

На правах рукописи

Градинарь Мария Михайловна

**Нейропротекторная роль гликопротеина-Р и его функционирование при
экспериментальном паркинсоническом синдроме**

1.5.4. Биохимия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Рязань – 2024

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Рязанский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научный руководитель:

доктор медицинских наук, доцент
Щулькин Алексей Владимирович

Официальные оппоненты:

Маслюков Петр Михайлович, доктор медицинских наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Ярославский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, заведующий кафедрой нормальной физиологии с биофизикой

Шабанов Петр Дмитриевич, доктор медицинских наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Институт экспериментальной медицины», Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, заведующий лабораторией биохимической фармакологии

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий»

Защита состоится «__»_____2025 г. в__на заседании диссертационного совета 21.2.060.02, созданного на базе ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России по адресу: 390026 г. Рязань, ул. Высоковольтная, д. 9

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России (390026, г. Рязань, ул. Шевченко, д. 34, корп. 2) и на сайте www.rzgmu.ru

Автореферат разослан «_____»_____2025 г.

Ученый секретарь диссертационного совета
кандидат медицинских наук, доцент

Короткова Н.В.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Гликопротеин-P (Pgp, ABCB1, *MDR1*-белок) – это эффлюксный АТФ-зависимый трансмембранный белок с молекулярной массой 170 кДа, препятствующий проникновению в клетки эндогенных и экзогенных веществ различной химической природы, являющихся его субстратами (Sharom F.J., 2011).

В головном мозге Pgp экспрессируется на люминальной поверхности эндотелия сосудов гематоэнцефалического барьера (ГЭБ), где он выполняет двойную функцию: с одной стороны выводит различные субстраты из паренхимы мозга, с другой – ограничивает поглощение соединений непосредственно на люминальной стороне эндотелиальных клеток (Aller S.G. et al., 2009). Кроме того, Pgp, локализуясь базолатерально в гематоликворном барьере, выводит вещества через цереброспинальную жидкость (De Lange E., 2004).

Субстратами Pgp является широкий спектр биологически активных веществ и лекарственных препаратов, включающий химиотерапевтические средства, некоторые антибиотики, ингибиторы ВИЧ-протеазы, антидепрессанты, противоэпилептические и противопаркинсонические препараты (Vautier S. et al., 2009; Байрашевская А. В. и др., 2020).

Активность Pgp может изменяться (повышаться или снижаться) под воздействием ряда веществ и факторов. При совместном применении ингибиторов Pgp с его субстратами концентрация последних в плазме крови повышается, а проницаемость через ГЭБ увеличивается, что может привести к развитию нежелательных лекарственных реакций со стороны центральной нервной системы (ЦНС). И наоборот, совместный прием субстратов и индукторов белка-транспортера приводит к снижению концентрации субстратов в плазме крови и проницаемости ГЭБ и, как следствие, уменьшает эффективность фармакотерапии (Якушева Е. Н. и др., 2014).

Болезнь Паркинсона (БП) – хроническое прогрессирующее нейродегенеративное заболевание центральной нервной системы, вызванное разрушением и гибелью нейронов черной субстанции среднего мозга и других

отделов центральной нервной системы, использующих в качестве нейромедиатора дофамин, что проявляется широким спектром двигательных, нервно-психических и сенсорных расстройств. В настоящее время в мире насчитывается более 6 миллионов пациентов с данным заболеванием, в Российской Федерации – около 210 тысяч человек (Раздорская В.В. и др., 2012). БП представляет собой результат взаимодействия генетических, конституциональных, возрастных, токсических факторов и механизмов (Черных И.В. и др., 2018). Несмотря на применение современных подходов и средств к лечению БП, их эффективность остается невысокой, а профилактика заболевания практически не разработана. Поэтому актуальной задачей современной биохимии является изучение молекулярных механизмов патогенеза данной патологии с целью выявления биохимических маркеров раннего развития заболевания и новых мишеней для терапевтического воздействия.

Для ряда нейродегенеративных заболеваний (болезнь Альцгеймера, шизофрения, аутизм) и эпилепсии характерна дисфункция ГЭБ с дисрегуляцией белков-транспортёров и нарушением структуры плотных контактов, микроповреждением сосудов, скоплением активированной микроглии (Desai B.S. et al., 2007).

Ряд исследований показал принадлежность нейротоксинов, вызывающих паркинсонизм, к субстратам, индукторам или ингибиторам Pgp. Так, в экспериментах *in vitro* с использованием трех различных транспортных моделей (ингибирование эффлюкса родамина-123; стимуляция активности АТФазы; цитотоксичность, индуцированная ксенобиотиками) идентифицировали диазинон, 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридин (МРТР) и ротенон в качестве субстратов Pgp (Lacher S.E et al., 2015).

Таким образом, оценка функционирования, механизмов регуляции и роли белка-транспортёра гликопротеина-Р в гематоэнцефалическом барьере головного мозга крыс при экспериментальном паркинсоническом синдроме является важной и актуальной задачей биохимии, решению которой посвящена настоящая работа.

Степень разработанности проблемы

В ряде исследований оценивалось функционирование Pgp при нейродегенеративных заболеваниях. Так, считается, что снижение активности Pgp в ГЭБ и мозговой ткани является одним из факторов, способствующих развитию болезни Альцгеймера, что приводит к чрезмерному накоплению β -амилоида в мозговой паренхиме (Deo A.K. et al., 2014; Chai A. V. et al., 2020; Taggy V. et al., 2020). Для болезни Крейтцфельда-Якоба характерно накопление аномальной изоформы (PrP^{Sc}) прионного белка (PrP), который образует агрегаты. Увеличение концентрации PrP^{Sc} в мозге связано со снижением экспрессии цереброваскулярного Pgp, в результате чего происходит накопление прионов, что приводит к нейродегенерации (Vogelgesang S. et al., 2006).

На кафедре фармакологии ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России в течение более 10 лет выполняются исследования по изучению функционирования белков-транспортеров, в том числе и Pgp (Якушева Е.Н. и др., 2014). Отработаны методики тестирования лекарственных веществ на принадлежность к субстратам, индукторам и ингибиторам Pgp *in vivo* и *in vitro*. Протестирован ряд отечественных лекарственных средств, таких как мексидол, ноопепт, афобазол, азоксимера бромид и т.д. (Мыльников П.Ю., 2021; Якушева Е.Н. и др., 2019; Черных И.В. и др., 2017). Разработан метод оценки активности Pgp в ГЭБ головного мозга крыс по анализу проникновения фексофенадина – маркерного субстрата белка-транспортера в ткань мозга (Черных И.В. и др., 2019; Мыльников П.Ю., 2021). Изучено функционирование Pgp в ГЭБ при различных патологических процессах. Показано, что при острой гипоксической гипобарической гипоксии, соответствующей подъёму на высоту 8000 м с экспозицией 30 мин, происходит повышение относительного количества Pgp в ГЭБ коры больших полушарий головного мозга крыс (Мыльников П. Ю., 2021). При исследовании функционирования Pgp в ГЭБ на фоне окклюзии-реперфузии средней мозговой артерии (СМА) выявлено, что 30-минутная окклюзия СМА с последующей реперфузией в течение 24 ч вызывает повышение относительного количества Pgp в ГЭБ, однако его проницаемость для маркерного субстрата данного белка-транспортера возрастает (Черных И.В. и др., 2019; Черных И.В., 2021).

Таким образом, логичным продолжением научного направления кафедры является изучение функционирования и механизмов регуляции гликопротеина-Р в гематоэнцефалическом барьере при экспериментальном паркинсоническом синдроме и оценка перспектив его индукции в целях профилактики развития токсического паркинсонизма.

Цель исследования

Оценить особенности биохимических механизмов регуляции и функционирования гликопротеина-Р в гематоэнцефалическом барьере головного мозга крыс на фоне экспериментального паркинсонического синдрома и перспективу его индукции для профилактики развития токсического паркинсонизма.

Задачи исследования

Для достижения поставленной цели решались следующие задачи:

- 1) оценить экспрессию, количество, локализацию, активность и механизмы регуляции белка-транспортера гликопротеина-Р в головном мозге крыс при экспериментальном паркинсоническом синдроме, вызванном нейротоксином ротеноном;
- 2) проанализировать проницаемость гематоэнцефалического барьера, относительное количество белков межклеточных контактов и выраженность окислительного стресса в ткани головного мозга крыс при экспериментальном паркинсоническом синдроме;
- 3) разработать и валидировать методику количественного определения ротенона в ткани коры больших полушарий головного мозга крыс методом высокоэффективной жидкостной хроматографии;
- 4) исследовать проникновение ротенона в головной мозг крыс при индукции активности гликопротеина-Р;
- 5) изучить перспективу индукции гликопротеина-Р в гематоэнцефалическом барьере для профилактики развития экспериментального паркинсонического синдрома, вызванного ротеноном.

Научная новизна

В ходе выполнения работы впервые:

оценено функционирование белка-транспортера гликопротеина-Р в гематоэнцефалическом барьере при экспериментальном паркинсоническом синдроме, вызванном введением ротенона. Показано, что развитие экспериментального паркинсонизма, повышает экспрессию гена *mdr1a*, кодирующего гликопротеин-Р, но это не приводит к изменению количества данного белка-транспортера и его локализации в головном мозге крыс;

изучены механизмы регуляции гликопротеина-Р в гематоэнцефалическом барьере при экспериментальном паркинсоническом синдроме;

установлено, что повышение проникновения субстрата гликопротеина-Р – фексофенадина в головной мозг животных при экспериментальном паркинсоническом синдроме связано с повышением проницаемости гематоэнцефалического барьера вследствие нарушения его структуры и снижения уровня белков плотных межклеточных контактов ZO-1, E-кадгерина, окклюдина;

разработана и валидирована методика количественного определения ротенона в коре больших полушарий головного мозга крыс;

выявлено, что профилактическая индукция гликопротеина-Р в головном мозге крыс, вызванная введением рифампицина, перед введением ротенона, приводит к снижению проникновения нейротоксина в головной мозг и уменьшает выраженность моделируемого паркинсонического синдрома.

Теоретическая и практическая значимость работы

Изучены механизмы регуляции гликопротеина-Р в головном мозге при ротеноновом паркинсонизме, заключающиеся в активации редокс-чувствительного транскрипционного фактора Nrf2 и повышении экспрессии гена, кодирующего белок-транспортер. При этом количество белка гликопротеина-Р не изменяется.

Установлено, что гликопротеин-Р не играет существенной роли в проницаемости субстратов в головной мозг через гематоэнцефалический барьер при токсическом паркинсоническом синдроме.

Развитие токсического паркинсонизма повышает проницаемость гематоэнцефалического барьера за счет снижения уровня белков плотных межклеточных контактов: ZO-1, окклюдина и E-кадгерина.

Установлено, что одним из способов защиты нейронов головного мозга от воздействия токсических веществ-субстратов гликопротеина-R является его индукция в гематоэнцефалическом барьере.

Разработана методика ВЭЖХ анализа ротенона в головном мозге крыс. Она является чувствительной, селективной, точной, прецизионной и пригодна для количественного определения данного вещества в биологических образцах.

Методология и методы исследования

Исследование выполнено *in vivo* на крысах-самцах вистар массой 280-320 г. Моделирование паркинсонического синдрома осуществлялось путем подкожного введения нейротоксина ротенона в дозе 2,5 мг/кг в течении 7 и 28 суток. Уровень дофамина в среднем мозге и стриатуме анализировали иммуноферментным методом, а концентрацию ротенона в головном мозге методом ВЭЖХ-УФ. Локализацию Pgp в головном мозге крыс оценивали иммуногистохимически, экспрессию – методом полимеразной цепной реакции в реальном времени, количество белка – с помощью иммуноферментного анализа. Активность Pgp в ГЭБ коры больших полушарий головного мозга крыс анализировали по оценке проникновения маркерного субстрата транспортера фексофенадина в головной мозг животных после его внутривенного введения. Концентрацию фексофенадина в плазме крови и головном мозге крыс определяли методом ВЭЖХ с УФ-детектированием. Для контроля целостности ГЭБ проводился анализ накопления в ткани мозга красителя синего Эванса. Относительное количество белков межклеточных контактов в ГЭБ оценивали методом вестерн-блот. Выраженность окислительного стресса в коре больших полушарий головного мозга крыс определяли по уровню продуктов, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой (ТБК), карбонильных производных белков, активности антиоксидантного фермента Se-зависимой глутатионпероксидазы и относительного количества и локализации редокс-чувствительного транскрипционного фактора Nrf2. Полученные данные обрабатывали адекватными статистическими методами.

Положения, выносимые на защиту

1. Моделирование экспериментального паркинсонического синдрома подкожным введением ротенона в дозе 2,5 мг/кг массы вызывает индукцию

экспрессии гена *mdr1a*, кодирующего гликопротеин-P, за счет активации редокс-чувствительного транскрипционного фактора Nrf2, но не влияет на количество самого белка-транспортера.

2. Увеличение проникновения субстрата гликопротеина-P фексофенадина в головной мозг животных при моделировании экспериментального паркинсонического синдрома связано с повышением проницаемости гематоэнцефалического барьера вследствие нарушения его структуры и развития окислительного стресса, а не с изменением количества и активности белка-транспортера.

3. Предложенная оптимизированная и валидированная ВЭЖХ методика детекции ротенона пригодна для его быстрого и точного количественного определения в биологических образцах.

4. Индукция активности гликопротеина-P в гематоэнцефалическом барьере снижает проникновение ротенона в кору больших полушарий головного мозга крыс и профилактирует развитие токсического паркинсонизма, вызванного нейротоксином.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Диссертационная работа соответствует пунктам 2, 8, 11, 16, 25 паспорта научной специальности 1.5.4. Биохимия (медицинские науки).

Степень достоверности

Высокая степень доказательности полученных результатов обусловлена достаточным объемом экспериментальных данных, полученных в опытах на крысах, с использованием адекватных и современных методов исследований (иммуноферментный анализ, полимеразная цепная реакция в режиме реального времени, вестерн-блот, иммуногистохимия, высокоэффективная жидкостная хроматография, спектрофотометрия) с последующей систематизацией и статистической обработкой. Степень достоверности проведенного исследования подтверждается использованием современных, адекватных и корректных методик обработки полученных результатов с помощью специализированного программного обеспечения – «Statsoft Statistica 13.0» (США) и GraphPad Prism 8.1.2. (GraphPad Software, США).

Апробация результатов

Основные положения диссертации доложены, обсуждены и представлены в материалах: XXVI Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов» (Москва, 2019); Межрегиональном конкурсе студенческих работ, проводимом в рамках «Создания единого регионального пространства развития надпрофессиональных навыков» Всероссийского конкурса молодежных проектов среди образовательных организаций высшего образования в номинации «Медицина» (Тамбов, 2019); Ежегодной студенческой научно-практической конференции Рязанского государственного медицинского университета имени академика И.П. Павлова (Рязань, 2019); XXV Всероссийской конференции молодых учёных с международным участием «Актуальные проблемы биомедицины – 2020» (Санкт-Петербург, 2020); VI Всероссийской с международным участием студенческой научно-образовательной конференции «Актуальные вопросы студенческой медицинской науки и образования» (Рязань, 2020); V Всероссийской научной конференции молодых ученых «Будущее Нейронаук» (Казань, 2022); II Всероссийской научной конференции молодых ученых, посвященных 100-летию со дня рождения А.А. Никулина и 80-летию Рязанского государственного медицинского университета имени академика И.П. Павлова (Рязань, 2023); V Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Медицина и фармация. Прошлое, настоящее, будущее» (Орехово-Зуево, 2024); Всероссийской конференции с международным участием «Биохимия человека 2024» (Москва, 2024).

Работа поддержана грантом РФФИ 18-415-62003 р_а «Нейропротекторная роль гликопротеина-R, его экспрессия, функциональная активность и механизмы регуляции при моделировании паркинсонического синдрома *in vivo*».

Внедрение результатов исследования в практику

Основные результаты диссертационной работы успешно внедрены в учебный процесс студентов и клинических ординаторов на кафедрах фармакологии и биологической химии, в научно-практическую деятельность центральной научно-исследовательской лаборатории ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России.

Личный вклад автора

Автором самостоятельно выполнен обзор литературы, проведена большая часть экспериментальных работ, обработка и интерпретация результатов, подготовка публикаций по диссертационной работе. Личный вклад автора в выполнение диссертационной работы составляет более 80%.

Сведения о публикациях по теме диссертации

По результатам диссертационной работы опубликовано 11 работ, из которых 3 статьи в журналах, рекомендованных ВАК при Минобрнауки России, 1 статья в журнале, входящем в цитатно-аналитическую базу данных Web of Science.

Структура и объем диссертации

Диссертационная работа включает в себя следующие разделы: введение, глава 1 – обзор литературы, глава 2 – материалы и методы исследования, глава 3 – результаты исследования, обсуждение, выводы, практические рекомендации, перспективы дальнейшей разработки темы, список сокращений, список литературы.

Диссертация изложена на 132 страницах, иллюстрирована 15 рисунками и 17 таблицами. Список литературы представлен 236 источниками, включая 37 источников отечественной и 199 источников зарубежной литературы.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Исследования было одобрено Комиссией по контролю за содержанием и использованием лабораторных животных ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России, протокол заседания № 11 от 29.01.2018 и выполнено на 375 крысах-самцах вистар массой 280–320 г. В среднем летальность составила 29,9%, поэтому в анализ было включено 263 крысы. Паркинсонический синдром моделировали п/к введением ротенона («Sigma», США) в виде масляного раствора (содержащего 2% диметилсульфоксида) в дозе 2,5 мг/кг 1 р/д в течение 7 и 28 дней (Воронков Д.Н. и др., 2013). Все животные были разделены на 7 групп:

1-я группа – анализ количества белка Pgp, экспрессии гена *mdr1a*, уровня дофамина и поведения животных, включала 3 серии (n=15 в каждой серии): *1 серия* – п/к введение масла подсолнечного в объеме 1 мл/кг в течение 28 дней (контроль);

2 и 3 серии – п/к введение ротенона в дозе 2,5 мг/кг 1 р/д в течение 7 и 28 дней соответственно. В конце эксперимента оценивали поведение крыс по основным (гипо, бради- и олигокинезия, постуральная нестабильность, неустойчивая походка) и дополнительным (ригидность мышц, тремор, нарушение равновесия) признакам паркинсонизма по 3-х балльной шкале, где 1 – низкая степень выраженности, 2 – средняя, 3 – высокая (Миронов А.Н. и др., 2012). Затем их выводили из эксперимента, забирали КБП головного мозга, стриатум и средний мозг для оценки количества Pgr методом иммуноферментного анализа (ИФА) (ELISA kit «BlueGene», Китай) (n=5 в каждой серии) и экспрессии гена *mdrl1a* методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени (n=5 в каждой серии). В стриатуме и среднем мозге изучался уровень дофамина методом ИФА (ELISA kit for Dopamine CEA851Ge, «Cloud-Clone Corp.», Китай) (n=5 в каждой серии).

2-я группа – исследование локализации Pgr в КБП головного мозга крыс, состояла из 3 серий (n=5 в каждой серии): *1 серия* – п/к введение масла подсолнечного в объеме 1 мл/кг в течение 28 дней; *2 и 3 серии* – п/к введение ротенона в дозе 2,5 мг/кг 1 р/д в течение 7 и 28 дней соответственно. Локализацию белка определяли иммуногистохимически с использованием первичных антител (ABCВ1 antibody-middle region, «Aviva Systems Biology», США). Для иммунного окрашивания использовали полимерную систему детекции с пероксидазной меткой («Дако», Дания). Микропрепарат фотографировали камерой «ЛОМО ТС- 500» (Россия) при увеличении в 400 раз. Изображения анализировали в программе ImageJ (США).

3-я группа – оценка выраженности окислительного стресса, относительного количества транскрипционного фактора Nrf2 и белков межклеточных контактов в КБП головного мозга крыс, состояла из 3 серий (n=6 в каждой серии): *1 серия* – п/к введение масла подсолнечного в объеме 1 мл/кг в течение 28 дней; *2 и 3 серии* – п/к введение ротенона в дозе 2,5 мг/кг 1 р/д в течение 7 и 28 дней соответственно. В конце эксперимента животные подвергались эвтаназии и забиралась КБП головного мозга. Выраженность окислительного стресса оценивали по анализу концентрации конечного продукта перекисного окисления липидов – ТБК-реактивных продуктов

(Mihara M. et al., 1978), карбонильных производных белков (Weber D. et al., 2015), небелковых SH-групп (Ellman G. et al., 1959) и активности антиоксидантного фермента глутатионпероксидазы (Ланкин В.З. и др., 1976). Относительное количество Nrf2 в ядерной и цитоплазматической фракциях, уровень белков плотных межклеточных контактов: ZO-1, окклюдина и E-кадгерина в тотальном гомогенате КБП оценивали методом вестерн-блот. Для исследования использовали первичные кроличьи поликлональные антитела (AF0639 антитело к Nrf2; AF5145 антитело к ZO-1; DF7504 антитело к окклюдину; AF0131 антитело к E-кадгерину, «Affinity», КНР) в разведении 1:1000 и вторичные козьи антитела (Goat anti-Rabbit IgG (H+L) Cross-Adsorbed Secondary Antibody, HRP, «Invitrogen», США) в разведении 1:4000. Белки визуализировали хемилюминесценцией с помощью Chemi Doc XRS+ («Bio-Rad», США). Интенсивность полученных полос (бэндов) анализировали денситометрически программным обеспечением ImageLab («Bio-Rad», США). Количество Nrf2 и белков плотных контактов оценивали относительно содержания GAPDH (первичные мышьи антитела GAPDH Loading Control Monoclonal Antibody (GA1R), DyLight 68, «Invitrogen», США, разведение 1:1000, вторичные кроличьи антитела к первичным антителам GAPDH – Rabbit-anti-Mouse IgG (H+L) Secondary Antibody, HRP, «Invitrogen», США, разведение 1:4000).

4-я группа – изучение влияния ротенона на проникновение субстрата Pgp – фексофенадина в головной мозг через ГЭБ, состояла из 4 серий (n=30 в каждой серии): *1 серия* – п/к введение масла подсолнечного 1 мл/кг в течение 28 дней; *2, 3 и 4 серии* – п/к введение ротенона в дозе 2,5 мг/кг 1 р/д однократно и в течение 7 и 28 дней соответственно. После окончания введения нейротоксина в/в вводили фексофенадин в дозе 10 мг/кг. Затем через 5, 10, 15, 30, 45 и 60 мин под золетиловым наркозом забирали 4 мл крови из брюшной аорты и КБП головного мозга, в которых определяли концентрацию фексофенадина методом ВЭЖХ-УФ («Stayer», «Аквилон», Россия). На каждую временную точку приходилось по 5 животных. Общее количество фексофенадина в системном кровотоке и в КБП оценивали по площади под кривой концентрация-время в плазме $AUC_{0-t(плазма)}$ или в гомогенате КБП $AUC_{0-t(мозг)}$ (Каркищенко И.И. и др., 2001). Для оценки проникновения фексофенадина

через ГЭБ рассчитывали отношение $AUC_{0-t(\text{мозг})} / AUC_{0-t(\text{плазма})}$.

5-я группа – оценка проницаемости ГЭБ при экспериментальном паркинсоническом синдроме, состояла из 3 серий (n=5 в каждой серии): *1 серия* – п/к введение масла подсолнечного в объеме 1 мл/кг в течение 28 дней; *2 и 3 серии* – п/к введение ротенона в дозе 2,5 мг/кг 1 р/д в течение 7 и 28 дней соответственно. Целостность ГЭБ оценивали по накоплению в ткани мозга красителя синего Эванса (Evans blue, «Sigma», США) после в/в введения. Концентрацию синего Эванса в гомогенате мозга оценивали спектрофотометрически (спектрофотометр SmartSpec Plus, «Bio-Rad», США) при 620 нм (Jin Z. Et al., 2019; Wang Q. et al., 2019).

6-я группа – исследование влияния индукции Pgr в ГЭБ на проникновение ротенона в головной мозг, состояла из 2 серий: *1 серия* (n=15) – в/ж введение крахмального клейстера в течение 14 дней; *2 серия* (n=20) – в/ж введение рифампицина в дозе 20 мг/кг 2 р/д в течение 14 дней (Rana S.V. et al., 2006). В конце эксперимента животным в/в вводили ротенон в дозе 0,2 мг/кг (нейротоксин растворяли в ДМСО и воде для инъекций) и через 5, 15 и 30 мин выводили из эксперимента, забирали образцы КБП головного мозга и определяли концентрацию ротенона методом ВЭЖХ-УФ. На каждую временную точку приходилось по 5 животных. Дополнительно у 5 животных 2 серии определяли количество Pgr в среднем мозге, стриатуме и КБП методом ИФА.

7-я группа – изучение влияния индукции Pgr на выраженность паркинсонизма при введении ротенона, состояла из 3 серий (n=5 в каждой серии): *1 серия* – п/к введение масла подсолнечного в объеме 1 мл/кг в течение 28 дней. *2 и 3 серии* – в/ж введение рифампицина в дозе 20 мг/кг 2 р/д в течение 7 дней, а затем совместно с п/к введением ротенона в дозе 2,5 мг/кг 1 р/д в течение 7 и 28 дней соответственно. В конце эксперимента оценивали выраженность клинических проявлений паркинсонизма. У крыс 2 и 3 серии в образцах среднего мозга, стриатума определяли уровень дофамина, в образцах среднего мозга, стриатума и КБП головного мозга – содержание Pgr методом ИФА.

Полученные результаты анализировались с использованием программ «Statsoft Statistica 13.0» (США, номер лицензии JPZ811I521319AR25ACD-W) и GraphPad Prism

8.1.2. («GraphPad Software», США). Характер распределения данных определяли по критерию Шапиро-Уилка. В случае нормального распределения статистическую значимость оценивали с помощью теста ANOVA, попарные сравнения – критерием Фишера. При распределении данных, отличном от нормального, различия между сериями оценивали с помощью критерия Крускала-Уоллиса. При уровне значимости менее 0,05 проводили парное сравнение параметров критерием Манна-Уитни с поправкой Бонферрони. Данные представлены в виде среднего арифметического \pm стандартное отклонение при нормальном распределении данных или медианы, нижнего и верхнего квартилей при распределении данных, отличном от нормального.

Результаты исследования и их обсуждение

Введение ротенона крысам в течение 7 и 28 суток приводило к развитию типичных клинических признаков паркинсонизма: снижалась двигательная активность, появлялись постуральная нестабильность, неустойчивость походки, ригидность мышц и тремор покоя, нарушалось равновесие. Суммарный балл выраженности признаков паркинсонизма составил на 7 сутки 4,5 (3; 6), на 28 суток – 8 (6; 10) и достоверно превышал показатели контрольных животных ($p < 0,05$). Также на 7 и 28 суток отмечалось снижение уровня дофамина в стриатуме и среднем мозге (Таблица 1). Таким образом, выбранная модель паркинсонизма является адекватной.

Таблица 1 – Уровень дофамина (пг/мг ткани) в стриатуме и среднем мозге крыс при экспериментальном паркинсоническом синдроме (медиана, верхний и нижний квартили, $n=5$ в каждой серии)

Серия эксперимента	Уровень дофамина в стриатуме	Уровень дофамина в среднем мозге
Контроль	14,8 (13,1; 16,5)	9,9 (6,6; 15,1)
Ротенон 7 дней	4,5 (1,6; 11,3)*	2,7(1,5; 8,5) #
Ротенон 28 дней	0,9 (0,5; 1,7)**	3,1 (1,7; 6,5)*
Примечание – * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ – статистически значимые различия с показателями контроля; # $p < 0,1$ – различия с показателями контроля.		

Экспрессия гена $mdr1a$, количество и локализация гликопротеина-P в головном мозге крыс при экспериментальном паркинсоническом синдроме. При проведении иммуногистохимического исследования КБП головного мозга крыс иммунопозитивная реакция наблюдалась в эндотелиальных клетках сосудов (Рисунок 1), что

свидетельствует о преимущественной локализации Рgr в ГЭБ. Подкожное введение ротенона не влияло на локализацию изучаемого белка.



Рисунок 1 – Иммуногистохимическая реакция с Рgr в коре больших полушарий головного мозга крыс при экспериментальном паркинсоническом синдроме

Уровень мРНК гена *mdr1a* в КБП головного мозга крыс превышал экспрессию гена в стриатуме, а в остальных отделах мозга достоверно не различался. На 7 день введения ротенона происходило повышение экспрессии гена в КБП головного мозга крыс, а на 28 день в среднем мозге, стриатуме и КБП (Рисунок 2).

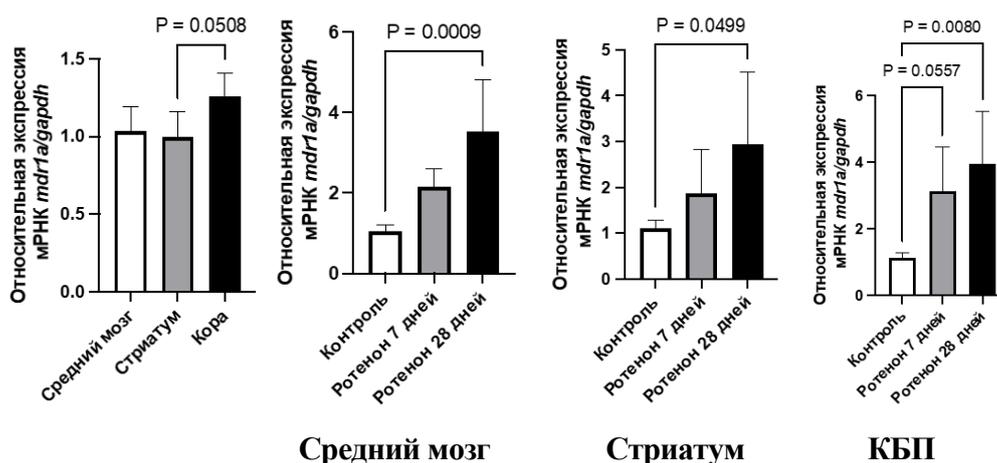


Рисунок 2 – Относительная экспрессия мРНК *mdr1a* в разных отделах мозга крыс при экспериментальном паркинсоническом синдроме, среднее±SD, (n=5 в каждой серии)

Содержание Рgr в гомогенате среднего мозга, стриатума и КБП головного мозга крыс достоверно между собой не различалось. Моделирование экспериментального паркинсонического синдрома достоверно не влияло на количество белка-транспортера во всех исследуемых тканях (Таблица 2).

Таким образом, развитие экспериментального паркинсонического синдрома повышает экспрессию гена *mdr1a*, но это не приводит к изменению количества белка Рgr и его локализации в головном мозге крыс.

Таблица 2 – Количество Pgr в стриатуме, среднем мозге и коре больших полушарий головного мозга крыс при экспериментальном паркинсоническом синдроме (медиана, верхний и нижний квартили, n=5 в каждой серии)

Серия эксперимента	Стриатум, пг/мг ткани	Средний мозг, пг/мг ткани	КБП, пг/мг ткани
Контроль	325,2 (261,01; 702,4)	331,7 (304,5; 382,1)	305,3 (289,35; 309,5)
Ротенон 7	352,9 (336,3; 405,8)	312,9 (293,9; 1130,41)	301,9 (281,23; 334,8)
Ротенон 28	273,4 (208,41; 297,05)	258,3 (213,43; 289,62)	311,3 (258,8; 373,43)

Проникновение субстрата гликопротеина-R – фексофенадина в головной мозг при экспериментальном паркинсоническом синдроме. Для оценки проникновения фексофенадина – субстрата Pgr в головной мозг его вводили в/в в дозе 10 мг/кг на 7 и 28 дни эксперимента. Дополнительно (чтобы исключить прямое ингибирование Pgr ротеноном) анализировали влияние однократного введения ротенона. Плазменная концентрация фексофенадина достоверно не различалась во всех сериях. Однократное п/к введение ротенона достоверно не влияло на концентрацию фексофенадина в КБП, а 7 и 28 дневное введение приводило к его достоверному возрастанию через 10 и 15 мин. Однократное введение ротенона статистически значимо не влияло на AUC_{0-t} (плазма), AUC_{0-t} (мозг) фексофенадина и их отношение. Введение ротенона в течение 7 и 28 дней приводило к возрастанию AUC_{0-t} (мозг) фексофенадина и отношения AUC_{0-t} (мозг) / AUC_{0-t} (плазма) (Таблица 3).

Таблица 3 – Общее содержание фексофенадина в плазме крови и гомогенате мозга крыс (AUC_{0-t} (мозг), AUC_{0-t} (плазма), AUC_{0-t} (мозг)/ AUC_{0-t} (плазма)) после введения ротенона (медиана, верхний и нижний квартиль, n=5 в каждой серии)

Серия	AUC_{0-t} (мозг), мкг/г*мин	AUC_{0-t} (плазма), мкг/мл*мин	AUC_{0-t} (мозг)/ AUC_{0-t} (плазма)
Контроль	5915,8 (5783,2; 6645,2)	266181,6 (246356,3; 285630,8)	0,0202 (0,0199; 0,0222)
Ротенон однократно	6765,7 (5553,2; 7391,6)	276425,2 (259962,7; 281777,7)	0,025 (0,024; 0,034)
Ротенон 7 дней	11940,8 (9237;24989,4)*	206994,0 (195394,7; 292076,2)	0,0484 (0,0396; 0,0856)*
Ротенон 28 дней	10343,9 (8448,6; 10770,3)*	235258,6 (231383,8; 267335,3)	0,0458 (0,0447; 0,0569)*

Примечание – * $p < 0,05$ – статистически значимые различия с показателями контроля.

Таким образом, ротенон самостоятельно не влияет на Pgr. Однако, при развитии паркинсонического синдрома повышается проникновение маркерного субстрата Pgr в головной мозг, что, скорее всего, связано с повреждением ГЭБ.

Проницаемость гематоэнцефалического барьера при экспериментальном паркинсоническом синдроме. Моделирование экспериментального паркинсонического синдрома сопровождалось нарушением проницаемости ГЭБ, что подтверждалось накоплением в ткани головного мозга крыс красителя синего Эванса. Его содержание в головном мозге имело тенденцию к повышению на 7 день по сравнению с контролем и достоверно увеличивалось на 28 день. На 7 сутки введения ротенона снижалось относительное количество ZO-1, E-кадгерина и окклюдина, а на 28 сутки E-кадгерина и окклюдина (Рисунок 3).

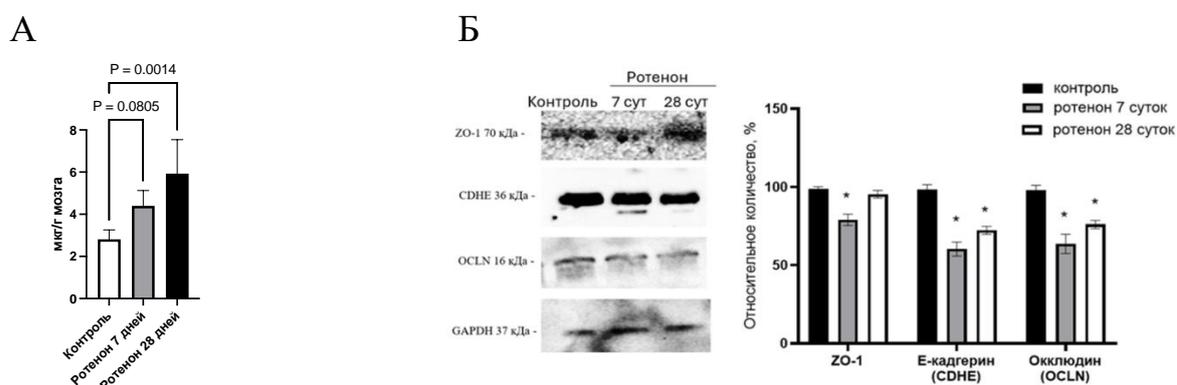


Рисунок 3 – Накопление красителя синего Эванса в головном мозге крыс (А) и относительное количество белков межклеточных контактов ZO-1, E-кадгерина, окклюдина в головном мозге крыс (Б) при экспериментальном паркинсоническом синдроме, среднее±SD, n=5

Примечание – * p < 0,05 – статистически значимые различия с показателями контроля

Таким образом, повышение проникновения субстрата Pgr – фексофенадина в головной мозг животных при экспериментальном паркинсоническом синдроме связано с повышением проницаемости ГЭБ.

Выраженность окислительного стресса при экспериментальном паркинсоническом синдроме. Развитие паркинсонического синдрома сопровождалось повышением уровня ТБК-реактивных продуктов, карбонильных производных белков и снижением небелковых SH-групп, а также на 7 день имелась тенденция к повышению активности фермента Se-зависимой глутатионпероксидазы (Таблица 4). Относительное количество цитоплазматической фракции Nrf2 статистически значимо не изменялось, а ядерной фракции увеличивалось на 7 и 28 день. Также отмечалось увеличение интегрального показателя – соотношения ядерной фракции Nrf2 к цитоплазматической на 7 день и на 28 день (Рисунок 4), что свидетельствует об

активации Nrf2.

Таблица 4 – Выраженность окислительного стресса в ткани коры больших полушарий головного мозга крыс при экспериментальном паркинсоническом синдроме (n =6 в каждой серии)

Серия/параметр	Контроль	Ротенон 7 дней	Ротенон 28 дней
ТБК-реактивные продукты, нмоль/мг белка	8,17±1,37	13,83±2,47***	17,66±2,34***,#
Карбонильные производные белков, нмоль/мг белка	5,99±1,24	11,22±2,42**	13,33±2,72***
Безбелковые SH-группы, мкмоль/мг белка	4,26 (3,42; 4,57)	3,24 (2,30; 4,68)	1,96 (1,49; 2,09)**
Активность Se-глутатионпероксидазы, НАДФН ₂ /мин× мг белка	19,99±2,61	24,25±3,85 p=0,083	14,51±2,95*,#

Примечание: * p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001 – статистически значимые различия с показателями контроля; # p<0,05 – статистически значимые различия между сериями 7 и 28 дневного введения ротенона.

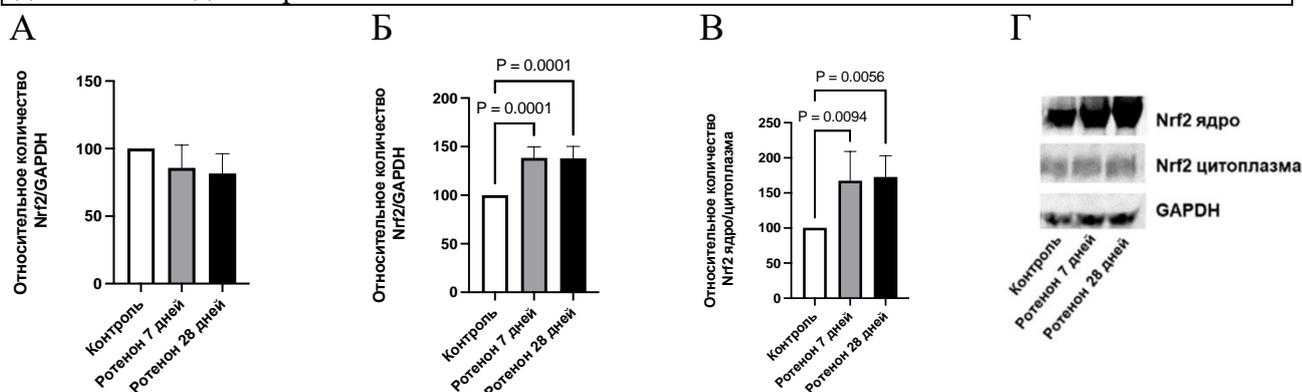


Рисунок 4 – Относительное количество Nrf2 в цитоплазматической и ядерной фракциях коры больших полушарий головного мозга крыс при экспериментальном паркинсоническом синдроме, среднее±SD, n=5

Примечание –А – цитоплазма; Б – ядро; В – ядро/цитоплазма; Г – результаты вестерн-блот анализа

Таким образом, моделирование паркинсонического синдрома сопровождается развитием окислительного стресса в КБП головного мозга крыс. При этом происходит мобилизация и антиоксидантной системы защиты. Активация Nrf2 может вызывать повышение экспрессии гена *mdr1a*, а развитие окислительного стресса сопровождается повреждением белковой молекулы Pgp и ГЭБ.

Разработка и валидация методики количественного определения ротенона в коре больших полушарий головного мозга крыс методом ВЭЖХ. Ротенон – субстрат Pgp, поэтому на следующем этапе планировалось оценить стратегию индукции белка-транспортера с целью профилактики развития экспериментального паркинсонизма.

Для анализа концентрации ротенона в КБП мозга крыс разрабатывалась методика его количественного анализа методом ВЭЖХ-УФ с использованием хроматографа Stayer («Аквилон», Россия), при длине волны 296 нм. Условия хроматографирования: температура разделения – 37°C, скорость потока – 1 мл/мин, подвижная фаза: ацетонитрил и вода (30:70). Время удерживания ротенона составило 6,72 мин.

Валидацию биоаналитической методики выполняли согласно Руководству по экспертизе лекарственных средств по параметрам: селективность; калибровочная кривая (линейность); нижний предел количественного определения; точность; прецизионность; перенос пробы; стабильность ротенона в гомогенате мозга. Аналитический диапазон методики составил 62,5–1000,0 нг/г. Данная методика является селективной, точной и прецизионной и позволяет оценить содержание ротенона в КБП головного мозга крыс.

Проникновение ротенона в головной мозг крыс при индукции активности гликопротеина-R. Индукцию Pgr вызывали внутрижелудочным введением рифампицина в дозе 20 мг/кг два раза в день в течение 14 дней. При этом повышалось количество Pgr в стриатуме в 6,1 раза ($p=0,004$), в среднем мозге в 3,3 раза ($p=0,004$), в КБП в 2,79 раза ($p=0,004$), что подтверждает индукцию изучаемого белка. Количество дофамина в стриатуме и среднем мозге крыс достоверно от контроля не отличалось. При введении ротенона после предварительной индукции Pgr концентрация нейротоксина в головном мозге крыс через 5 мин после введения снижалась по сравнению с контролем, а в остальные сроки достоверно от него не отличалась. AUC_{0-t} ротенона в мозге, у крыс которым предварительно вводили рифампицин, была ниже, чем у контрольных животных (Таблица 5).

Таблица 5 – Влияние индукции Pgr на концентрацию ротенона в коре больших полушарий головного мозга крыс (нг/г ткани, среднее \pm SD)

Серия эксперимента	Время после внутривенного введения ротенона			AUC_{0-t}
	5 мин (n=5)	15 мин (n=5)	30 мин (n=5)	
Контроль	325,0 \pm 44,6	134,3 \pm 36,9	79,9 \pm 8,2	4715,0 \pm 712,4
Рифампицин 14 дней	173,5 \pm 14,9*	122,8 \pm 25,6	74,0 \pm 26,6	3391,0 \pm 332,9*

Примечание – * $p<0,01$ – статистически значимые различия с показателями контроля.

Таким образом, предварительная индукция Pgr в ГЭБ головного мозга крыс приводит к снижению проникновения ротенона в головной мозг после его в/в

введения.

Влияние индукции гликопротеина-R в гематоэнцефалическом барьере на развитие экспериментального паркинсонического синдрома, вызванного нейротоксином ротеноном. На заключительном этапе исследования оценивалась возможность профилактики развития экспериментального паркинсонизма за счет предварительной индукции Pgr. Предварительное введение рифампицина перед введением ротенона, а затем совместно с нейротоксином в течение 7 и 28 дней приводило к повышению количества Pgr в головном мозге крыс (Таблица 6).

Таблица 6 – Влияние комбинации рифампицина и ротенона на количество Pgr в стриатуме, среднем мозге и коре больших полушарий головного мозга крыс (медиана, верхний и нижний квартили, пг/мг ткани, n=5)

Серия эксперимента	Уровень Pgr в стриатуме	Уровень Pgr в среднем мозге	Уровень Pgr в коре больших полушарий
Контроль	325,2 (261,01; 702,4)	331,7 (304,5; 382,1)	305,3 (289,35; 309,5)
Рифампицин +ротенон 7 сут	1094,7 (946,2; 1331,78)*	790,4 (640,6;800,7)*	821,7 (784,8; 849,8) *
Рифампицин +ротенон 28 сут	1352,1 (930,4; 1742,5) **	782,2 (614,6;804,7)*	902,6 (883,2; 935,8) **
Примечание – * p<0,05, ** p<0,01 – статистически значимые различия с показателями контроля.			

Содержание дофамина в стриатуме на 7 день введения комбинации достоверно от контроля не отличалось, а на 28 день снижалось. В среднем мозге как на 7, так и на 28 сутки уровень дофамина достоверно от контроля не отличался (p>0,05, Таблица 7).

Таблица 7 – Влияние комбинации рифампицина и ротенона на уровень дофамина (пг/мг ткани) в стриатуме и среднем мозге крыс (медиана, верхний и нижний квартили, n=5 в каждой серии)

Серия эксперимента	Уровень дофамина в стриатуме	Уровень дофамина в среднем мозге
Контроль	14,8 (13,9; 15,9)	9,9 (7,5; 13,0)
Рифампицин+ротенон 7 сут	8,6 (7,2; 9,8)	8,3 (2,4; 8,6)
Рифампицин+ротенон 28 сут	5,33 (3,7; 7,7)*, ^	4,2 (3,8; 5,7)
Примечание – * p<0,05 –статистически значимые различия с показателями контроля; ^ p<0,01 – статистически значимые различия с серией изолированного введения ротенона.		

На 7 день введения комбинации суммарный балл выраженности паркинсонизма превышал показатели контроля и не отличался от значений животных серии изолированного применения ротенона. Предварительная индукция Pgr у крыс,

которым вводили ротенон в течение 28 дней, приводила к уменьшению выраженности признаков паркинсонизма по сравнению с крысами, получавшими только ротенон. Суммарный балл выраженности паркинсонизма снизился на 43,7% ($p < 0,05$), однако он все равно превышал показатели контрольных животных ($p < 0,05$). Таким образом, профилактическая индукция Pgr в головном мозге крыс, вызванная введением рифампицина, перед введением ротенона, снижает выраженность паркинсонического синдрома, моделируемого нейротоксином.

ВЫВОДЫ

1) Экспериментальный паркинсонический синдром, вызванный подкожным введением ротенона в дозе 2,5 мг/кг один раз в день в течение 7 и 28 дней, повышает экспрессию гена *mdr1a*, но не влияет на количество белка гликопротеина-P в среднем мозге, стриатуме и коре больших полушарий и на локализацию транспортера в коре больших полушарий головного мозга крыс. Повышение экспрессии гена *mdr1a* опосредовано активацией редокс-чувствительного транскрипционного фактора Nrf2, а отсутствие повышения количества белка гликопротеина-P обусловлено повреждением его молекулы, вследствие развития окислительного стресса, который подтверждается увеличением уровня продуктов окисления липидов и белков и снижением концентрации небелковых SH-групп.

2) При экспериментальном паркинсоническом синдроме происходит повышение проницаемости гематоэнцефалического барьера, оцененной по проникновению в ткань мозга красителя синего Эванса и маркерного субстрата гликопротеина-P – фексофенадина, за счет снижения количества функционально важных белков межклеточных контактов: ZO-1, окклюдина и E-кадгерина вследствие развития окислительного стресса в ткани коры больших полушарий головного мозга крыс.

3) Разработана и валидирована чувствительная методика количественного определения ротенона в коре больших полушарий головного мозга крыс с помощью ВЭЖХ-УФ, которая соответствует требованиям, предъявляемым к биоаналитическим методикам, что позволяет использовать ее для количественного определения нейротоксина в мозге.

4) Предварительная индукция гликопротеина-P в гематоэнцефалическом

барьере коры больших полушарий головного мозга крыс, вызванная внутрижелудочным введением рифампицина в дозе 20 мг/кг два раза в день в течении 14 дней, приводит к снижению проникновения ротенона в головной мозг после его однократного внутривенного введения в дозе 0,2 мг/кг.

5) Направленная индукция гликопротеина-Р в ГЭБ может быть рассмотрена как перспективная стратегия профилактики развития паркинсонического синдрома, вызванного нейротоксинами-субстратами транспортера, что доказывает снижение выраженности симптомов паркинсонизма, моделируемого ротеноном, при предварительном использовании индуктора белка – рифампицина.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Разработанную методику количественного определения ротенона возможно использовать для диагностики отравления данным нейротоксином. Кроме того, оценка содержания ротенона в головном мозге экспериментальных животных позволяет апробировать новые стратегии фармакотерапии паркинсонизма, связанные со снижением проникновения нейротоксина в мозг.

Снижение выраженности симптомов паркинсонизма у экспериментальных животных при комбинированном введении ротенона и рифампицина (нейротоксина-субстрата и индуктора Рgp соответственно) по сравнению с изолированным введением ротенона показывает перспективность индукции функциональной активности транспортера для профилактики развития паркинсонизма при контакте с нейротоксинами.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Сеидкулиева, А.А. Активность гликопротеина-Р в гематоэнцефалическом барьере при экспериментальном паркинсонизме / А.А. Сеидкулиева, А.С. Есенина, **М.М. Градинарь** – Текст: непосредственный // Актуальные вопросы студенческой медицинской науки и образования: материалы v Всероссийской с международным участием студенческой научно-образовательной конференции. – Рязань, 2019. – С. 142-143.

2. Инсектицид ротенон как ингибитор функциональной активности гликопротеина-р в гематоэнцефалическом барьере / И.В. Черных [и др.] – Текст: непосредственный // Естественнонаучные основы медико-биологических знаний: материалы II Всероссийской конференции студентов и молодых ученых с международным участием. – Рязань, 2019. – Ч. 1. – С. 12-14. – (Соавт.: А.В. Щулькин, А.С. Есенина, **М.М. Градинарь**, Е.Н. Якушева).

3. Функциональная активность гликопротеина-Р в гематоэнцефалическом барьере на фоне экспериментального паркинсонического синдрома / И.В. Черных [и др.] – Текст: непосредственный // Российский медико-биологический вестник имени академика И.П. Павлова. – 2019. – Т. 27, № 2. – С. 150-159. – (Соавт.: А.В. Щулькин, П.Ю. Мильников, М.В. Гацанога, А.С. Есенина, **М.М.**

Градинарь, Е.Н. Якушева).

4. Функционирование белка-транспортера гликопротеина-R в гематоэнцефалическом барьере на фоне паркинсонического синдрома / **М.М. Градинарь** [и др.] – Текст: непосредственный // Актуальные проблемы биомедицины - 2020: сборник тезисов XXVI Всероссийской конференции молодых учёных с международным участием. – Санкт-Петербург, 2020. – С. 54-55. – (Соавт.: И.В. Черных, А.С. Есенина, А.А. Сеидкулиева).

5. Индукция белка-транспортера гликопротеина-R в гематоэнцефалическом барьере как способ профилактики паркинсонического синдрома / **М.М. Градинарь** [и др.] – Текст: непосредственный // **Нейрохимия.** – 2020. – Т. 37, № 3. – С. 257-262. – (Соавт.: И.В. Черных, А.В. Шулькин, А.С. Есенина, Е.Н. Якушева).

6. Градинарь, М.М. Роль белка-транспортера Р-гликопротеина в развитии резистентности паркинсонизма к лекарственной терапии / **М.М. Градинарь** – Текст: непосредственный // 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. – Рязань, 2023. – С. 13-15.

7. Разработка и валидация методики количественного определения ротенона в гомогенате коры головного мозга крыс методом высокоэффективной жидкостной хроматографии / **М.М. Градинарь** [и др.] – Текст: непосредственный // Токсикологический вестник. – 2023. – Т. 31, № 2. – С. 120-126. – (Соавт.: А.В. Шулькин, И.В. Черных, Е.Н. Якушева).

8. Градинарь, М.М. Оценка проницаемости гематоэнцефалического барьера при экспериментальном токсическом паркинсонизме / **М.М. Градинарь** –Текст: непосредственный // Медицина и фармация. Прошлое, настоящее, будущее: сборник научных материалов V Всероссийской научно-практической конференции с международным участием. – Орехово-Зуево: ГГТУ, 2024. – С. 38-39.

9. Роль белка-транспортера гликопротеина-R в проникновении ротенона в головной мозг через гематоэнцефалический барьер / **М.М. Градинарь** [и др.] – Текст: непосредственный // **Прикладные информационные аспекты медицины.** – 2024. – Т. 27, №2. – С. 79-86. – (Соавт.: А.В. Шулькин, П.Ю. Мыльников, И.В. Черных, Е.Н. Якушева).

10. Градинарь, М.М. Проницаемость гематоэнцефалического барьера при токсическом паркинсонизме / **М.М. Градинарь** [и др.] – Текст: непосредственный // **Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии.** – 2024. – Т. 27, № 10. – С. 32-37. – (Соавт: И.В. Черных, Ю.В. Абаленихина, А.В. Шулькин, Е.Н. Якушева).

11. Изменение уровня белков межклеточных контактов при токсическом паркинсонизме / **М.М. Градинарь** [и др.] – Текст: непосредственный // Биохимия человека: материалы всероссийской конференции с международным участием, 17-19 октября 2024 г. / под общей редакцией В.С. Покровского. – Москва, 2024. – С. 58. – (Соавт: Шулькин А.В., Черных И.В., Абаленихина Ю.В., Якушева Е.Н.).

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

БП – болезнь Паркинсона

в/в – внутривенное введение

в/ж – внутривенное введение

ВЭЖХ-УФ – высокоэффективная

жидкостная хроматография с

ультрафиолетовым детектированием

ГЭБ – гематоэнцефалический барьер

ИФА – иммуноферментный анализ

КБП – кора больших полушарий

п/к – подкожное введение

ПЦР – полимеразная цепная реакция

ТБК – тиобарбитуровая кислота

ЦНС – центральная нервная система

AUC – площадь под фармакокинетической кривой (англ.: Area Under the Curve)

mdr1 – множественная лекарственная

устойчивость (англ.: Multi-Drug Resistance)

Nrf2 – ядерный фактор эритроидного

происхождения-2 (англ.: nuclear factor

erythroid 2-related factor 2)

Pgp – гликопротеин-R