain-derived neurotrophic factor (BDNF) / M. Albin, A. Krawczun-Rygmaczewska, F. Cesca // Neuroscience Research. – 2023. – Vol. 197. – P. 42-51.
39. Ali, N. H. BDNF/TrkB activators in Parkinson's disease: A new therapeutic strategy / N. H. Ali, H. M. Al-Kuraishy, A. I. Al-Gareeb [et al.] // Journal of Cellular and Molecular Medicine. – 2024. – Vol. 28, № 10. – P. e18368.

40. Alvarez-Fischer, D. Characterization of the striatal 6-OHDA model of Parkinson's disease in wild type and α -synuclein-deleted mice / D. Alvarez-Fischer, C. Henze, C. Strenzke [et al.] // *Experimental neurology*. – 2008. – Vol. 210, №. 1. – P. 182-193.
41. Alwindi, M. Vesicular monoamine transporter (VMAT) regional expression and roles in pathological conditions / M. Alwindi, A. Bizanti // *Heliyon*. – 2023. – Vol. 9, №. 11. – P. e22413.
42. Angelova, P. R. Role of mitochondrial ROS in the brain: from physiology to neurodegeneration / P. R. Angelova, A. Y. Abramov // *FEBS letters*. – 2018. – Vol. 592, №. 5. – P. 692-702.
43. Araújo, B. Neuroinflammation and Parkinson's disease---from neurodegeneration to therapeutic opportunities / B. Araújo, R. Caridade-Silva, C. Soares-Guedes [et al.] // *Cells*. – 2022. – Vol. 11, №. 18. – P. 2908.
44. Area-Gomez, E. Mitochondria, OxPhos, and neurodegeneration: cells are not just running out of gas / E. Area-Gomez, C. Guardia-Laguarta, E. A. Schon, S. Przedborski // *The Journal of clinical investigation*. – 2019. – Vol. 129, №. 1. – P. 34-45.
45. Arkinson, C. Mechanisms and regulation of substrate degradation by the 26S proteasome / C. Arkinson, K. C. Dong, C. L. Gee, A. Martin // *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. – 2025. – Vol. 26, №. 2. – P. 104-122.
46. Aston-Jones, G. Locus coeruleus: from global projection system to adaptive regulation of behavior / G. Aston-Jones, B. Waterhouse // *Brain research*. – 2016. – Vol. 1645. – P. 75-78.
47. Barrett, P. J. Post-translational modification of α -synuclein in Parkinson's disease / P. J. Barrett, J. T. Greenamyre // *Brain research*. – 2015. – Vol. 1628. – P. 247-253.
48. Bastías-Candia, S. Revisiting the paraquat-induced sporadic Parkinson's disease-like model / S. Bastías-Candia, J. M. Zolezzi, N. C. Inestrosa // *Molecular neurobiology*. – 2019. – Vol. 56, №. 2. – P. 1044-1055.

49. Beauchamp, L. C. Using 18F-AV-133 VMAT2 PET imaging to monitor progressive nigrostriatal degeneration in Parkinson disease / L. C. Beauchamp, V. Dore, V. L. Villemagne [et al.] // *Neurology*. – 2023. – Vol. 101, №. 22. – P. e2314-e2324.
50. Bedford, L. Depletion of 26S proteasomes in mouse brain neurons causes neurodegeneration and Lewy-like inclusions resembling human pale bodies / L. Bedford, D. Hay, A. Devoy [et al.] // *Journal of Neuroscience*. – 2008. – Vol. 28, №. 33. – P. 8189-8198.
51. Behensky, A. A. Afobazole activation of σ -1 receptors modulates neuronal responses to amyloid- β 25--35 / A. A. Behensky, I. E. Yasny, A. M. Shuster [et al.] // *Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. – 2013. – Vol. 347, №. 2. – P. 468-477.
52. Behl, T. Exploring the role of ubiquitin--proteasome system in Parkinson's disease / T. Behl, S. Kumar, Z. M. Althafar [et al.] // *Molecular neurobiology*. – 2022. – Vol. 59, №. 7. – P. 4257-4273.
53. Bej, E. Oxidative stress and neurodegeneration: insights and therapeutic strategies for Parkinson's disease / E. Bej, P. Cesare, A. R. Volpe [et al.] // *Neurology international*. – 2024. – Vol. 16, №. 3. – P. 502-517.
54. Biase, L. D. Levodopa-Induced Dyskinesias in Parkinson's Disease: An Overview on Pathophysiology, Clinical Manifestations, Therapy Management Strategies and Future Directions / L. D. Biase, P. M. Pecoraro, S. P. Carbone [et al.] // *Journal of Clinical Medicine*. – 2023. – Vol. 12, №. 13. – P. 4427.
55. Binde, C. D. Comparative effectiveness of dopamine agonists and monoamine oxidase type-B inhibitors for Parkinson's disease: a multiple treatment comparison meta-analysis / C. D. Binde, I. F. Tvette, J. I. Gåsemyr [et al.] // *European Journal of Clinical Pharmacology*. – 2020. – Vol. 76, №. 12. – P. 1731-1743.
56. Bolam, J. P. Living on the edge with too many mouths to feed: why dopamine neurons die / J. P. Bolam, E. K. Pissadaki // *Movement Disorders*. – 2012. – Vol. 27, №. 12. – P. 1478-1483.

57. Bondarenko, O. Neurotrophic factors in Parkinson's disease: clinical trials, open challenges and nanoparticle-mediated delivery to the brain / O. Bondarenko, M. Saarma // *Frontiers in cellular neuroscience*. – 2021. – Vol. 15. – P. 682597.
58. Boutin, J. A. Is there sufficient evidence that the melatonin binding site MT3 is quinone reductase 2? / J. A. Boutin, G. Ferry // *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. – 2019. – Vol. 368, №. 1. – P. 59-65.
59. Brooks, S. P. Assessment of motor coordination and balance in mice using the rotarod, elevated bridge, and footprint tests / S. P. Brooks, R. C. Trueman, S. B. Dunnett // *Current protocols in mouse biology*. – 2012. – Vol. 2, №. 1. – P. 37-53.
60. Burtscher, J. Fatal attraction--The role of hypoxia when alpha-synuclein gets intimate with mitochondria / J. Burtscher, M. M. K. Syed, M. A. Keller [et al.] // *Neurobiology of aging*. – 2021. – Vol. 107. – P. 128-141.
61. Calabresi, P. Alpha-synuclein in Parkinson's disease and other synucleinopathies: from overt neurodegeneration back to early synaptic dysfunction / P. Calabresi, A. Mechelli, G. Natale [et al.] // *Cell death & disease*. – 2023. – Vol. 14, №. 3. – P. 176.
62. Cardanho-Ramos, C. Mitochondrial biogenesis in neurons: how and where / C. Cardanho-Ramos, V. A. Morais // *International journal of molecular sciences*. – 2021. – Vol. 22, №. 23. – P. 13059.
63. Carli, M. β -cells different vulnerability to the Parkinsonian neurotoxins rotenone, 1-Methyl-4-phenylpyridinium (MPP⁺) and 6-hydroxydopamine (6-OHDA) / M. Carli, F. Vaglini, E. Risaliti [et al.] // *Pharmaceuticals*. – 2021. – Vol. 14, №. 8. – P. 767.
64. Cassagnes, L. E. In cellulo monitoring of quinone reductase activity and reactive oxygen species production during the redox cycling of 1, 2 and 1, 4 quinones / L. E. Cassagnes, P. Perio, G. Ferry [et al.] // *Free Radical Biology and Medicine*. – 2015. – Vol. 89. – P. 126-134.

65. Chakrabarty, R. P. Mitochondria as signaling organelles control mammalian stem cell fate / R. P. Chakrabarty, N. S. Chandel // *Cell stem cell*. – 2021. – Vol. 28, №. 3. – P. 394-408.
66. Chaouhan, H. S. Calycosin alleviates paraquat-induced neurodegeneration by improving mitochondrial functions and regulating autophagy in a drosophila model of Parkinson's disease / H. S. Chaouhan, X. Li, K. T. Sun, I. K. Wang [et al.] // *Antioxidants*. – 2022. – Vol. 11, №. 2. – P. 222.
67. Chen, R. α -Synuclein in Parkinson's disease and advances in detection / R. Chen, X. Gu, X. Wang // *Clinica chimica acta*. – 2022. – Vol. 529. – P. 76-86.
68. Chen, X. T. Efficacy and safety of non-ergot dopamine-receptor agonists as an adjunct to levodopa in advanced Parkinson's disease: A network meta-analysis / X. T. Chen, Q. Zhang, S. Y. Wen [et al.] // *European Journal of Neurology*. – 2023. – Vol. 30, №. 3. – P. 762-773.
69. Chen, Y. SIRT1 protects dopaminergic neurons in Parkinson's disease models via PGC-1 α -mediated mitochondrial biogenesis / Y. Chen, Y. Jiang, Y. Yang [et al.] // *Neurotoxicity Research*. – 2021. – Vol. 39, №. 5. – P. 1393-1404.
70. Cherian, A. Parkinson's disease--genetic cause / A. Cherian, K. P. Divya, A. Vijayaraghavan // *Current opinion in neurology*. – 2023. – Vol. 36, №. 4. – P. 292-301.
71. Chinta, S. J. Dopaminergic neurons / S. J. Chinta, J. K. Andersen // *The international journal of biochemistry & cell biology*. – 2005. – Vol. 37, №. 5. – P. 942-946.
72. Chu, S. Valosin containing protein (VCP): initiator, modifier, and potential drug target for neurodegenerative diseases / S. Chu, X. Xie, C. Payan, U. Stochaj // *Molecular Neurodegeneration*. – 2023. – Vol. 18, №. 52. – P. 1-34.
73. Ciafrè, S. Nerve growth factor in the psychiatric brain / S. Ciafrè, G. Ferraguti, P. Tirassa [et al.] // *Rivista di psichiatria*. – 2020. – Vol. 55, №. 1. – P. 4-15.
74. Conn, P. M. Animal models for the study of human disease / P. M. Conn // *Academic Press*, 2017. – P. 1155.

75. Cramb, K. M. L. Impaired dopamine release in Parkinson's disease / K. M. L. Cramb, D. Beccano-Kelly, S. J. Cragg, R. Wade-Martins // *Brain*. – 2023. – Vol. 146, №. 8. – P. 3117-3132.
76. Cuevas, J. Afobazole modulates microglial function via activation of both σ -1 and σ -2 receptors / J. Cuevas, A. Rodriguez, A. Behensky, C. Katnik // *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. – 2011. – Vol. 339, №. 1. – P. 161-172.
77. Dahlmann, B. Mammalian proteasome subtypes: their diversity in structure and function / B. Dahlmann // *Archives of biochemistry and biophysics*. – 2016. – Vol. 591. – P. 132-140.
78. Dezsi, L. Monoamine Oxidase B Inhibitors in Parkinson's Disease / L. Dezsi, L. Vécsei // *CNS & neurological disorders drug targets*. – 2017. – Vol. 16, №. 4. – P. 425-439.
79. Di Maio, R. α -Synuclein binds to TOM20 and inhibits mitochondrial protein import in Parkinson's disease / R. Di Maio, P. J. Barrett, E. K. Hoffman [et al.] // *Science translational medicine*. – 2016. – Vol. 8, №. 342. – P. 342ra78.
80. Dietz, J. V. Down the iron path: mitochondrial iron homeostasis and beyond / J. V. Dietz, J. L. Fox, O. Khalimonchuk // *Cells*. – 2021. – Vol. 10, №. 9. – P. 2198-2224.
81. Dinis-Oliveira, R. J. Paraquat poisonings: mechanisms of lung toxicity, clinical features, and treatment / R. J. Dinis-Oliveira, J. A. Duarte, A. Sánchez-Navarro [et al.] // *Critical reviews in toxicology*. – 2008. – Vol. 38, №. 1. – P. 13-71.
82. Dolgacheva, L. P. Role of DJ-1 in the mechanism of pathogenesis of Parkinson's disease / L. P. Dolgacheva, A. V. Berezhnov, E. I. Fedotova [et al.] // *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*. – 2019. – Vol. 51, №. 3. – P. 175-188.
83. Dorsey, E. R. Parkinson's disease is predominantly an environmental disease / E. R. Dorsey, B. R. Bloem // *Journal of Parkinson's disease*. – 2024. – Vol. 14, №. 3. – P. 451-465.

84. Emamzadeh, F. N. Alpha-synuclein structure, functions, and interactions / F. N. Emamzadeh // *Journal of Research in Medical Sciences*. – 2016. – Vol. 21, №. 1. – P. 29.
85. Emmanouilidou, E. Cell-produced alpha-synuclein oligomers are targeted to, and impair, the 26S proteasome / E. Emmanouilidou, L. Stefanis, K. Vekrellis // *Neurobiology of aging*. – 2010. – Vol. 31, №. 6. – P. 953-968.
86. Fall, P. A. Survival time, mortality, and cause of death in elderly patients with Parkinson's disease. A 9-year follow-up / P. A. Fall, A. Saleh, M. Fredrickson [et al.] // *Movement disorders: official journal of the Movement Disorder Society*. – 2003. – Vol. 18, №. 11. – P. 1312-1316.
87. Fan, R. Understanding how kinesin motor proteins regulate postsynaptic function in neuron / R. Fan, K. O. Lai // *The FEBS Journal*. – 2022. – Vol. 289, №. 8. – P. 2128-2144.
88. Fares, M. B. Reverse engineering Lewy bodies: how far have we come and how far can we go? / M. B. Fares, S. Jagannath, H. A. Lashuel // *Nature Reviews Neuroscience*. – 2021. – Vol. 22, №. 2. – P. 111-131.
89. Fatima, N. U. Mitochondrial movers and shapers: Recent insights into regulators of fission, fusion and transport / N. U. Fatima, V. Ananthanarayanan // *Current Opinion in Cell Biology*. – 2023. – Vol. 80. – P. 102150.
90. Feng, Y. Immunomodulatory effects of dopamine in inflammatory diseases / Y. Feng, Y. Lu // *Frontiers in immunology*. – 2021. – Vol. 12. – P. 663102.
91. Ferreira, S. A. Microglia response during Parkinson's disease: alpha-synuclein intervention / S. A. Ferreira, M. Romero-Ramos // *Frontiers in cellular neuroscience*. – 2018. – Vol. 12. – P. 247.
92. Foltynie, T. Medical, surgical, and physical treatments for Parkinson's disease / T. Foltynie, V. Bruno, S. Fox [et al.] // *The Lancet*. – 2024. – Vol. 403, №. 10423. – P. 305-324.
93. Ganguly, U. Alpha-synuclein as a biomarker of Parkinson's disease: good, but not good enough / U. Ganguly, S. Singh, S. Pal [et al.] // *Frontiers in aging neuroscience*. – 2021. – Vol. 13. – P. 702639.

94. Gao, S. Mitochondrial fusion: the machineries in and out / S. Gao, J. Hu // *Trends in cell biology*. – 2021. – Vol. 31, №. 1. – P. 62-74.
95. George, S. Microglia affect α -synuclein cell-to-cell transfer in a mouse model of Parkinson's disease / S. George, N. L. Rey, T. Tyson [et al.] // *Molecular neurodegeneration*. – 2019. – Vol. 14, №. 1. – P. 34.
96. Glajch, K. E. Sensorimotor assessment of the unilateral 6-hydroxydopamine mouse model of Parkinson's disease / K. E. Glajch, S. M. Fleming, D. J. Surmeier, P. Osten // *Behavioural brain research*. – 2012. – Vol. 230, №. 2. – P. 309-316.
97. Golbe, L. I. Life expectancy in Parkinson disease / L. I. Golbe, C. E. Leyton // *Neurology*. – 2018. – Vol. 91, №. 22. – P. 991-992.
98. Grealish, S. Characterisation of behavioural and neurodegenerative changes induced by intranigral 6-hydroxydopamine lesions in a mouse model of Parkinson's disease / S. Grealish, B. Mattsson, P. Draxler, A. Björklund // *European Journal of Neuroscience*. – 2010. – Vol. 31, №. 12. – P. 2266-2278.
99. Grekhova, T.V. Effect of bromantane, a new immunostimulating agent with psychostimulating activity, on the release and metabolism of dopamine in the striatum of freely moving rats. A microdialysis study / T.V. Grekhova, R.R. Gainetdinov, T.D. Sotnikova [et al.] // *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. – 1995. – Vol. 119, №. 3. – P. 294-296.
100. Guo, T. N-homocysteinylation of DJ-1 promotes neurodegeneration in Parkinson's disease / T. Guo, L. Zhou, M. Xiong [et al.] // *Aging Cell*. – 2024. – Vol. 23, №. 5. – P. e14124.
101. Hari, V. The relationship between environmental toxins and parkinson's disease / V. Hari // *International Journal of Social Science & Economic Research*. – 2023. – Vol. 8, №. 8. – P. 2453-2458.
102. Ho, D. H. The Multifaceted Role of LRRK2 in Parkinson's Disease / D. H. Ho, S. J. Han, I. Son // *Brain Sciences*. – 2025. – Vol. 15, №. 4. – P. 407.
103. Ibarra-Gutiérrez, M. T. Rotenone-induced model of Parkinson's disease: Beyond mitochondrial complex I inhibition / M. T. Ibarra-Gutiérrez, N.

Serrano-García, M. Orozco-Ibarra // *Molecular neurobiology*. – 2023. – Vol. 60, №. 4. – P. 1929-1948.

104. Ibrahim, A. M. Brain-derived neurotropic factor in neurodegenerative disorders / A. M. Ibrahim, L. Chauhan, A. Bhardwaj [et al.] // *Biomedicines*. – 2022. – Vol. 10, №. 5. – P. 1143.

105. Ingelsson, M. Alpha-synuclein oligomers—neurotoxic molecules in Parkinson's disease and other Lewy body disorders / M. Ingelsson // *Frontiers in neuroscience*. – 2016. – Vol. 10. – P. 408.

106. Ishola, I. O. Novel action of vinpocetine in the prevention of paraquat-induced parkinsonism in mice: involvement of oxidative stress and neuroinflammation / I. O. Ishola, A. A. Akinyede, T. P. Adeluwa, C. Micah // *Metabolic Brain Disease*. – 2018. – Vol. 33, №. 5. – P. 1493-1500.

107. Isik, S. Microglia mediated neuroinflammation in Parkinson's disease / S. Isik, B. Yeman Kiyak, R. Akbayir [et al.] // *Cells*. – 2023. – Vol. 12, №. 7. – P. 1012.

108. Islam, F. Insights into the cellular function and mechanism of action of quinone reductase 2 (NQO2) / F. Islam, B. Shilton // *Biochemical Journal*. – 2025. – Vol. 482, №. 06. – P. 309-324.

109. Janda, E. Polymorphisms and pharmacogenomics of NQO2: the past and the future / E. Janda, J. A. Boutin, C. De Lorenzo, M. Arbitrio // *Genes*. – 2024. – Vol. 15, №. 1. – P. 87.

110. Kalia, L. V. Parkinson's disease / L. V. Kalia, A. E. Lang // *The lancet*. – 2015. – Vol. 386, №. 9996. – P. 896-912.

111. Kamienieva, I. Multitasking guardian of mitochondrial quality: Parkin function and Parkinson's disease / I. Kamienieva, J. Duszyński, J. Szczepanowska // *Translational Neurodegeneration*. – 2021. – Vol. 10, №. 1. – P. 5.

112. Kawahata, I. Degradation of tyrosine hydroxylase by the ubiquitin-proteasome system in the pathogenesis of Parkinson's disease and dopa-responsive dystonia / I. Kawahata, K. Fukunaga // *International journal of molecular sciences*. – 2020. – Vol. 21, №. 11. – P. 3779.

113. Kawabata, K. Trihexyphenidyl, Biperiden, and Other Anticholinergics in the Treatment of Parkinson's Disease / K. Kawabata, M. Katsuno // *NeuroPsychopharmacotherapy*. – Cham: Springer International Publishing, 2022. – P. 3333-3340.
114. Kestenbaum, M. Clinical features of LRRK2 carriers with Parkinson's disease / M. Kestenbaum, R. N. Alcalay // *Leucine-Rich Repeat Kinase 2 (LRRK2)*. – 2017. – P. 31-48.
115. Khalili Samani, S. The Effect of Memantine on the Expression of Dopamine Receptors in the Striatum of Male Rats With Morphine Addiction / S. Khalili Samani, S. Khalifeh, M. Vahiddastjerdi [et al.] // *Qom Univ Med Sci J*. – 2023. – Vol. 17. – P. E1340.
116. Kim, Y. Targeted protein degradation: principles and applications of the proteasome / Y. Kim, E. K. Kim, Y. Chey [et al.] // *Cells*. – 2023. – Vol. 12, №. 14. – P. 1846.
117. Klingelhofer, L. Parkinson's disease as a multisystem disorder / L. Klingelhofer, H. Reichmann // *Journal of Neural Transmission*. – 2017. – Vol. 124, №. 6. – P. 709-713.
118. Ku, M. Exploring the prescribing trends and factors affecting initial anti-parkinsonian drug selection in Korea: A nationwide population-based cohort study / M. Ku, N. K. Je // *Journal of Clinical Neuroscience*. – 2023. – Vol. 116. – P. 60-66.
119. Kumaresan, M. Spectrum of non-motor symptoms in Parkinson's disease / M. Kumaresan, S. Khan // *Cureus*. – 2021. – Vol. 13, №. 2.
120. Kurisu, J. Cellular proteostasis in neurodegeneration / J. Kurisu, J. M. Rosen, K. S. Willis [et al.] // *Molecular neurobiology*. – 2019. – Vol. 56, №. 5. – P. 3676-3689.
121. Latif, S. Dopamine in Parkinson's disease / S. Latif, M. Jahangeer, D. M. Razia [et al.] // *Clinica chimica acta*. – 2021. – Vol. 522. – P. 114-126.

122. Lee, T. K. A review on Parkinson's disease treatment / T. K. Lee, E. L. Yankee // *Neuroimmunology and Neuroinflammation*. – 2021. – Vol. 8. – P. 222-244.
123. Lehtonen, Š. Dysfunction of cellular proteostasis in Parkinson's disease / Š. Lehtonen, T. M. Sonninen, S. Wojciechowski [et al.] // *Frontiers in neuroscience*. – 2019. – Vol. 13. – P. 457.
124. Li, H. Targeting mitochondrial complex I deficiency in MPP+/MPTP-induced parkinson's disease cell culture and mouse models by transducing yeast NDI1 gene / H. Li, J. Zhang, Y. Shen [et al.] // *Biological Procedures Online*. – 2024. – Vol. 26, №. 1. – P. 9.
125. Li, S. A crazy trio in Parkinson's disease: metabolism alteration, α -synuclein aggregation, and oxidative stress / S. Li, Y. Liu, S. Lu [et al.] // *Molecular and cellular biochemistry*. – 2025. – Vol. 480, №. 1. – P. 139-157.
126. Li, W. Selective autophagy of intracellular organelles: recent research advances / W. Li, P. He, Y. Huang [et al.] // *Theranostics*. – 2021. – Vol. 11, №. 1. – P. 222.
127. Liang, B. Striatal direct pathway neurons play leading roles in accelerating rotarod motor skill learning / B. Liang, L. Zhang, Y. Zhang [et al.] // *Iscience*. – 2022. – Vol. 25, №. 5.
128. Lill, C. M. Genetics of Parkinson's disease / C. M. Lill // *Molecular and cellular probes*. – 2016. – Vol. 30, №. 6. – P. 386-396.
129. Lin, M. Y. Regulation of mitochondrial transport in neurons / M. Y. Lin, Z. H. Sheng // *Experimental cell research*. – 2015. – Vol. 334, №. 1. – P. 35-44.
130. Lindersson, E. Proteasomal inhibition by alpha-synuclein filaments and oligomers / E. Lindersson, R. Beedholm, P. Højrup [et al.] // *Journal of Biological Chemistry*. – 2004. – Vol. 279, №. 13. – P. 12924-12934.
131. Liu, C. Mechanisms and regulation of dopamine release / C. Liu, P. S. Kaeser // *Current opinion in neurobiology*. – 2019. – Vol. 57. – P. 46-53.
132. Liu, J. Mitophagy in Parkinson's disease: from pathogenesis to treatment / J. Liu, W. Liu, R. Li, H. Yang // *Cells*. – 2019. – Vol. 8, №. 7. – P. 712.

133. Liu, L. Loss of DJ-1 function contributes to Parkinson's disease pathogenesis in mice via RACK1-mediated PKC activation and MAO-B upregulation / L. Liu, Y. Han, Z. J. Zhang [et al.] // *Acta Pharmacologica Sinica*. – 2023. – Vol. 44, №. 10. – P. 1948-1961.

134. Lizaveta, I. B. Sigma Receptors: Literature Review / I.B. Lizaveta, M.A. Lychkovskaya, I.A. Kudyan, M. G. Kudyan // *Acta Scientific Clinical Case Reports*. – 2022. – Vol. 3, №. 9. – P. 29-35.

135. Lopez, A. A new zebrafish model to measure neuronal α -Synuclein clearance in vivo / A. Lopez, A. Gorb, N. Palha [et al.] // *Genes*. – 2022. – Vol. 13, №. 5. – P. 868.

136. Lu, M. Metformin prevents dopaminergic neuron death in MPTP/P-induced mouse model of Parkinson's disease via autophagy and mitochondrial ROS clearance / M. Lu, C. Su, C. Qiao [et al.] // *International Journal of Neuropsychopharmacology*. – 2016. – Vol. 19, №. 9. – P. pyw047.

137. Lubben, N. LRRK2 kinase inhibition reverses G2019S mutation-dependent effects on tau pathology progression / N. Lubben, J. K. Brynildsen, C. M. Webb [et al.] // *Translational neurodegeneration*. – 2024. – Vol. 13, №. 1. – P. 13.

138. Magno, L. A. V. Cylinder Test to Assess Sensory-motor Function in a Mouse Model of Parkinson's Disease / L. A. V. Magno, M. Collodetti, H. Tenza-Ferrer, M. A. Romano-Silva // *Bio Protoc*. – 2019. – Vol. 9, №. 16. – P. e3337.

139. Manouchehrabadi, M. Carvacrol Protects Against 6-Hydroxydopamine-Induced Neurotoxicity in In Vivo and In Vitro Models of Parkinson's Disease / M. Manouchehrabadi, M. Farhadi, Z. Azizi, A. Torkaman-Boutorabi // *Neurotoxicity Research*. – 2020. – Vol. 37, №. 1. – P. 156-170.

140. Martel, J. C. Dopamine receptor subtypes, physiology and pharmacology: new ligands and concepts in schizophrenia / J. C. Martel, S. Gatti McArthur // *Frontiers in pharmacology*. – 2020. – Vol. 11. – P. 1003.

141. Mastinu, A. Protective effects of *Gynostemma pentaphyllum* (var. *Ginpent*) against lipopolysaccharide-induced inflammation and motor alteration in

mice / A. Mastinu, S. A. Bonini, M. Premoli [et al.] // *Molecules*. – 2021. – Vol. 26, №. 3. – P. 570.

142. McKinnon, C. Early-onset impairment of the ubiquitin-proteasome system in dopaminergic neurons caused by alpha-synuclein / C. McKinnon, M. L. De Snoo, E. Gondard [et al.] // *Acta neuropathologica communications*. – 2020. – Vol. 8, №. 1. – P. 1-16.

143. McKnight, S. Toxin-induced parkinsonism / S. McKnight, N. Hack // *Neurologic clinics*. – 2020. – Vol. 38, №. 4. – P. 853-865.

144. McNaught, K. S. Systemic exposure to proteasome inhibitors causes a progressive model of Parkinson's disease / K. S. McNaught, D. P. Perl, A.L. Brownell, C. W. Olanow // *Annals of neurology*. – 2004. – Vol. 56, №. 1. – P. 149-162.

145. Meiser, J. Complexity of dopamine metabolism / J. Meiser, D. Weindl, K. Hiller // *Cell Communication and Signaling*. – 2013. – Vol. 11, №. 1. – P. 34.

146. Merino-Galán, L. Striatal synaptic bioenergetic and autophagic decline in premotor experimental parkinsonism / L. Merino-Galán, H. Jimenez-Urbieta, M. Zamarride [et al.] // *Brain*. – 2022. – Vol. 145, №. 6. – P. 2092-2107.

147. Mikhaylova, M. The effects of ladasten on dopaminergic neurotransmission and hippocampal synaptic plasticity in rats / M. Mikhaylova, J. V. Vakhitova, R. S. Yamidanov [et al.] // *Neuropharmacology*. – 2007. – Vol. 53, №. 5. – P. 601-608.

148. Misgeld, T. Mitostasis in neurons: maintaining mitochondria in an extended cellular architecture / T. Misgeld, T. L. Schwarz // *Neuron*. – 2017. – Vol. 96, №. 3. – P. 651-666.

149. Miyazaki, I. Neuron-astrocyte interactions in Parkinson's disease / I. Miyazaki, M. Asanuma // *Cells*. – 2020. – Vol. 9, №. 12. – P. 2623.

150. Morató, X. Development of a novel $\sigma 1$ receptor biosensor based on its heterodimerization with binding immunoglobulin protein in living cells / X. Morató, V. Fernández-Dueñas, P. Pérez-Villamor [et al.] // *ACS Chemical Neuroscience*. – 2023. – Vol. 14, №. 11. – P. 2201-2207.

151. Morris, H. R. The pathogenesis of Parkinson's disease / H. R. Morris, M. G. Spillantini, C. M. Sue, C. H. Williams-Gray // *The Lancet*. – 2024. – Vol. 403, №. 10423. – P. 293-304.
152. Mu, L. Comparative safety signals of dopamine agonists: psychiatric and cardiovascular risks derived from FDA adverse event reporting system (FAERS) data / L. Mu, J. Xu, X. Ye [et al.] // *BMC Pharmacology and Toxicology*. – 2025. – Vol. 26, №. 1. – P. 54.
153. Müller, T. Catechol-O-methyltransferase inhibitors in Parkinson's disease / T. Müller // *Drugs*. – 2015. – Vol. 75, №. 2. – P. 157-174.
154. Müller, T. What are the main considerations when prescribing pharmacotherapy for Parkinson's disease? / T. Müller // *Expert Opin Pharmacother*. – 2022. – Vol. 23, №. 7. – P. 745-750.
155. Mustapha, M. MPTP-induced mouse model of Parkinson's disease: A promising direction for therapeutic strategies / M. Mustapha, C. N. M. Taib // *Bosnian journal of basic medical sciences*. – 2021. – Vol. 21, №. 4. – P. 422.
156. Narendra, D. P. The role of PINK1–Parkin in mitochondrial quality control / D. P. Narendra, R. J. Youle // *Nature cell biology*. – 2024. – Vol. 26, №. 10. – P. 1639-1651.
157. Naskar, A. Structural insight into G2019S mutated LRRK2 kinase and brain-penetrant type I inhibitor complex: a molecular dynamics approach / A. Naskar, K. K. Bhanja, R. K. Roy, N. Patra // *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*. – 2024. – Vol. 42, №. 19. – P. 10129-10149.
158. Negi, S. The misfolding mystery: α -synuclein and the pathogenesis of Parkinson's disease / S. Negi, N. Khurana, N. Duggal // *Neurochemistry international*. – 2024. – Vol. 177. – P. 105760.
159. Nikolaus, S. Differential effects of D-cycloserine and amantadine on motor behavior and D2/3 receptor binding in the nigrostriatal and mesolimbic system of the adult rat / S. Nikolaus, H. J. Wittsack, F. Wickrath // *Scientific Reports*. – 2019. – Vol. 9, №. 1. – P. 16128.

160. Ninkina, N. β -synuclein potentiates synaptic vesicle dopamine uptake and rescues dopaminergic neurons from MPTP-induced death in the absence of other synucleins / N. Ninkina, S. J. Millership, O. M. Peters [et al.] // *Journal of Biological Chemistry*. – 2021. – Vol. 297, №. 6. – P. 101375.
161. Ortiz, G. G. Physiology and pathology of neuroimmunology: Role of inflammation in parkinson's disease / G. G. Ortiz, H. González-Usigli, F. P. Pacheco-Moisés [et al.] // *Physiology and Pathology of Immunology*. – IntechOpen, 2017.
162. Pahwa, R. Amantadine extended release for levodopa-induced dyskinesia in Parkinson's disease (EASED Study) / R. Pahwa, C. M. Tanner, R. A. Hauser // *Movement Disorders*. – 2015. – Vol. 30, №. 6. – P. 788-795.
163. Pan, Z. N. LRRK2 regulates actin assembly for spindle migration and mitochondrial function in mouse oocyte meiosis / Z. N. Pan, J. C. Liu, J. Q. Ju [et al.] // *Journal of Molecular Cell Biology*. – 2022. – Vol. 14, №. 1. – P. mjab079.
164. Paxinos, G. Paxinos and Franklin's the mouse brain in stereotaxic coordinates / G. Paxinos, K. B. J. Franklin // *Academic press*, 2019 – 376 P.
165. Pickrell, A. M. The roles of PINK1, parkin, and mitochondrial fidelity in Parkinson's disease / A. M. Pickrell, R. J. Youle // *Neuron*. – 2015. – Vol. 85, №. 2. – P. 257-273.
166. Piechal, A. Sigma receptors and neurological disorders / A. Piechal, A. Jakimiuk, D. Mirowska-Guzel // *Pharmacological Reports*. – 2021. – Vol. 73, №. 6. – P. 1582-1594.
167. Pla-Prats, C. Quality control of protein complex assembly by the ubiquitin–proteasome system / C. Pla-Prats, N. H. Thomä // *Trends in cell biology*. – 2022. – Vol. 32, №. 8. – P. 696-706.
168. Poortvliet, P. C. The Queensland Parkinson's Project: an overview of 20 years of mortality from Parkinson's disease / P. C. Poortvliet, A. Gluch, P. A. Silburn, G. D. Mellick // *Journal of Movement Disorders*. – 2020. – Vol. 14, №. 1. – P. 34.
169. Portz, P. Changes in Drp1 function and mitochondrial morphology are associated with the α -synuclein pathology in a transgenic mouse model of Parkinson's disease / P. Portz, M. K. Lee // *Cells*. – 2021. – Vol. 10, №. 4. – P. 885.

170. Pozo Devoto, V. M. α Synuclein control of mitochondrial homeostasis in human-derived neurons is disrupted by mutations associated with Parkinson's disease / V. M. Pozo Devoto, N. Dimopoulos, M. Alloatti [et al.] // *Scientific reports*. – 2017. – Vol. 7, №. 1. – P. 5042.
171. Prasad, E. M. Behavioral tests in neurotoxin-induced animal models of Parkinson's disease / E. M. Prasad, S. Y. Hung // *Antioxidants*. – 2020. – Vol. 9, №. 10. – P. 1007.
172. Przedborski, S. The parkinsonian toxin MPTP: action and mechanism / S. Przedborski, V. Jackson-Lewis, R. Djaldetti [et al.] // *Restorative neurology and neuroscience*. – 2000. – Vol. 16, №. 2. – P. 135-142.
173. Qi-Lytle, X. Current review of the function and regulation of tuberoinfundibular dopamine neurons / X. Qi-Lytle, S. Sayers, E. J. Wagner // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2023. – Vol. 25, №. 1. – P. 110.
174. Qiu, H. Levodopa-induced motor complications associated with benserazide and carbidopa in Parkinson's disease: a disproportionality analysis of the FAERS database / H. Qiu, C. Liu, Z. Wang // *Frontiers in Pharmacology*. – 2025. – Vol. 16. – P. 1529932.
175. Qu, Y. A systematic review and meta-analysis of inflammatory biomarkers in Parkinson's disease / Y. Qu, J. Li, Q. Qin [et al.] // *npj Parkinson's Disease*. – 2023. – Vol. 9, №. 1. – P. 18.
176. Rafe, M. R. Targeting NMDA receptors with an antagonist is a promising therapeutic strategy for treating neurological disorders / M. R. Rafe, P. Saha, S. T. Bello // *Behavioural Brain Research*. – 2024. – Vol. 472. – P. 115173.
177. Raffeiner, M. Interplay between autophagy and proteasome during protein turnover / M. Raffeiner, S. Zhu, M. González-Fuente, S. Üstün // *Trends in plant science*. – 2023. – Vol. 28, №. 6. – P. 698-714.
178. Rajput, A. H. Baseline motor findings and Parkinson disease prognostic subtypes / A. H. Rajput, M. L. Rajput, L. W. Ferguson, A. Rajput // *Neurology*. – 2017. – Vol. 89, №. 2. – P. 138-143.

179. Rascol, O. Amantadine in the treatment of Parkinson's disease and other movement disorders / O. Rascol, M. Fabbri, W. Poewe // *The Lancet Neurology*. – 2021. – Vol. 20, №. 12. – P. 1048-1056.
180. Rasool, A. Oxidative stress and dopaminergic metabolism: a major PD pathogenic mechanism and basis of potential antioxidant therapies / A. Rasool, R. Manzoor, K. Ullah [et al.] // *CNS & Neurological Disorders-Drug Targets*. – 2024. – Vol. 23, №. 7. – P. 852-864.
181. Regensburger, M. Clinical benefit of MAO-B and COMT inhibition in Parkinson's disease: Practical considerations / M. Regensburger, C. W. Ip, Z. Kohl [et al.] // *Journal of Neural Transmission*. – 2023. – Vol. 130, №. 6. – P. 847-861.
182. Riederer, P. Levodopa treatment: impacts and mechanisms throughout Parkinson's disease progression / P. Riederer, S. Strobel, T. Nagatsu [et al.] // *Journal of Neural Transmission*. – 2025. – P. 1-37.
183. Risiglione, P. Alpha-synuclein and mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease: the emerging role of VDAC / P. Risiglione, F. Zinghirino, M. C. Di Rosa [et al.] // *Biomolecules*. – 2021. – Vol. 11, №. 5. – P. 718.
184. Rudyk, C. Chronic unpredictable stress influenced the behavioral but not the neurodegenerative impact of paraquat / C. Rudyk, Z. Dwyer, J. McNeill [et al.] // *Neurobiology of stress*. – 2019. – Vol. 11. – P. 100179.
185. Sahoo, S. Role of ubiquitin–proteasome and autophagy-lysosome pathways in α -synuclein aggregate clearance / S. Sahoo, A. A. Padhy, V. Kumari, P. Mishra // *Molecular Neurobiology*. – 2022. – Vol. 59, №. 9. – P. 5379-5407.
186. Saini, N. Motor and non-motor symptoms, drugs, and their mode of action in Parkinson's disease (PD): a review / N. Saini, N. Singh, N. Kaur [et al.] // *Medicinal Chemistry Research*. – 2024. – Vol. 33, №. 4. – P. 580-599.
187. Sampaio, T. F. MAO-B and COMT genetic variations associated with levodopa treatment response in patients with Parkinson's disease / T. F. Sampaio, E. U. D. Dos Santos, G. D. C. de Lima [et al.] // *The Journal of Clinical Pharmacology*. – 2018. – Vol. 58, №. 7. – P. 920-926.

188. Santoro, M. Mapping of catecholaminergic denervation, neurodegeneration, and inflammation in 6-OHDA-treated Parkinson's disease mice / M. Santoro, R. K. Lam, S. E. Blumenfeld [et al.] // *npj Parkinson's Disease*. – 2025. – Vol. 11, №. 1. – P. 28.
189. Schildknecht, S. Tipping points and endogenous determinants of nigrostriatal degeneration by MPTP / S. Schildknecht, D. A. Di Monte, R. Pape [et al.] // *Trends in Pharmacological Sciences*. – 2017. – Vol. 38, №. 6. – P. 541-555.
190. See, W. Z. C. Paraquat and Parkinson's disease: The molecular crosstalk of upstream signal transduction pathways leading to apoptosis / W. Z. C. See, R. Naidu, K. San Tang // *Current Neuropharmacology*. – 2024. – Vol. 22, №. 1. – P. 140-151.
191. Seredenin, S. B. Analysis of bromantane pharmacological spectrum / S. B. Seredenin, A. G. Miramedova // *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. – 1999. – Vol. 128, №. 5. – P. 1116-1118.
192. Seredenin, S. B. The effect of bromantan on the behavior of mice of inbred strains with different phenotypes of emotional-stress reaction / S. B. Seredenin, A. G. Miramedova, M. M. Kozlovskaja // *Experimental and Clinical Pharmacology*. – 1999. – Vol. 62, №. 3. – P. 3-6.
193. Shao, M. Oxyphylla A exerts antiparkinsonian effects by ameliorating 6-OHDA-induced mitochondrial dysfunction and dyskinesia in vitro and in vivo / M. Shao, C. Zhao, Z. Pan [et al.] // *Chemico-Biological Interactions*. – 2024. – Vol. 403. – P. 111224.
194. Sharma, M. α -Synuclein in synaptic function and dysfunction / M. Sharma, J. Burré // *Trends in neurosciences*. – 2023. – Vol. 46, №. 2. – P. 153-166.
195. Sharma, P. Paraquat (herbicide) as a cause of Parkinson's Disease / P. Sharma, P. Mittal // *Parkinsonism & Related Disorders*. – 2024. – Vol. 119. – P. 105932.
196. Shen, J. α -Synuclein amino terminus regulates mitochondrial membrane permeability / J. Shen, T. Du, X. Wang [et al.] // *Brain research*. – 2014. – Vol. 1591. – P. 14-26.

197. Shokr, M. M. Sigma 1 Receptor and Its Pivotal Role in Neurological Disorders / M. M. Shokr, G. A. Badawi, S. M. Elshazly [et al.] // ACS Pharmacology & Translational Science. – 2024. – Vol. 8, №. 1. – P. 47-65.

198. Siddiqui, T. Targeting sigma-1 receptor: a promising strategy in the treatment of Parkinson's disease / T. Siddiqui, L. K. Bhatt // Neurochemical research. – 2023. – Vol. 48, №. 10. – P. 2925-2935.

199. Silva, A. B. R. L. Premotor, nonmotor and motor symptoms of Parkinson's disease: a new clinical state of the art / A. B. R. L. Silva, R. W. G. de Oliveira, G. P. Diógenes [et al.] // Ageing research reviews. – 2023. – Vol. 84. – P. 101834.

200. Silva-Reis, S. C. Stapling amantadine to melanostatin neuropeptide: Discovery of potent positive allosteric modulators of the D2 receptors / S. C. Silva-Reis, X. C. Correia, H. F. Costa-Almeida [et al.] // ACS Medicinal Chemistry Letters. – 2023. – Vol. 14, №. 12. – P. 1656-1663.

201. Simon, D. K. Parkinson disease epidemiology, pathology, genetics, and pathophysiology / D. K. Simon, C. M. Tanner, P. Brundin // Clinics in geriatric medicine. – 2020. – Vol. 36, №. 1. – P. 1-12.

202. Skou, L. D. Pathogenesis of DJ-1/PARK7-mediated Parkinson's disease / L. D. Skou, S. K. Johansen, J. Okarmus, M. Meyer // Cells. – 2024. – Vol. 13, №. 4. – P. 296.

203. Snyder, H. Aggregated and monomeric alpha-synuclein bind to the S6 proteasomal protein and inhibit proteasomal function / H. Snyder, K. Mensah, C. Theisler [et al.] // Journal of Biological Chemistry. – 2003. – Vol. 278, №. 14. – P. 11753-11759.

204. Sohrabi, T. Common mechanisms underlying α -synuclein-induced mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease / T. Sohrabi, B. Mirzaei-Behbahani, R. Zadali [et al.] // Journal of molecular biology. – 2023. – Vol. 435, №. 12. – P. 167992.

205. Sonninen, T. M. Metabolic alterations in Parkinson's disease astrocytes / T. M. Sonninen, R. H. Hämäläinen, M. Koskivi [et al.] // *Scientific reports*. – 2020. – Vol. 10, №. 1. – P. 14474.
206. Speranza, L. Dopamine: the neuromodulator of long-term synaptic plasticity, reward and movement control / L. Speranza, U. Di Porzio, D. Viggiano [et al.] // *Cells*. – 2021. – Vol. 10, №. 4. – P. 735.
207. Stauch, K. L. Longitudinal in vivo metabolic labeling reveals tissue-specific mitochondrial proteome turnover rates and proteins selectively altered by parkin deficiency / K. L. Stauch, S. Totusek, A. J. Trease [et al.] // *Scientific reports*. – 2023. – Vol. 13, №. 1. – P. 11414.
208. Stefanis, L. Expression of A53T mutant but not wild-type alpha-synuclein in PC12 cells induces alterations of the ubiquitin-dependent degradation system, loss of dopamine release, and autophagic cell death / L. Stefanis, K. E. Larsen, H. J. Rideout [et al.] // *Journal of Neuroscience*. – 2001. – Vol. 21, №. 24. – P. 9549-9560.
209. Stefanis, L. How is alpha-synuclein cleared from the cell? / L. Stefanis, E. Emmanouilidou, M. Pantazopoulou [et al.] // *Journal of neurochemistry*. – 2019. – Vol. 150, №. 5. – P. 577-590.
210. Stoker, T. B. Recent developments in the treatment of Parkinson's Disease / T. B. Stoker, R. A. Barker // *F1000Research*. – 2020. – Vol. 9. – P. F1000 Faculty Rev-862.
211. Subburaju, S. The high affinity dopamine D2 receptor agonist MCL-536: a new tool for studying dopaminergic contribution to neurological disorders / S. Subburaju, A. W. Sromek, P. Seeman // *ACS chemical neuroscience*. – 2021. – Vol. 12, №. 8. – P. 1428-1437.
212. Takahashi, S. Neuroprotection and disease modification by astrocytes and microglia in Parkinson disease / S. Takahashi, K. Mashima // *Antioxidants*. – 2022. – Vol. 11, №. 1. – P. 170.
213. Tanaka, Y. Inducible expression of mutant alpha-synuclein decreases proteasome activity and increases sensitivity to mitochondria-dependent apoptosis /

Y. Tanaka, S. Engelender, S. Igarashi [et al.] // *Human molecular genetics*. – 2001. – Vol. 10, №. 9. – P. 919-926.

214. Tao, J. Hsp70 chaperone blocks α -synuclein oligomer formation via a novel engagement mechanism / J. Tao, A. Berthet, Y. R. Citron [et al.] // *Journal of Biological Chemistry*. – 2021. – Vol. 296. – P. 100613.

215. Tashiro, Y. Motor neuron-specific disruption of proteasomes, but not autophagy, replicates amyotrophic lateral sclerosis / Y. Tashiro, M. Urushitani, H. Inoue [et al.] // *Journal of Biological Chemistry*. – 2012. – Vol. 287, №. 51. – P. 42984-42994.

216. Trigo, D. Mitochondria, energy, and metabolism in neuronal health and disease / D. Trigo, C. Avelar, M. Fernandes [et al.] // *FEBS letters*. – 2022. – Vol. 596, №. 9. – P. 1095-1110.

217. Troncoso-Escudero, P. Outside in: Unraveling the Role of Neuroinflammation in the Progression of Parkinson's Disease / P. Troncoso-Escudero, A. Parra, M. Nassif, R. L. Vidal // *Frontiers in neurology*. – 2018. – Vol. 9. – P. 860.

218. Tysnes, O. B. Epidemiology of Parkinson's disease / O. B. Tysnes, A. Storstein // *Journal of neural transmission*. – 2017. – Vol. 124, №. 8. – P. 901-905.

219. Valdman, E. Evolution of anti-parkinsonian activity of monoterpenoid (1R, 2R, 6S)-3-methyl-6-(prop-1-en-2-yl) cyclohex-3-ene-1, 2-diol in various in vivo models / E. Valdman, I. Kapitsa, E. Ivanova [et al.] // *European Journal of Pharmacology*. – 2017. – Vol. 815. – P. 351-363.

220. Van der Merwe, C. Evidence for a common biological pathway linking three Parkinson's disease-causing genes: parkin, PINK1 and DJ-1 / C. Van der Merwe, Z. Jalali Sefid Dashti, A. Christoffels [et al.] // *European Journal of Neuroscience*. – 2015. – Vol. 41, №. 9. – P. 1113-1125.

221. Vázquez-Vélez, G. E. Parkinson's disease genetics and pathophysiology / G. E. Vázquez-Vélez, H. Y. Zoghbi // *Annual review of neuroscience*. – 2021. – Vol. 44, №. 1. – P. 87-108.

222. Vizziello, M. Disruption of mitochondrial homeostasis: The role of PINK1 in Parkinson's disease / M. Vizziello, L. Borellini, G. Franco, G. Ardolino // *Cells*. – 2021. – Vol. 10, №. 11. – P. 3022.
223. Voronin, M. V. Neuroprotective properties of Quinone reductase 2 inhibitor M-11, a 2-Mercaptobenzimidazole derivative / M. V. Voronin, I. A. Kadnikov, L. F. Zainullina [et al.] // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2021. – Vol. 22, №. 23. – P. 13061.
224. Voronin, M. V. Contribution of Sigma-1 receptor to cytoprotective effect of afobazole / M. V. Voronin, I. A. Kadnikov // *Pharmacology research & perspectives*. – 2016. – Vol. 4, №. 6. – P. e00273.
225. Voronin, M. V. Chaperone Sigma1R mediates the neuroprotective action of afobazole in the 6-OHDA model of Parkinson's disease / M. V. Voronin, I. A. Kadnikov, D. N. Voronkov, S. B. Seredenin // *Scientific reports*. – 2019. – Vol. 9, №. 1. – P. 17020.
226. Wallings, R. Cellular processes associated with LRRK 2 function and dysfunction / R. Wallings, C. Manzoni, R. Bandopadhyay // *The FEBS journal*. – 2015. – Vol. 282, №. 15. – P. 2806-2826.
227. Walters, G. C. Mitochondrial calcium cycling in neuronal function and neurodegeneration / G. C. Walters, Y. M. Usachev // *Frontiers in cell and developmental biology*. – 2023. – Vol. 11. – P. 1094356.
228. Wang, K. Paraquat inhibits autophagy via intensifying the interaction between HMGB1 and α -synuclein / K. Wang, B. Zhang, B. Zhang [et al.] // *Neurotoxicity Research*. – 2022. – Vol. 40, №. 2. – P. 520-529.
229. Waschbüsch, D. Dual arginine recognition of LRRK2 phosphorylated Rab GTPases / D. Waschbüsch, E. Purlyte, A. R. Khan // *Biophysical journal*. – 2021. – Vol. 120, №. 9. – P. 1846-1855.
230. Wilkaniec, A. Exogenous alpha-synuclein evoked parkin downregulation promotes mitochondrial dysfunction in neuronal cells. implications for Parkinson's disease pathology / A. Wilkaniec, A. M. Lenkiewicz, L. Babiec [et al.] // *Frontiers in Aging Neuroscience*. – 2021. – Vol. 13. – P. 591475.

231. Williams-Gray, C. H. The CamPaIGN study of Parkinson's disease: 10-year outlook in an incident population-based cohort / C. H. Williams-Gray, S. L. Mason, J. R. Evans [et al.] // *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*. – 2013. – Vol. 84, №. 11. – P. 1258-1264.
232. Wei, X. Contra-directional coupling of Nur77 and Nurr1 in neurodegeneration: a novel mechanism for memantine-induced anti-inflammation and anti-mitochondrial impairment / X. Wei, H. Gao, J. Zou // *Molecular neurobiology*. – 2016. – Vol. 53, №. 9. – P. 5876-5892.
233. Wu, H. M. Novel neuroprotective mechanisms of memantine: increase in neurotrophic factor release from astroglia and anti-inflammation by preventing microglial activation / H. M. Wu, N. S. Tzeng, L. Qian [et al.] // *Neuropsychopharmacology*. – 2009. – Vol. 34, №. 10. – P. 2344-2357.
234. Xiao, J. Thirty years of BDNF study in central myelination: From biology to therapy / J. Xiao // *Journal of Neurochemistry*. – 2023. – Vol. 167, №. 3. – P. 321-336.
235. Yaish, T. R. Innovative care protocol successfully rehabilitates non-human primates after MPTP-induced parkinsonism: Preliminary evidence from a restricted cohort of African Green Monkeys (*Chlorocebus sabaeus*) / T. R. Yaish, N. E. Noy, R. Kalman [et al.] // *Laboratory animals*. – 2025. – P. 236772241302576.
236. Yamidanov, R. S. Proteomic analysis and identification of ladasten target proteins in rat brain / R. S. Yamidanov, M. K. Salimgareeva, S. V. Sadovnikov [et al.] // *Bulletin of experimental biology and medicine*. – 2010. – Vol. 149, №. 6. – P. 775-779.
237. Yiğit, E. N. Validation of an in-vitro Parkinson's disease model for the study of neuroprotection / E. N. Yiğit, E. Sönmez, M. S. Söğüt [et al.] // *Proceedings*. – MDPI, 2018. – Vol. 2, №. 25. – P. 1559.
238. Yin, Y. Association of COMT rs4680 and MAO-B rs1799836 polymorphisms with levodopa-induced dyskinesia in Parkinson's disease—a meta-analysis / Y. Yin, Y. Liu, M. Xu [et al.] // *Neurological Sciences*. – 2021. – Vol. 42, №. 10. – P. 4085-4094.

239. Zagare, A. Omics data integration suggests a potential idiopathic Parkinson's disease signature / A. Zagare, G. Preciat, S. L. Nickels [et al.] // *Communications Biology*. – 2023. – Vol. 6, №. 1. – P. 1179.
240. Zampese, E. Ca²⁺ channels couple spiking to mitochondrial metabolism in substantia nigra dopaminergic neurons / E. Zampese, D. L. Wokosin, P. Gonzalez-Rodriguez [et al.] // *Science Advances*. – 2022. – Vol. 8, №. 39. – P. eabp8701.
241. Zhao, A. Neuronal DJ-1 regulates microglial activation in Parkinson's disease / A. Zhao, Y. Ding, M. Zhong [et al.] // *Neural Regeneration Research*. – 2025. – P. 10.4103.
242. Zhao, Z. Linking heat shock protein 70 and parkin in Parkinson's disease / Z. Zhao, Z. Li, F. Du [et al.] // *Molecular Neurobiology*. – 2023. – Vol. 60, №. 12. – P. 7044-7059.
243. Zhong, H. Subtle behavioral alterations in the spontaneous behaviors of MPTP mouse model of Parkinson's disease / H. Zhong, K. Lu, L. Wang [et al.] // *Translational Psychiatry*. – 2025. – Vol. 15, №. 1. – P. 119.
244. Zhou, Z. D. Role of dopamine in the pathophysiology of Parkinson's disease / Z. D. Zhou, L. X. Yi, D. Q. Wang [et al.] // *Translational neurodegeneration*. – 2023. – Vol. 12, №. 1. – P. 44.