

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«РЯЗАНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ
ИМЕНИ АКАДЕМИКА И. П. ПАВЛОВА»
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

На правах рукописи

Градинарь Мария Михайловна

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

1.5.4. Биохимия

Диссертация
на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Научный руководитель:
доктор медицинских наук, доцент
Щулькин Алексей Владимирович

Рязань – 2024

Оглавление

| | |
|---|----|
| ВВЕДЕНИЕ..... | 5 |
| ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ | 15 |
| 1.1. Функционирование гликопротеина-Р в гематоэнцефалическом барьере..... | 15 |
| 1.1.1. Структура и локализация гликопротеина-Р | 15 |
| 1.1.2. Функции гликопротеина-Р | 17 |
| 1.1.3. Структура и свойства гематоэнцефалического барьера | 18 |
| 1.1.4. Особенности функционирования гликопротеина-Р в гематоэнцефалическом барьере | 23 |
| 1.2. Болезнь Паркинсона, паркинсонизм | 27 |
| 1.2.1. Эпидемиология болезни Паркинсона | 27 |
| 1.2.2. Биохимические механизмы развития болезни Паркинсона | 29 |
| 1.2.3. Токсический паркинсонизм | 32 |
| 1.2.4. Биохимические механизмы развития экспериментальных моделей болезни Паркинсона..... | 36 |
| 1.3. Функционирование гликопротеина-Р при болезни Паркинсона | 39 |
| ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ | 44 |
| 2.1. Объект экспериментальных исследований | 44 |
| 2.2. Дизайн экспериментальных исследований | 44 |
| 2.3. Моделирование экспериментального паркинсонизма | 48 |
| 2.4. Оценка выраженности паркинсонизма (поведения животных)..... | 49 |
| 2.5. Определение концентрации дофамина | 49 |
| 2.6. Определение экспрессии гена <i>mdr1a</i> | 50 |
| 2.7. Определение уровня Pgp | 51 |
| 2.8. Оценка локализации Pgp в коре больших полушарий головного мозга крыс | 51 |
| 2.9. Анализ проникновения субстрата гликопротеина-Р фексофенадина в головной мозг крыс | 52 |
| 2.10. Анализ концентрации фексофенадина в плазме крови крыс | 54 |
| 2.11. Анализ концентрации фексофенадина в коре больших полушарий | |

| | |
|--|----|
| головного мозга крыс..... | 55 |
| 2.12. Анализ проницаемости гематоэнцефалического барьера | 57 |
| 2.13. Оценка выраженности окислительного стресса в коре больших полушарий головного мозга крыс | 57 |
| 2.14. Оценка относительного количества транскрипционного фактора Nrf2 в ядерной и цитоплазматической фракциях коры больших полушарий головного мозга крыс..... | 60 |
| 2.15. Оценка относительного количества белков плотных межклеточных контактов в коре больших полушарий головного мозга крыс | 61 |
| 2.16. Математико-статистические методы исследования..... | 63 |
| ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ | 64 |
| 3.1. Моделирование экспериментального паркинсонического синдрома | 64 |
| 3.2. Экспрессия гена <i>mdr1a</i> , количество и локализация гликопротеина-P в головном мозге крыс при экспериментальном паркинсоническом синдроме | 65 |
| 3.3. Проникновение субстрата гликопротеина-P – фексофенадина в головной мозг при экспериментальном паркинсоническом синдроме | 68 |
| 3.4. Проницаемость гематоэнцефалического барьера при экспериментальном паркинсоническом синдроме | 72 |
| 3.5. Выраженность окислительного стресса при экспериментальном паркинсоническом синдроме | 74 |
| 3.6. Разработка и валидация методики количественного определения ротенона в коре больших полушарий головного мозга крыс методом ВЭЖХ | 77 |
| 3.7. Проникновение ротенона в головной мозг крыс при индукции активности гликопротеина-P..... | 83 |
| 3.8. Влияние индукции гликопротеина-P в гематоэнцефалическом барьере на развитие экспериментального паркинсонического синдрома, вызванного нейротоксином ротеноном | 86 |
| ОБСУЖДЕНИЕ | 90 |
| ЗАКЛЮЧЕНИЕ | 97 |

| | |
|--|-----|
| ВЫВОДЫ | 98 |
| ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ..... | 100 |
| ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ | 101 |
| СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ..... | 102 |
| СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ..... | 105 |

ВВЕДЕНИЕ

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 [197].

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 [208]. Кроме того, Pgp, локализуясь базолатерально в гематоликворном барьере, выводит вещества через цереброспинальную жидкость [77].

Субстратами Pgp является широкий спектр биологически активных веществ и лекарственных препаратов, включающий химиотерапевтические средства, некоторые антибиотики, ингибиторы ВИЧ-протеазы, антидепрессанты, противоэпилептические и противопаркинсонические препараты [189, 11].

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 [12].

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 [29]. БП представляет собой результат взаимодействия генетических, конституциональных, возрастных, токсических факторов и механизмов [26]. 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 [62].

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 [172].

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 [42, 173, 222]. Для болезни Крейтцфельдта-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 PrP^{Sc}, что приводит к нейродегенерации [69].

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 [32]. 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 бромида и т.д. [7, 5, 1].

Разработан метод оценки активности Pgp в ГЭБ коры больших полушарий головного мозга крыс по анализу проникновения фексофенадина – маркерного субстрата белка-транспортера в ткань мозга [21, 25].

Изучено функционирование Pgp в ГЭБ при различных патологических процессах. Показано, что при острой гипоксической гипобарической гипоксии, соответствующей подъему на высоту 8000 м с экспозицией 30 мин, происходит повышение относительного количества Pgp в ГЭБ коры больших полушарий головного мозга крыс [25]. 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 [31, 33].

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-Р 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-Р в гематоэнцефалическом барьере снижает проникновение ротенона в кору больших полушарий головного мозга крыс и профилактирует развитие токсического паркинсонизма, вызванного нейротоксином.

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 ученых 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).

Апробация работы состоялась 3 октября 2024 года на заседании кафедр ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России: фармакологии; биологической химии; фармацевтической химии и фармакогнозии; управления и экономики фармации; фармацевтической технологии; сердечно-сосудистой, рентгенэндоваскулярной хирургии и лучевой диагностики (протокол № 1 от 03.10.2024).

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.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Функционирование гликопротеина-P в гематоэнцефалическом барьере

1.1.1. Структура и локализация гликопротеина-P

Гликопротеин-P (Pgp) – трансмембранный белок-транспортёр, кодируемый геном *MDR* (англ.: *multi-drug resistance*), который осуществляет эффлюкс широкого спектра биобактерицидов и ксенобиотиков за счёт энергии АТФ [63].

Pgp был впервые обнаружен и выделен из клеток яичников китайского хомячка Juliano R. L. и Ling V. в 1976 году, где данный белок участвовал в развитии множественной лекарственной устойчивости [128].

На сегодняшний день установлено, что Pgp имеет высокую экспрессию в эпителиальных клетках кишечника (апикальная мембрана энтероцитов в нижних отделах желудочно–кишечного тракта тощей, двенадцатиперстной, подвздошной и ободочной кишках), желчных протоках печени и проксимальных канальцах почек, гематоэнцефалическом барьере, кроветворных клетках, а также в ряде других органов и тканей, таких как протоки поджелудочной железы, надпочечники, плацента, эндометрий и яички [153, 73, 90,125].

Pgp у людей и кроликов кодируется геном *MDR1*, а у мышей и крыс – генами *mdr1a* (также называемым *mdr3*) и *mdr1b* (также называемым *mdr1*), причем гомологичные половины Pgp являются продуктом дублирования гена *MDR1* [81, 213]. Стоит отметить, что у крыс и мышей *mdr1a* преимущественно экспрессируется в тонком кишечнике и головном мозге, тогда как *mdr1b* – в надпочечниках, беременной матке и яичниках. Кроме того, оба гена экспрессируются в печени, почках, легких, сердце и селезенке [81]. При этом продукты трансляции генов *mdr1a* и *mdr1b* гомологичны на 85% [218], хотя активность продукта гена *mdr1a* выше, чем гена *mdr1b* [80].

Синтез Pgp происходит в эндоплазматическом ретикулуме в виде

промежуточного продукта с молекулярной массой 150-170 кДа и модифицируется в аппарате Гольджи, образуя основной гликозилированный белок перед его экспортом на поверхность клетки. Этот процесс гликозилирования связан с защитой Pgp от деградации и неправильной локализации [88].

Pgp человека состоит из двух гомологичных частей (N- и С- концевых половин), которые содержат по 610 аминокислот, объединенных друг с другом подвижным полипептидным мостиком («линкер»), образованным 60 аминокислотами [135]. Каждая половина Pgp включает в себя один трансмембранный домен (TMD, *англ.: transmembrane domain*), образованный шестью трансмембранными α -спиралями (TMHs, *англ.: transmembrane α -helices*) и нуклеотидсвязывающий домен (NBD, *англ.: nucleotide-binding domain*), содержащий каталитический сайт для связывания и гидролиза АТФ [44]. TMD непосредственно связан с соответствующим NBD посредством коротких спиралей внутриклеточного взаимодействия (ICHs, *англ.: short intracellular coupling helices*) (Рисунок 1).

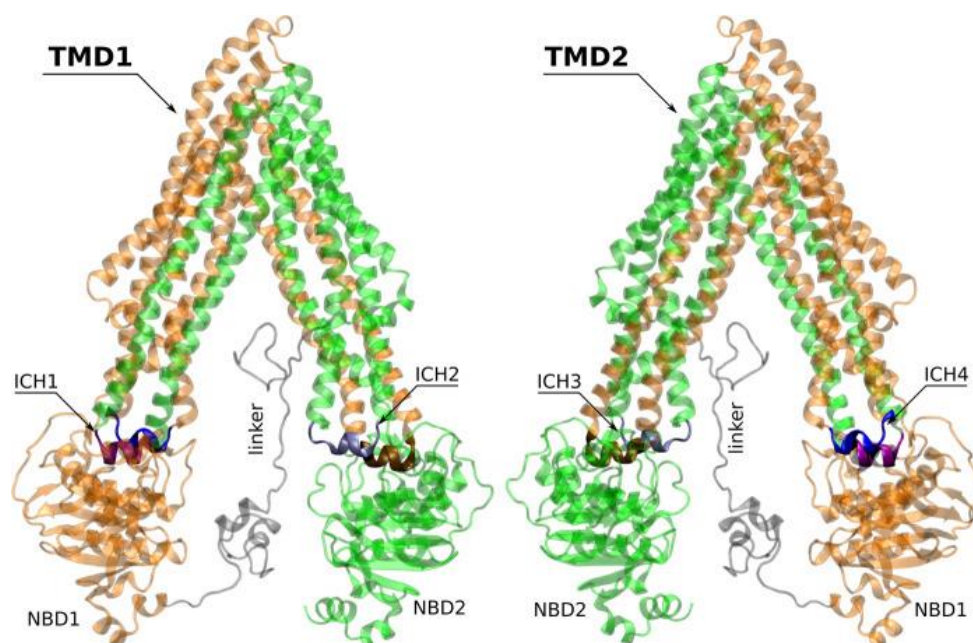


Рисунок 1 – Структурное изображение гликопротеина-P в конформации, направленной внутрь (Цит. по: Vonito С. А., 2020) [220]

Было обнаружено, что эти ICHs важны для созревания и сворачивания Pgp, а также участвуют в пути передачи сигнала между TMD и NBD. У белка-

транспортера есть большая полость, образованная TMDs обеих N- и C-концевых половин, называемая карманом связывания лекарственного средства (DBP, англ.: drug-binding pocket), которая может распознавать и вмещать несколько структурно различных субстратов [220]. Гибкая структура Pgp отвечает за трансляционные и вращательные движения во время механизма эффлюкса, который также включает в себя одновременное изменение расстояния между NBD и связан с входом молекулы, подходящей для эффлюкса [206, 111].

У Pgp имеются три субстрат-связывающих и один аллостерический сайт, структурно они отделены между собой, однако взаимодействуют друг с другом при выполнении белком его транспортной функции [12].

Функция мембранного транспортера зависит от энергии гидролиза АТФ. Предполагается, что связывание АТФ с NBD и его димеризация являются движущей силой этой функции. Энергия гидролиза вызывает полные конформационные изменения в TMD и катализирует эффлюкс субстрата через TMD и липидный бислой [82].

1.1.2. Функции гликопротеина-P

Pgp играет важную роль в абсорбции и элиминации лекарственных веществ и ксенобиотиков. Так, локализуясь в эпителиальных клетках кишечника, данный транспортер ограничивает всасывание его субстратов из ЖКТ в кровь. В желчных протоках печени и проксимальных канальцах почек способствует выведению субстратов с желчью и мочой соответственно. В ГЭБ Pgp снижает проникновение различных ксенобиотиков и/или их метаболитов в ЦНС. В гематоплацентарном барьере препятствует проникновению его субстратов в кровь плода [206, 210, 188, 39, 130].

Например, мыши с нокаутом по гену *mdr1a*, кодирующему Pgp, были в 50-100 раз более чувствительны к антигельминтному препарату ивермектину после его перорального введения, чем дикие животные, что было связано с более высокой биодоступностью ивермектина и его накоплением в головном мозге животных.

Таким образом, потенциальные центральные нейротоксические свойства ивермектина предотвращаются Pgp, который эффективно защищает от него головной мозг [210].

Pgp также играет важную роль в формировании множественной лекарственной устойчивости, которая впервые была обнаружена при лекарственной терапии рака, но затем стала ассоциироваться и с другими патологиями, такими как эпилепсия, некоторые аутоиммунные и инфекционные заболевания [148].

Кроме того, Pgp может участвовать в процессах иммуномодуляции, о чем свидетельствует его экспрессия во многих типах гемопоэтических клеток, таких как CD34+ (*англ.: cluster of differentiation*) стволовые клетки, c-kit+ стволовые клетки, CD56+ естественные клетки-киллеры и CD8+ цитотоксические Т-клетки [169, 174].

Pgp может взаимодействовать с большим количеством структурно разнообразных соединений, которые в соответствии с результатом их взаимодействия можно классифицировать как субстраты, ингибиторы и модуляторы. Соединения, активно транспортируемые Pgp, называются субстратами, а те, которые снижают транспортную функцию Pgp – ингибиторами. Модуляторы взаимодействуют с Pgp, уменьшая связывание с ним субстрата за счет отрицательной аллостерической модуляции [148].

Pgp обладает широкой субстратной специфичностью. Он осуществляет эффлюкс липофильных веществ массой от 300 до 2000 Да. К его субстратам относятся слабые органические основания, органические катионы, некоторые органические анионы и незаряженные соединения, в том числе полипептиды и их производные [197, 123].

1.1.3. Структура и свойства гематоэнцефалического барьера

Гематоэнцефалический барьер представляет собой структуру, разделяющую кровь и ЦНС и предотвращающую попадание патогенов, клеток крови и

нейротоксических компонентов плазмы в головной мозг. ГЭБ также является существенным препятствием для проникновения лекарственных веществ и других экзогенных соединений в центральную нервную систему [10]. ГЭБ отвечает за создание и поддержание гомеостаза нейронов, регулирование связи между периферией и ЦНС и обеспечение мозга питательными веществами. Это достигается за счет четырех основных механизмов:

- 1) низкой параклеточной диффузии гидрофильных соединений;
- 2) активного транспорта питательных веществ в мозг;
- 3) эффлюкса (оттока) гидрофобных молекул и ксенобиотиков из мозга в кровь;
- 4) регуляции трансэндотелиальной миграции циркулирующих клеток крови и патогенов [84].

ГЭБ образован эндотелиальными клетками микрососудов головного мозга, окруженными перицитами, базальной мембраной, и покрытыми терминалями астроцитов (Рисунок 2) [127, 186].

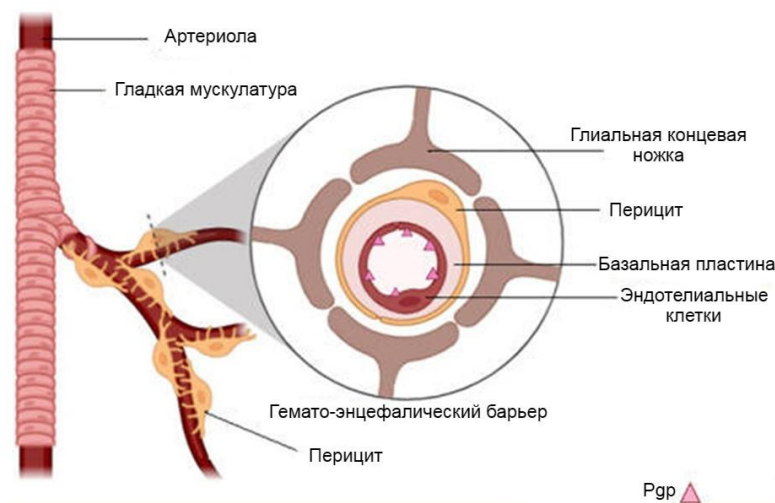


Рисунок 2 – Локализация Pgp в ГЭБ (Цит. по: Pathan N., 2021) [164]

Эндотелиальные клетки сосудов головного мозга, в отличие от других сосудистых эндотелиальных клеток, выстилающих периферические кровеносные сосуды, обладают отличительными морфологическими, структурными и функциональными характеристиками. К ним относятся следующие: (1) экспрессия плотных контактов (TJ, *англ.: tight junctions*), герметизирующих парацеллюлярные

пути между соседними эндотелиальными клетками, предотвращая тем самым нерегулируемый проход полярных (водорастворимых) молекул между кровью и мозгом; (2) отсутствие фенестраций; (3) отсутствие пиноцитарной активности; (4) экспрессия белков-транспортеров, регулирующих прохождение незаменимых молекул (включая питательные вещества и незаменимые аминокислоты) и одновременно препятствующих прохождению потенциально нежелательных веществ (как эндогенных, так и ксенобиотиков). К таким транспортерам относятся гликопротеин-P, белок устойчивости рака молочной железы (BCRP, *англ.: breast cancer resistance protein*), полипептиды, транспортирующие органические анионы (OATP, *англ.: organic anion transporting polypeptides*); (5) присутствие ферментов, метаболизирующих лекарственные вещества и ксенобиотики, таких как изоферменты CYP 450 (*англ.: Cytochrome P450*) (CYP1B1 и CYP2U1, CYP-3AF) [129].

Плотные контакты являются главными компонентами, отвечающими за структурную целостность гематоэнцефалического барьера. Молекулярные составляющие плотных контактов можно разделить на трансмембранные, внутриклеточные (цитоплазматические) и адгерентные белки (Рисунок 3) [59].

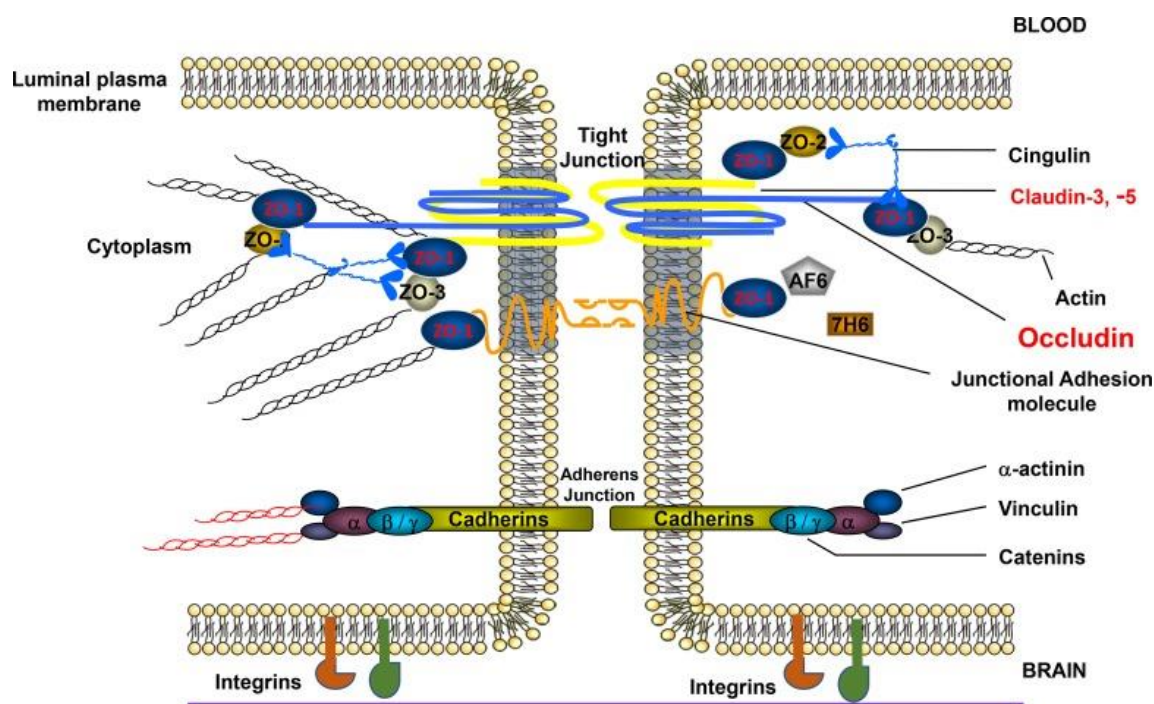


Рисунок 3 – Молекулярная организация белковых комплексов плотных контактов в гематоэнцефалическом барьере (Цит. по: Abdullahi W., 2018) [41]

К трансмембранным белкам относят окклюдин, соединительные молекулы адгезии (JAM, *англ.: junctional adhesion molecules*) и белки семейства клаудинов; к внутриклеточным белкам – PDZ-белки, такие как zonula occludens (ZO-1, ZO-2, ZO-3), и, так называемые не PDZ-белки, такие как цингулин (*англ.: cingulin*) и парацингулин (*англ.: paracingulin*). Они участвуют в образовании плотных контактов, соединяясь с белками цитоскелета (актином) и связывая их с трансмембранными белками [24]. Адгерентные белки представлены в основном кадгеринами [103].

Окклюдин – интегральный белок плазматической мембраны массой 65 кДа, содержащий 522 аминокислоты. Он состоит из четырех трансмембранных доменов, длинного COOH-концевого цитоплазматического домена и короткого NH₂-концевого цитоплазматического домена. Две внеклеточные петли окклюдина и клаудина, происходящие из соседних клеток, образуют парацеллюлярный барьер, в то время как цитоплазматический домен окклюдина непосредственно связан с белками ZO. Окклюдин высоко экспрессируется в эндотелии капилляров головного мозга по сравнению с невральными тканями и, по-видимому, является регуляторным белком, который играет решающую роль в параклеточной проницаемости [129]. Окклюдин собирается в димеры и олигомеры более высокого порядка, что является характеристикой, необходимой для ограничения параклеточной проницаемости. Выявлена измененная экспрессия окклюдина при различных патологиях ЦНС [211].

Клаудины имеют сходную с окклюдином мембранную топографию, они представляют собой белки массой от 20 до 24 кДа, которые формируют гомофильные и гетерофильные взаимодействия между соседними эндотелиальными клетками и способствуют физиологическому «запечатыванию» плотного контакта. Клаудины связаны с цитоплазматическими белками, включая ZO-1, ZO-2 и ZO-3, через их карбоксильный конец. В эндотелиальных клетках микрососудов головного мозга были обнаружены различные изоформы клаудина, включая клаудин-1, -3 и -5 [75]. В экспериментальных моделях инсульта и воспаления сообщалось об измененной экспрессии клаудина-5, которая

коррелирует с повышенной парацеллюлярной проницаемостью [120]. Недавно было показано, что экспрессия клаудина-1 снижается в ГЭБ *in vivo* после воздействия человеческого пептида β -амилоида [46]. Исчезновение клаудина-5 из плотных контактов может привести к нарушению целостности ГЭБ, поскольку у мышей, нокаутных по клаудину-5, проницаемость ГЭБ возрастает, и они умирают вскоре после рождения [199]. Greene С. и соавт. (2019) показали, что клаудин-5 играет важную роль в регуляции проницаемости эндотелия при нескольких патологических процессах, таких как воспаление, травма, токсическое повреждение [105].

Клаудины и окклюдины образуют внеклеточный компонент TJ и оба необходимы для формирования ГЭБ.

Соединительные молекулы адгезии (JAM) – белки массой 40 кДа, которые относятся к суперсемейству иммуноглобулинов. Они имеют один трансмембранный домен, а их внеклеточная часть представляет собой две петли, подобные иммуноглобулинам, которые образованы дисульфидными связями. Исследования на срезах мозга грызунов показали, что JAM-1 и JAM-3 экспрессируются в кровеносных сосудах головного мозга. Также была выявлена их роль в межклеточной адгезии и трансмиграции моноцитов через ГЭБ [58].

Белки *Zonula occludens* (ZO-1, ZO-2 и ZO-3), цингулин и некоторые другие белки необходимы для функционирования плотных контактов, поскольку они образуют цитоплазматический мост, соединяющий белки плотных контактов (клаудин, окклюдин) с цитоскелетом клетки. ZO-1 (220 кДа), ZO-2 (160 кДа) и ZO-3 (130 кДа). Данные белки имеют сходство последовательностей друг с другом и принадлежат к семейству белков, известных как мембраноассоциированные гуанилаткиназоподобные белки (MAGUKs, *англ.: membrane-associated guanylate kinases*) [40]. Важно отметить, что актин, основной белок цитоскелета, связывается с COOH-концом ZO-1 и ZO-2, что стабилизирует трансмембранные элементы и обеспечивает структурную поддержку эндотелиальных клеток.

ZO-1 – первый идентифицированный белок плотных контактов,

связывающий трансмембранные белки с актиновым цитоскелетом. Данный белок может также действовать как сигнальная молекула, которая передает информацию о целостности плотных контактов внутрь клетки, или наоборот. Было показано, что ZO-1 локализуется в ядре эндотелиальных клеток в условиях пролиферации или повреждения. Аналогичным образом, известно, что ZO-2 связывает компоненты плотных контактов, сигнальные молекулы и факторы транскрипции [235]. ZO-3 экспрессируется в ГЭБ, но его точная роль в образовании плотных контактов и/или поддержании их целостности не была выяснена. Было показано, что патологии ЦНС, сопровождающиеся развитием окислительного стресса, связаны со снижением экспрессии ZO-1 в ГЭБ [201].

Кадгеринины участвуют в формировании специализированных клеточно-клеточных взаимодействий. Опосредованная кадгеринами сигнализация необходима для целостности слоя эндотелиальных клеток и пространственной организации новых микрососудов. Внутриклеточно кадгеринины взаимодействуют с актиновым цитоскелетом и динамически регулируются сигнальными путями, которые контролируют морфологию клеток, ангиогенез, экстравазацию лейкоцитов и парацеллюлярную проницаемость [103].

1.1.4. Особенности функционирования гликопротеина-P в гематоэнцефалическом барьере

В ГЭБ Pgp экспрессируется в основном на люминальной поверхности эндотелия капилляров мозга (Рисунок 2), где он выполняет двойную функцию: выводит различные субстраты из паренхимы мозга, а также ограничивает поглощение веществ непосредственно на люминальной стороне эндотелиальных клеток [164].

В другом исследовании продемонстрировано присутствие Pgp на люминальной и аблюминальной плазматических мембранах эндотелиальных клеток, что означает, что экспорт субстратов происходит не только в направлении

кровеносных капилляров, но и в интерстициальную жидкость мозга с аблюминальной стороны. Кроме того, была показана субклеточная локализация Pgp вдоль ядерной оболочки эндотелиальных клеток и в плазматических мембранах перицитов и астроцитов [33]. Локализация Pgp вдоль ядерной оболочки может служить защитным механизмом, который может ограничивать проникновение ксенобиотиков в ядерный матрикс [48].

Pgp также обнаружен в нейронах и микроглии. Кроме того, Pgp экспрессируется на базолатеральной стороне барьера между кровью и цереброспинальной жидкостью (ЦСЖ), что обеспечивает эффлюкс его субстратов в ЦСЖ [77].

Таким образом, Pgp в ГЭБ играет защитную роль, препятствуя проникновению в мозг своих субстратов, таких, например, как ингибиторы ВИЧ-протеазы (ампренавир, индинавир, лопинавир, нелфинавир, ритонавир, саквинавир), антидепрессанты (амитриптилин, циталопрам, дезипрамин, доксепин, флуоксетин, флувоксамин, имипрамин, нортриптилин, пароксетин, тримипрамин, венлафаксин), противоэпилептические (диазепам, фенитоин, ламотриджин, леветирацетам и фенобарбитал) и противопаркинсонические препараты (леводопа, бромокриптин, перголид и прамипексол) [53, 226].

Выделяют следующие основные механизмы регуляции Pgp: изменение экспрессии гена *MDR1*, кодирующего Pgp, посредством влияния на его промотор; полиморфизм гена *MDR1*; увеличение дозы гена – амплификация участка генома, содержащего ген *MDR1*; стабилизация мРНК гена *MDR1*; влияние микроРНК на экспрессию Pgp; передача Pgp между клетками; изменение активности синтезированного белка-транспортера; влияние на гидролиз АТФ; изменение свойств цитоплазматических мембран [37, 22].

При этом основными среди них являются изменение экспрессии гена *MDR1* и активности уже синтезированного белка.

На данный момент выделен ряд транскрипционных факторов, изменяющих экспрессию *MDR1* и, таким образом, регулирующих активность Pgp в ГЭБ.

Было показано, что ряд ядерных рецепторов (PXR, LXR α и LXR β , PPAR α ,

CAR, AhR, Nrf2) влияет на транскрипцию *MDR1*. Ассоциированные с ними лиганды очень разнообразны и включают в себя стероидные гормоны, оксистеролы, витамины, лекарственные препараты и токсины окружающей среды [187].

Прегнан X рецептор (PXR, *англ.: pregnane X receptor*) активируется рядом эндогенных и ксенобиотических лигандов, включая стероиды, глюкокортикоиды и различные лекарственные препараты. При активации PXR может индуцировать транскрипцию *MDR1*. Воздействие лигандов PXR – рифампина и гиперфорина - сопровождалось значительным повышением экспрессии мРНК, белка и транспортной активности Pgp в эндотелиальных клетках капилляров головного мозга свиньи и в капиллярах головного мозга, выделенных из трансгенных мышей, экспрессирующих человеческий PXR (hPXR) [70, 217].

Печеночные X рецепторы (LXR α и LXR β , *англ.: Liver X receptors alpha and beta*) играют важную роль в транскрипционной регуляции генов, участвующих в липидном обмене и холестериневом гомеостазе. Активация LXR с помощью синтетического агониста T0901317 приводила к усилению экспрессии белка Pgp в капиллярах головного мозга мыши. Этот вывод был подтвержден в модели ГЭБ *in vitro* с использованием эндотелиальных клеток капилляров мозга крупного рогатого скота, где 24-часовая обработка лигандами LXR (оксистеролами 24S-гидроксихолестерином и 27-гидроксихолестерином, а также T0901317) значительно повышала экспрессию мРНК и белка Pgp [92].

Рецептор активируемый пролифератором пероксисом (PPAR α , *англ.: Peroxisome proliferator-activated receptor alpha*), основной регулятор липидного обмена, активируемый пищевыми липидами и ксенобиотиками, также вовлечен в регуляцию Pgp. Воздействие на капилляры мозга крыс *in vitro*, а также на мозг мышей *in vivo* лигандов PPAR α (линолевой кислоты, клофибрата или компонентов перфтор-алкильной противопожарной пены) увеличивало экспрессию белка Pgp и его эффлюксную активность в ГЭБ. Эти эффекты блокировались введением GW6471 – специфического антагониста PPAR α [177].

Экспрессия Pgp также регулируется конститутивным андростановым рецептором (CAR, *англ.: constitutive androstane receptor*). Обработка капилляров мозга мыши ТСРОВОР (мышинный специфический лиганд CAR) или капилляров мозга крысы фенобарбиталом (активатор CAR) значительно повышала экспрессию и активность белка Pgp, о чем свидетельствовало усиление люминального накопления субстрата Pgp – NBD-CSA ([N-(4-nitrobenzofurazan-7-yl)-D-Lys8]-cyclosporin A) [230, 204].

Лиганды рецептора ариловых углеводородов (AhR, *англ.: aryl hydrocarbon receptor*) состоят в основном из загрязнителей окружающей среды, таких как полициклические ароматические углеводороды, галогенированные ароматические углеводороды и диоксины. Обработка капилляров головного мозга крысы лигандом AhR-рецепторов β -наптофлавоном усиливала экспрессию белка Pgp и его транспортную активность [52].

В промоторной области гена *MDR1* человека обнаружен NF- κ B-элемент (*англ.: nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*), и, соответственно, активация NF- κ B приводит к повышению транскрипции *MDR1* и, таким образом, экспрессии Pgp. Фактор NF- κ B считается важным в транскрипции *MDR1*, поскольку он является посредником ряда стресс-индуцированных сигналов, включая воспаление и окислительный стресс [145].

Было показано, что окислительный стресс, вызванный пероксидом водорода, вызывает зависимое от концентрации повышение экспрессии и активности Pgp *in vitro* посредством активации NF- κ B и транскрипции. Судя по имеющимся экспериментальным данным, отражающим время воздействия до 24 ч, в ответ на окислительный стресс происходит повышение уровня Pgp в ГЭБ, вероятно, в качестве компенсаторной защитной меры. Однако влияние хронического воздействия окислительного стресса, которое может иметь большее значение при неврологических заболеваниях, на экспрессию Pgp остается неизвестным [70].

Специфический белок 3 (Sp3, *англ.: specificity protein 3*), член семейства транскрипционных факторов Sp, был идентифицирован в эндотелиальных клетках

головного мозга человека. Gromnicova R. и соавт. (2012) показали, что Sp3 ассоциируется с GC-боксом в промоторной области *MDR1* [106].

Воспаление может влиять на экспрессию Pgp в эндотелиальных клетках капилляров мозга. Обработка церебральных эндотелиальных клеток RBE4 с помощью TNF α (англ.: *tumor necrosis factor α*) индуцировала экспрессию мРНК Pgp (через 2-24 ч) и экспрессию белка (после 6-24 ч инкубации), что приводило к снижению поглощения клетками субстрата Pgp винбластин [221]. Напротив, в эндотелиальных клетках головного мозга морской свинки обработка IL-1 β , IL-6 и TNF α в течение 24 ч снижала уровень мРНК Pgp и его транспортную функцию [179].

Nrf2 (англ.: *nuclear factor erythroid 2-related factor 2*) – редокс-чувствительный фактор транскрипции. Его экспрессия увеличивается при развитии окислительного стресса и направлена на защиту клетки от воздействия свободных радикалов. В нормальных условиях Nrf2 экспрессируется в тканях животных, но сохраняется в неактивной форме в цитозоле за счет связывания с Kelch-подобным ECH-ассоциированным белком 1 (Keap1, англ.: *kelch-like ECH-associated protein 1*). Показано, что в условиях окислительного стресса комплекс Nrf2-Keap1 диссоциирует, Nrf2 мигрирует в ядро и может увеличивать экспрессию гена *MDR1* [188, 67].

Таким образом, в головном мозге Pgp локализуется преимущественно в эндотелиальных клетках гематоэнцефалического барьера и вместе с плотными межклеточными контактами обеспечивает защиту головного мозга от воздействия ксенобиотиков. Pgp имеет множество механизмов регуляции (основным из которых является изменение экспрессии гена *MDR1*, кодирующего данный белок-транспортер), что делает его высокочувствительным и адаптивным к воздействию широкого спектра патологических агентов.

1.2. Болезнь Паркинсона, паркинсонизм

1.2.1. Эпидемиология болезни Паркинсона

Болезнь Паркинсона (БП) – социально значимое хроническое медленно

прогрессирующее заболевание центральной нервной системы, в основе патогенеза которого лежит дегенерация дофаминергических нейронов черной субстанции среднего мозга и ряда других отделов головного мозга [30].

БП является одним из наиболее часто встречающихся нейродегенеративных заболеваний и занимает второе место по распространенности в мире после болезни Альцгеймера [151, 19]. В ряде исследований отмечается тенденция к росту заболеваемости БП во многих странах за последние 30 лет [102]. Согласно популяционным исследованиям, распространенность БП составляет от 120 до 180 случаев на 100 000 населения, заболеваемость – от 12 до 20 на 100 000 населения [223]. В Российской Федерации распространенность данного заболевания варьирует от 48,9 до 139,9 на 100 000 населения [35]. Многие авторы считают, что данные показатели занижены, так как диагностика данного заболевания на ранних стадиях развития вызывает трудности, в связи со сходной клинической картиной с другими экстрапирамидными патологиями [4].

Мета-анализ мировых данных свидетельствует о росте распространенности БП с возрастом (41 на 100 000 – в 40-49 лет; 107 на 100 000 – в 50-59 лет; 173 на 100 000 – в 55-64 года; 428 на 100 000 – в 60-69 лет; 425 на 100 000 – в 65-74 года; 1087 на 100 000 – в 70-79 лет; и 1903 на 100 000 – в возрасте старше 80 лет), а также показывает особенности распределения в зависимости от географии (распространенность среди пациентов из Северной Америки, Европы и Австралии составляет 1601 на 100 000, а среди пациентов из Азии – 646 на 100 000) [214].

БП чаще встречается у мужчин, чем у женщин, пик распространенности приходится на возрастную группу ≥ 90 лет. [97]. Заболеваемость одинакова у мужчин и женщин в возрасте до 50 лет (соотношение М/Ж $< 1,2$) и более чем в 1,6 раз выше у мужчин, чем у женщин старше 80 лет [160].

Заболеваемость БП неуклонно растет и по прогнозам с 2005 по 2030 г. число людей, страдающих данной патологией, увеличится в 2 раза [180]. По оценкам Global Burden of Disease Study, число случаев БП удвоится, примерно с 6 млн в 2015 г. до более чем 12 млн в 2040 г., став одним из ведущих источников инвалидизации [212].

1.2.2. Биохимические механизмы развития болезни Паркинсона

Согласно современным представлениям, около 5 – 7% случаев БП представлены наследственными формами, тогда как большинство случаев являются спорадическими и имеют мультифакториальную природу [57.].

Семейная БП обусловлена мутациями в гене альфа-синуклеина (*PARK1*). На сегодняшний день известны три миссенс-мутации, связанные с аутосомно-доминантной БП (A53T, A30P, E46K). Ни одна из них не была обнаружена при спорадической БП или у здоровых индивидуумов [149, 45]. Также к мутациям, обуславливающим повышенный риск развития БП, относят мутации в гене убиквитин-лигазы Parkin (*PARK2*); мутации, непосредственно усиливающие окислительный стресс или нарушающие нормальное функционирование митохондрий, как, например, мутации в гене антиоксиданта DJ-1 (*PARK7*) и в гене киназы *PINK1* [134.].

В основе спорадических случаев БП может лежать взаимодействие генетических факторов и экзогенных воздействий [57, 227].

Ведущая роль в развитии БП отводится пресинаптическому белку альфа-синуклеину. Именно данный белок является основным компонентом телец Леви, которые выявляются у больных как с семейной БП с мутациями в гене альфа-синуклеина, так и со спорадическими формами заболевания [203, 16, 36]. Для проявления двигательной дисфункции, характерной для данного заболевания, требуется потеря 60% дофаминергических нейронов. Однако более поздние данные свидетельствуют о сокращении лишь 30% дофаминергических нейронов в черной субстанции, но о потере около 60% их дендритов [134.].

В недавнем исследовании Vila M. (2019) указал на значение нейромеланина в тельцах Леви в патогенезе БП. Так, была разработана модель грызунов, в которой сверхэкспрессируется тирозиназа человека, что приводит к прогрессирующей выработке нейромеланина, приближающегося к уровню, обнаруженному в мозге пожилого человека. При достижении определенного порога нейромеланина у этих животных развивается патология, напоминающая БП. Если нейромеланин играет

ключевую роль в инициировании потери нейронов, то у пациентов с БП его накопление может быть более значительным или ускоренным по сравнению с другими пациентами. Такой сценарий может быть обусловлен повышением уровня ферментов, связанных с тирозиназой, или повышенным уровнем цитозольного дофамина, который подвергается метаболизму и полимеризации с образованием нейромеланина [228].

Как ключевые механизмы развития болезни рассматриваются такие процессы, как митохондриальная дисфункция, окислительный стресс и нарушение убиквитин-протеасомной системы [16,196, 157].

Митохондриальная дисфункция при БП связана с ингибированием митохондриального комплекса I в дофаминергических нейронах [152]. Так, например, у людей, злоупотребляющих наркотическим веществом МРТР (1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридином), обнаруживались симптомы паркинсонизма. Известно, что активные метаболиты данного вещества могут избирательно проникать в дофаминергические нейроны и ингибировать в них митохондриальный комплекс I [229]. Сходная клиническая картина возникает у крыс при введении им нейротоксина ротенона, который также является ингибитором митохондриального комплекса I [162]. Снижение активности митохондриального комплекса I наблюдается в цитоплазматических гибридных клеточных линиях, содержащих митохондриальные ДНК пациентов с БП [56]. Одно из исследований показало, что нейроны компактной части черной субстанции (кчЧС) у умерших пациентов с БП имеют большое количество делеций митохондриальной ДНК (мтДНК) по сравнению с другими популяциями нейронов в мозге и нейронами контрольной группы пациентов того же возраста [108]. В другом исследовании Kraytsberg Y. и соавт. (2006) показали, что нейроны черной субстанции у пациентов с БП содержат высокие уровни клонально расширенных соматических делеций мтДНК, ведущих к митохондриальной дисфункции [147.]. Накопление белка альфа-синуклеина, составляющего основу телец Леви, возможно, ингибирует митохондриальный комплекс I [193, 192].

Нарушение убиквитин-протеасомной системы также является важным

механизмом развития БП. Основная функция убиквитин-опосредованного протеолиза заключается в деградации мутантных и поврежденных белков. При БП мутации в генах альфа-синуклеина – *SNCA*, паркина – *PARK2* и убиквитин-карбокси-концевой гидролазы L1 – *UCHL1* приводят к дефекту убиквитин-протеасомной системы и, как следствие, накоплению большого количества α -синуклеина, индуцируя образование телец Леви и в дальнейшем гибель нейронов [35]. Екимова И.В. и соавт. (2018) показали, что при введении специфического ингибитора ферментативной активности протеасом лактацистина с помощью микроинъекций в кЧС крыс происходит образование и накопление амилоидных белков, что приводит к нейродегенеративной патологии в нигростриатной системе [14].

Окислительный стресс играет важную роль в прогрессировании БП [100], влияя на: стабильность нуклеиновых кислот путем окисления РНК, увеличение мутаций мтДНК и запуск синтеза транслизинов; гомеостаз белков путем ускорения агрегации α -синуклеина, агрегации паркина и диссоциации протеасомы; модулирование высвобождения дофамина путем активации АТФ-чувствительных калиевых каналов и инактивации нейрональных никотиновых ацетилхолиновых рецепторов (nAChR, *англ.: nicotinic acetylcholine receptor*) [68]. В черной субстанции при БП обнаруживается значительное увеличение содержания железа по сравнению с контрольной группой здоровых людей, что способствует окислительному стрессу и гибели дофаминергических нейронов [100]. О том, что железо является важным звеном патогенеза, свидетельствуют экспериментальные работы, показывающие, что патология, индуцированная МРТР или 6-гидроксидофамином (6-OHDA, *англ.: 6-hydroxydopamine*), подавляется железохелаторами [98].

Альфа-синуклеин является модулятором окислительного повреждения. Так, мыши не имеющие альфа-синуклеина, устойчивы к митохондриальным токсинам [144], в то время как дофаминергические нейроны черной субстанции уязвимы для дегенерации и митохондриальной дисфункции после введения паркинсонического нейротоксина МРТР мышам, трансгенным по альфа-синуклеину человека [118].

Недавнее исследование показало, что у пациентов с БП по сравнению с контрольной группой в плазме крови уровень соединений, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой, и оксида азота значительно повышен, а уровень супероксиддисмутазы, глутатионпероксидазы, церулоплазмينا, витамина Е, витамина С, меди, цинка и селена снижен. Эти данные показывают, что окислительный стресс может играть роль в потере дофаминергических нейронов в кЧС и участвовать в патогенезе БП [156, 143]. Неясно, является ли образование альфа-синуклеиновых агрегатов первичным или вторичным по отношению к окислительному стрессу, поскольку оба признака – истощение восстановленного глутатиона и наличие телец Леви – присутствуют в семейной форме БП и при ранней бессимптомной БП [134].

Не исключается роль нейровоспаления в патогенезе БП. Впервые о нем сообщили McGeer P.L. и соавт. (1988) [184]. Глиоз является частой neuropathological находкой при посмертном исследовании пациентов с БП [126]. Активированная микроглия может синтезировать и высвобождать цитотоксические факторы, такие как цитокины, активные формы кислорода [110].

Таким образом, все вышеизложенные данные показывают важность глубокого биохимического изучения звеньев патогенеза БП, целью которого является выявление новых мишеней для терапии и профилактики данного нейродегенеративного заболевания.

1.2.3. Токсический паркинсонизм

Паркинсонизм – это двигательный синдром, который проявляется ригидностью, тремором и брадикинезией. Причинами паркинсонизма являются болезнь Паркинсона и вторичные формы паркинсонизма (сосудистый, лекарственный, токсический, посттравматический, опухоли, гидроцефалия, постэнцефалический) [198].

Токсический паркинсонизм – форма паркинсонизма, вызванная токсическими веществами, такими как гербициды, пестициды, тяжелые металлы [2].

Известно, что множество пестицидов, используемых в сельском хозяйстве, вызывают паркинсонизм. Недавний мета-анализ 46 исследований со всего мира показал, что пестициды увеличивают относительный риск развития паркинсонизма в 1,6 раз (95% ДИ: 1,40, 1,88) [124].

Ротенон – митохондриальный яд, который ингибирует I комплекс цепи переноса электронов [142]. Он на протяжении десятилетий активно использовался в качестве инсектицида в сельском хозяйстве и домашнем садоводстве. На данный момент он широко применяется в качестве рыбацида для искоренения инвазивных видов рыб в озерах [43]. Он вызывает селективную дегенерацию дофаминергических нейронов, накопление цитоплазматических агрегатов альфа-синуклеина и развитие паркинсонического синдрома, который проявляется брадикинезией, ригидностью мышц, тремором и некоторыми немоторными признаками [96, 137]. Показано, что у людей, которые когда-либо использовали ротенон, риск возникновения БП увеличивается в 2,5 раза [191].

Паракват (1,1'-диметил-4,4'-дихлорид бипиридиния) – это гербицид, представляющий по структуре четвертичное аммониевое соединение. С 1962 года он является одним из наиболее широко используемых пестицидов в мире. Паракват способен проникать через ГЭБ, вероятно, с помощью нейтрального транспортера аминокислот [138]. Он проникает в нигральные дофаминергические терминали транспортером дофамина после преобразования в паракрават [158]. В моделях животных он вызывает паркинсонический синдром, который имеет многие особенности БП. Он увеличивает перекисное окисление липидов, снижает уровень антиоксидантов, ухудшает митохондриальную функцию, повышает экспрессию и агрегацию альфа-синуклеина [117, 95] и вызывает избирательную гибель дофаминергических нейронов черной субстанции. По крайней мере пять исследований сообщили об увеличении риска БП, связанного с воздействием параквата [191, 166, 163, 94], в то время как другие не обнаружили никакой связи [155].

Хлорорганические соединения представляют собой класс пестицидов, которые также часто ассоциируются с развитием БП. Они включают дихлордифенилтрихлорэтан (ДДТ), альдрин, дильдрин, эндрин, эндосульфат,

бензолгексахлориды. Некоторые исследования обнаружили удвоение риска паркинсонизма при воздействии данных пестицидов [175, 165, 87].

Дитиокарбаматы представляют собой класс часто используемых фунгицидов, которые включают манеб (этиленбисдитиокарбамат марганца), цинеб (этиленбисдитиокарбамата цинка), зирам (диметилбисдитиокарбамат цинка) и другие аналоги. У мышей манеб вызывает селективную дофаминергическую нейродегенерацию. Он нарушает функцию митохондрий, повышает окислительный стресс и ингибирует протеасомную функцию [136]. Зирам повреждает дофаминергические нейроны, ингибируя E-1 лигазу убиквинтин-протеасомной системы [236]. Эпидемиологические исследования, которые оценивали воздействие дитиокарбаматов, обнаружили, что повышенный риск развития БП связан с приемом манеба и цинеба [168].

Фосфорорганические инсектициды включают малатион, метилпаратион, хлорпирифос, диазинон и многие другие. Некоторые из них были запрещены, но многие остаются на рынке и до сих пор широко используются. Их инсектицидное свойство связано с ингибированием ацетилхолинэстеразы, что приводит к чрезмерной активности холинергической нейротрансмиссии [234]. Существуют данные об их потенциальной дофаминергической токсичности и воздействии на биологические пути, связанные с паркинсонизмом. У грызунов хлорпирифос снижал иммунореактивность нигральной тирозингидроксилазы [185]. В культуре клеток PC12 хлорпирифос ингибировал активность митохондриального комплекса I, изменял морфологию и подвижность митохондрий нейронов, а также увеличивал маркеры окислительного стресса [185]. Некоторые эпидемиологические исследования оценивали риск возникновения паркинсонизма, связанного с фосфорорганическими инсектицидами, в частности с предполагаемым воздействием диазинона или хлорпирифоса. Gatto N. M. и соавт. (2009) обнаружили, что потребление воды из частных колодцев, расположенных в районах с документально подтвержденным историческим использованием данных пестицидов, связано с повышенным риском развития БП [233]. Два исследования обнаружили повышенный риск развития БП с профессиональным использованием

метилпиратиона [191, 167].

Питетроидные инсектициды используются уже несколько десятилетий и являются наиболее часто используемыми инсектицидами во всем мире. Их первичная токсичность возникает в результате нарушения потенциал-зависимых натриевых каналов. В настоящее время перметрин используется для пропитки одежды и военной формы в качестве репеллента от насекомых. Он может ингибировать митохондриальный комплекс I [215], и в высоких концентрациях снижает целостность митохондрий [205]. По крайней мере, два эпидемиологических исследования обнаружили тенденцию к увеличению риска развития БП, связанного с употреблением перметрина [191, 166].

Многочисленные исследования показывают связь БП с тяжелыми металлами. Накопление меди в мозге приводит к снижению уровня дофамина, агрегации альфа-синуклеина и снижению уровня защитного фактора выживания нейронов – супероксиддисмутазы. 20-летнее исследование связи между профессиональным воздействием тяжелых металлов и БП обнаружило, что у лиц с хроническим воздействием меди риск развития БП повышен в 2,5 раза [161]. Марганец может также повысить риск развития БП. Хроническая интоксикация марганцем, по клиническим проявлениям, может напоминать идиопатическую БП [49]. Воздействие свинца может привести к двух-трехкратному увеличению риска развития БП. Профессиональное воздействие свинца, особенно длительное, может повышать его концентрацию в организме человека, увеличивая риск развития паркинсонизма [51]. Ртуть является известным нейротоксином, способным вызывать гибель нейронов. Исследования в отношении ее участия в патогенезе паркинсонизма до сих пор противоречивы. По имеющимся данным, ртуть может уменьшать количество нейронов в головном мозге и вызывать двигательные расстройства, включая тремор и потерю произвольных мышечных движений [119].

Таким образом, пестициды, гербициды, тяжелые металлы, широко используемые в различных сферах жизнедеятельности, могут выступать этиологическими агентами токсического симптоматического паркинсонизма.

1.2.4. Биохимические механизмы развития экспериментальных моделей болезни Паркинсона

В настоящее время существуют 2 группы экспериментальных моделей БП на животных: генетические и токсические.

Генетические модели базируются на редактировании ряда генов, которые регулируют синтез специфических белков [13].

Альфа-синуклеиновая модель основана на выключении гена альфа-синуклеина либо наоборот – на чрезмерной его экспрессии. Чрезмерная экспрессия альфа-синуклеинового гена приводит к прогрессирующему снижению двигательной активности мышей, а в нейронах наблюдаются изменения, напоминающие Леви-подобную патологию у человека [150]. Однако, у линии мышей с гиперэкспрессией альфа-синуклеина в nigrostriарной дофаминергической системе данные патологические изменения возникают довольно редко, в основном они выявляются в нервно-мышечных соединениях и спинном мозге [83]. У мышей с нокаутным геном альфа-синуклеина происходит снижение двигательной активности в тесте открытое поле, а также уменьшение уровня дофамина в полосатом теле [85].

Паркин-нокаутная модель основана на удалении 3 экзонов гена *Park2* [159]. Паркин представляет собой лигазу E3, опосредующую полиубиквитинирование белков при подготовке их деградации протеасомным комплексом [194]. Одно из исследований показало, что при выключении функции паркина у мышей повышен уровень внеклеточного дофамина в стриатуме, снижена синаптическая возбудимость шипиковых стриарных нейронов средней величины, однако не происходит достоверного изменения поведения в тесте открытое поле и количество дофаминергических нейронов в черной субстанции не отличается от контрольной группы [159].

DJ-1 нокаутная модель заключается в удалении 2 экзонов гена *PARK7* [159]. Функция DJ-1 заключается в защите нейронов от окислительного стресса. Мутация в гене *PARK7* приводит к аутосомно-рецессивному паркинсонизму с ранним

началом [86]. У DJ-1 нокаутных мышей повышается чувствительность нейронов к окислительному стрессу, воздействию токсинов ротенона и МРТР. Однако в стриатуме у данных мышей количество дофамина и дофаминовых переносчиков не изменяется, наблюдается лишь небольшой дефицит двигательной активности в тесте открытое поле [114].

Токсические модели БП основаны на использовании нейротоксинов, которые повреждают дофаминергические нейроны в черной субстанции и хвостом ядре и приводят к уменьшению дофамина в этих зонах. Чаще всего для моделирования БП применяются следующие нейротоксины: 6-гидроксидофамин, 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетра-гидропиридин, резерпин и пестициды: ротенон и паракват.

6-гидроксидофамин (6-OHDA) – первая модель токсического паркинсонизма. Химически данное вещество схоже с катехоламинами (Рисунок 4), поэтому имеет высокое сродство к их переносчикам и таким образом способно повреждать катехоламинергические нейроны. Механизм действия 6-OHDA связан с окислительным стрессом, вызванным образованием активных форм кислорода (АФК), после его проникновения в нейрон, поскольку в физиологических условиях он подвергается быстрому ферментативному превращению до перекиси водорода и парахинона [64]. 6-OHDA почти не проникает через ГЭБ, поэтому его инъецируют непосредственно в медиальный пучок переднего мозга крысы [225]. Недостатком данной модели является отсутствие формирования телец Леви.

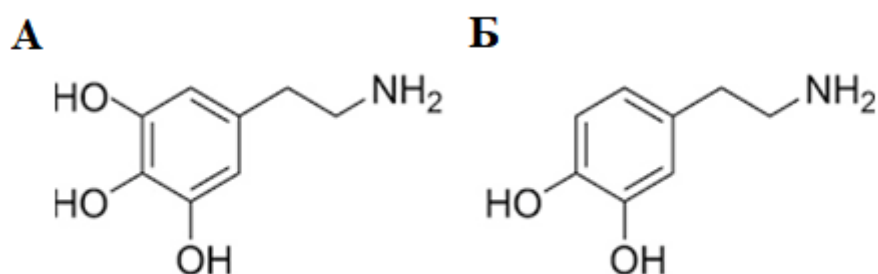


Рисунок 4 – Структурные формулы нейротоксина 6-гидроксидофамина и нейромедиатора дофамина (Цит. по: Bové J., 2012) [64]

Примечание – А – 6-гидроксидофамин; Б – дофамин.

1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридин (МРТР). Данное вещество было синтезировано в 80-х годах прошлого века из героина. У молодых людей, которые его употребляли, появлялись симптомы характерные для БП [71]. МРТР проходит через ГЭБ с помощью переносчика аминокислот, где подвергается метаболизму моноаминооксидазой до МРР⁺ (1-метил-4-фенилпиридиний) (Рисунок 5), который ингибирует митохондриальный комплекс I, что приводит к образованию свободных радикалов и в конечном итоге гибели дофаминергических нейронов [64]. Недостатками данной модели, как и предыдущей, является отсутствие телец Леви, а также формирование острой и подострой нейродегенерации, тогда как БП характеризуется хроническим нейродегенеративным процессом.

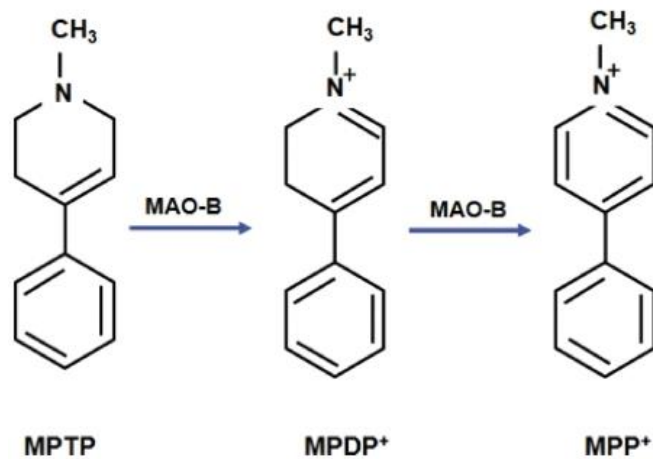


Рисунок 5 – Схема превращения МРТР в МРР⁺ (Цит. по: J. Bové J., 2012) [64]

Паракват (N,N'-диметил-4,4'-бипиридиний дихлорид) – гербицид, механизм токсичности которого основан на восстановлении до радикала параквата через комплекс I митохондрий, который индуцирует перекисное окисление липидов [140]. Паракват блокирует ферменты, обладающие антиоксидантной активностью, запускает синтез оксида азота в головном мозге путем повышения активности синтазы оксида азота, что в итоге приводит к увеличению количества активных форм кислорода [216]. Результаты исследований по влиянию параквата на дофаминергические нейроны весьма противоречивы. В одних исследованиях показана избирательная токсичность параквата на дофаминергические нейроны и

развитие нейрональных включений (тельца Леви), а также снижение двигательной активности животных [95]. В других работах не выявлено уменьшение двигательной активности крыс при введении им параквата, несмотря на нейродегенерацию стриатума [176, 28].

Резерпининдуцированная модель. Резерпин является симпатолитиком центрального действия. При его системном введении крысам происходит снижение уровня дофамина в нервных окончаниях, а также, характерные для паркинсонизма, двигательные нарушения и олигокинезия [74]. Однако, у этой модели есть существенный недостаток, изменения носят временный характер, симптомы появляются через 2 часа после введения и сохраняются максимально до 4 суток [9].

Ротеноновая модель – воспроизводится путем хронического системного введения крысам пестицида ротенона – мощного ингибитора митохондриального комплекса I. Он вызывает высокоселективную нейродегенерацию дофаминергического нигростриарного пути с образованием включений альфа-синуклеина, которые сходны с тельцами Леви при БП [72]. При системном введении ротенона у крыс возникает паркинсоническая моторная дисфункция, происходит перераспределение дофамина из везикул в цитозоль. [231]. Именно данная модель отражает большинство механизмов патогенеза БП, поэтому она наиболее часто используется при изучении действия нейропротекторных препаратов и соединений [112].

На основании вышеизложенного можно сделать вывод о том, что ротеноновая модель БП является наиболее оптимальной, так как именно она провоцирует дофаминергическую нейродегенерацию, наиболее схожую со всеми симптомами и молекулярно-биологическими признакам БП.

1.3. Функционирование гликопротеина-R при болезни Паркинсона

Для заболеваний, которые сопровождаются хронической нейродегенерацией, таких болезней Альцгеймера, эпилепсия, аутизм, шизофрения и т.д., характерна дисфункция ГЭБ с нарушением структуры плотных контактов и дисрегуляцией

белков-транспортеров [26, 60].

В некоторых работах была оценена связь между полиморфизмами гена *MDR1*, кодирующего Pgp, и развитием патологии.

В исследовании С. Kiyohara и соавт. (2013) по оценке роли полиморфизма гена *MDR1* C3435T в развитии БП, которое включало 268 пациентов с БП и 368 контрольных индивидуумов, было показано, что у пациентов с генотипом ТТ повышен риск развития БП по сравнению с больными с генотипом СС. Также, лица с аллелью Т, употребляющие алкоголь, имели риск развития БП значительно выше по сравнению с пациентами с С генотипом, не употребляющими алкоголь [139]. В исследовании на шведской популяции показана связь между наличием полиморфного маркера С1236Т гена *MDR1* и заболеванием, в то же время полиморфизмы 2677G/Т/А и 3435С/Т являлись незначимыми [99]. Метаанализ S. Ahmed и соавт. (2016) показал значимую ассоциацию для С1236Т в аллельной модели азиатской популяции с развитием БП, а также в рецессивной модели как азиатской, так и европейской популяций. Однако для С3435Т в доминантной, рецессивной, аллельной и гомозиготной моделях были отмечены незначительные ассоциации [50]. Таким образом, в исследованиях по изучению взаимосвязи полиморфизмов гена *MDR1* и развитием БП выявлены спорные результаты, поэтому этот вопрос требует дальнейшего изучения.

В настоящее время известны некоторые работы на животных и пациентах, свидетельствующие об изменении функционирования Pgp при БП. В модели МРТР БП на мышцах, авторы наблюдали повышенный уровень бромокриптина – субстрата Pgp в головном мозге, что свидетельствует либо о нарушении целостности ГЭБ, либо об изменении активного эффлюкса препарата. Однако, при оценке *in situ* перфузии головного мозга инулином или сахарозой, изменений в целостности ГЭБ не наблюдалось. Также аналогичные результаты были получены при изучении функционирования ГЭБ по оценке проникновения дигоксина [189]. В другой модели БП на мышцах Carvey P.M. и соавт. (2005) сообщили об увеличении проникновения меченного FITC-альбумина из сосудистого русла в полосатые тела

мозга мышей, которым вводили 6-ОНДА. Кроме того, авторы также наблюдали расширенный иммунофлуоресцентный сигнал для Pgr, причем иммунореактивность отмечалась в пораженных областях [38]. Kim H. и соавт. (2020) в недавнем исследовании сообщили о значительном снижении экспрессии мРНК и белка Pgr как в 6-ОНДА-индуцированной БП (снижение на 50%), так и в спорадической α -синуклеинопатии (снижение на 80%), которые моделировали на мышцах [66]. Huang L. и соавт. (2016) не выявили изменений белка Pgr в коре головного мозга после инъекции 6-гидроксидофамина в левый медиальный пучок переднего мозга [55]. При оценке экспрессии эфлюксного белка в ГЭБ среднего мозга крыс при паркинсонизме, который моделировался подкожным введением ротенона 1 раз в сутки на протяжении 28 дней, показано достоверное 3-кратное увеличение количества Pgr-позитивных клеток по сравнению с контрольной группой [20]. В мышинной модели БП, вызванной 6-ОНДА, наблюдалось снижение транскрипции VDR (*англ.: vitamin D receptor*) и его последующих генов-мишеней *cup24* и *mdr1a*. Транскрипционное подавление этих генов прекращалось после обработки 1α -25-дигидроксивитамином D3, что свидетельствует о нарушении работы пути VDR-Pgr, что может быть причиной нарушений при БП [66].

Kortekaas R. и соавт. (2005) использовали позитронно-эмиссионную томографию (ПЭТ) для измерения поглощения мозгом ^{11}C -верапамила, который является субстратом Pgr. Они показали значительное повышение поглощения ^{11}C -верапамила (18 %) в среднем мозге у пациентов с БП по сравнению с контрольной группой, что предполагает снижение функции Pgr, связанное с заболеванием [61]. Bartels и соавт. (2008) представили данные ПЭТ с ^{11}C -верапамилем, показавшие повышение поглощения ^{11}C -верапамила в лобных отделах белого вещества у пациентов с поздней стадией БП по сравнению с контрольной группой, что также свидетельствует о региональном снижении функции Pgr [78]. Bauer M. и соавт. (2017) в своем исследовании обнаружили значительно более высокое увеличение распределения в головном мозге субстрата Pgr ^{11}C -верапамила после частичного его ингибирования тариквидаром (в дозе 3 мг/кг) у пожилых людей по сравнению с молодыми субъектами. Это говорит о снижении экспрессии/ функции

транспортера в ГЭБ у пожилых людей и может являться одной из причин манифестации БП в пожилом возрасте [91]. В посмертном исследовании образцов головного мозга у больных БП наблюдалось значительное снижение уровня мРНК гена *MDR1* в стриатуме по сравнению с контрольной группой [99].

Имеются данные о связи между альфа-синуклеином и Pgp. Снижение уровня Pgp в ГЭБ может нарушать способность мозга выводить избыток альфа-синуклеина, в результате накопление токсического белка в нейронах может перегружать их, превышая клеточную убиквитин-протеасомную деградацию [69]. Убиквитин-протеасомная система деградации участвует в элиминации альфа-синуклеина при БП. Было обнаружено, что Pgp активно взаимодействует с протеасомным комплексом, и высказано предположение о роли Pgp в транспорте пептидов, образующихся под действием протеасом. Утрата функции Pgp может приводить к увеличению накопления нерастворимого альфа-синуклеина и нейродегенерации при БП [76].

Ряд исследований показал принадлежность нейротоксинов, вызывающих БП, к субстратам, индукторам или ингибиторам Pgp. В экспериментах *in vitro* с использованием трех различных моделей (ингибирование эффлюкса родамина-123; стимуляция активности АТФазы; цитотоксичность, индуцированная ксенобиотиками) диазинон, МРТР и ротенон были идентифицированы в качестве субстратов Pgp [172]. Пероральное введение дианозина в дозе 10-20 мг/кг в течении 5 дней значительно повысило уровень мРНК гена *mdr1* в кишечнике крыс, что свидетельствует о прямой транскрипционной активации гена пестицидом. На клетках линии Сасо-2 было показано, что данный фосфорорганический пестицид является субстратом Pgp [133]. В эксперименте с использованием конкурентного анализа клеток гепатоцеллюлярной карциномы печени (НерG2), основанного на эффлюксе флуоресцентного красителя родамина-123, было обнаружено, что 1,1-бис(4-хлорофенил)-2,2,2-трихлорэтан (ДДТ) стимулирует задержку красителя. Эти данные позволили предположить, что ДДТ является ингибитором Pgp [79].

Паракват был исследован на принадлежность к субстратам Pgp в трех экспериментальных моделях: АТФазной активности, ксенобиотик-

индуцированной цитотоксичности и трансэпителиальной проницаемости. Гербицид не стимулировал гидролиз АТФ в мембранах, экспрессирующих Pgp. Резистентность к цитотоксичности параквата в клетках, экспрессирующих Pgp, при наличии ингибиторов транспортера GF12091 и верапамила не изменялась. И наконец, паракват также не ингибировал эффлюкс родамина-123 в клетках, экспрессирующих Pgp. На основании этих исследований *in vitro* можно сделать вывод, что паракват не является субстратом или ингибитором Pgp [209]. В другом исследовании внутривенное введение индуктора Pgp дексаметазона в дозе 100 мг/кг крысам вистар через 2 ч после интоксикации паракватом 25 мг/кг в/в снижало накопление параквата в легких примерно до 40% по сравнению с группой, получавшей только паракват, что говорит о принадлежности гербицида к субстратам транспортера [171].

Изменение функции Pgp может также влиять на биодоступность фармакологических средств, применяемых для лечения БП. На клеточной линии почек было показано, что Pgp участвует в эффлюксе леводопы [200]. Кроме того, некоторые дофаминергические агонисты, такие как перголид, прамипексол, бромкриптин и будипин, также являются субстратами Pgp. Таким образом, фармакокинетика противопаркинсонических препаратов может зависеть от изменений в экспрессии и функции Pgp на разных стадиях заболевания [53]. Бромкриптин является не только субстратом Pgp, но также может быть его ингибитором в ГЭБ. Исследование *in vitro* на линии эндотелиальных клеток крысы показало, что бромкриптин усиливает внутриклеточное накопление леводопы [122].

Таким образом, многие имеющиеся на сегодняшний день данные о функционировании белка-транспортера Pgp в ГЭБ при БП противоречивы и требуют дальнейшего изучения.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Объект экспериментальных исследований

Работа выполнена на половозрелых крысах-самцах вистар массой 280–320 г. Крысы были получены из питомника «Столбовая» Московской области и имели необходимые ветеринарные свидетельства. В исследовании использовались животные без внешних признаков заболевания, прошедшие карантинный режим вивария Рязанского государственного медицинского университета в течение 14 дней. В ходе эксперимента животных содержали в «чистой» зоне вивария при температуре 19–22°C, 12-часовом искусственном освещении, на подстиле из опилок деревьев лиственных пород. Кормление осуществляли *ad libitum* при свободном доступе к воде.

Экспериментальные исследования осуществляли в соответствии с Приказом Министерства здравоохранения РФ от 1 апреля 2016 года № 199н. «Об утверждении Правил надлежащей лабораторной практики». Протокол исследования был рассмотрен и утвержден на заседании Комиссии по контролю за содержанием и использованием лабораторных животных ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России, протокол заседания № 11 от 29.01.2018.

Эвтаназия крыс осуществлялась путем забора крови из брюшной аорты под глубоким наркозом (внутрибрюшинное введение золетила в дозе 30 мг/кг).

Всего в исследовании было 375 крыс. В среднем летальность животных при введении ротенона составила 29,9%, поэтому в анализ было включено 263 крысы.

2.2. Дизайн экспериментальных исследований

Все животные были разделены на 7 групп.

Первая группа – анализ количества белка Pgp, экспрессии гена *mdr1a*, уровня дофамина и поведения животных (выраженность клинических проявлений паркинсонизма) при экспериментальном паркинсоническом синдроме, включала 3

серии.

Первая серия – контрольные животные, которым подкожно вводили масло подсолнечное в дозе 1 мл/кг курсом 28 дней после стерилизации через фильтрующую насадку с диаметром пор 0,2 мкм («Corning», США) и подогрева до температуры 35°C. Стерильное подсолнечное масло использовали также для приготовления масляного раствора ротенона (n=15 – здесь и далее количество животных указано с учетом летальности, то есть сколько вошло в окончательный анализ).

Вторая серия – животные, которым подкожно вводили масляный раствор ротенона в дозе 2,5 мг/кг 1 раз в день в течение 7 дней (n=15).

Третья серия – животные, которым подкожно вводили масляный раствор ротенона в дозе 2,5 мг/кг 1 раз в день в течение 28 дней (n=15) [23].

В конце эксперимента в каждой серии производилась оценка поведения крыс. Затем их выводили из эксперимента, забирали для анализа кору больших полушарий головного мозга, стриатум и средний мозг для оценки количества Pgr методом иммуноферментного анализа и экспрессии гена *mdr1a* методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени и стриатум и средний мозг для изучения уровня дофамина.

По 5 крыс в каждой серии использовали для определения уровня дофамина и количества Pgr, анализа экспрессии гена *mdr1a* и оценки поведения животных.

Вторая группа – исследование локализации Pgr в коре больших полушарий головного мозга крыс при экспериментальном паркинсоническом синдроме, состояла из 3 серий:

Первая серия – подкожное введение подсолнечного масла один раз в день в течение 28 дней (n=5).

Вторая серия – подкожное введение масляного раствора ротенона в дозе 2,5 мг/кг 1 раз в день в течение 7 дней (n=5).

Третья серия – подкожное введение масляного раствора ротенона в дозе 2,5 мг/кг 1 раз в день в течение 28 дней (n=5).

В конце эксперимента животные подвергались эвтаназии. Образцы коры

больших полушарий головного мозга крыс фиксировались в 10% забуференном нейтральном формалине для последующего выполнения иммуногистохимического исследования.

Третья группа – оценка выраженности окислительного стресса, относительного количества транскрипционного фактора Nrf2 и белков межклеточных контактов в коре больших полушарий головного мозга крыс при экспериментальном паркинсоническом синдроме, состояла из 3 серий:

Первая серия – подкожное введение подсолнечного масла один раз в день в течение 28 дней (n=6).

Вторая серия – подкожное введение масляного раствора ротенона в дозе 2,5 мг/кг 1 раз в день 7 дней (n=6).

Третья серия – подкожное введение масляного раствора ротенона в дозе 2,5 мг/кг 1 раз в день 28 дней (n=6).

В конце эксперимента животные подвергались эвтаназии и забирались образцы коры больших полушарий головного мозга крыс для проведения биохимических исследований.

Четвертая группа – изучение влияния ротенона на проникновение субстрата Pgp – фексофенадина в головной мозг через гематоэнцефалический барьер, состояла из 4 серий:

Первая серия – подкожное введение подсолнечного масла один раз в день в течение 28 дней (n=30).

Вторая серия – однократное подкожное введение масляного раствора ротенона в дозе 2,5 мг/кг (n=30).

Третья серия – подкожное введение масляного раствора ротенона в дозе 2,5 мг/кг 1 раз в день 7 дней (n=30).

Четвертая серия – подкожное введение масляного раствора ротенона в дозе 2,5 мг/кг 1 раз в день 28 дней (n=30).

После окончания введения ротенона или подсолнечного масла внутривенно вводили субстрат Pgp фексофенадин в дозировке 10 мг/кг массы. Затем через 5, 10, 15, 30, 45 и 60 мин после введения фексофенадина под зоветиловым наркозом у

животных забирали 4 мл крови из брюшной аорты, а также кору больших полушарий головного мозга, в которых затем определяли концентрацию фексофенадина методом ВЭЖХ с УФ-детектированием. На каждую временную точку приходилось по 5 животных.

Пятая группа – оценка проницаемости гематоэнцефалического барьера при экспериментальном паркинсоническом синдроме, состояла из 3 серий:

Первая серия – подкожное введение подсолнечного масла один раз в день в течение 28 дней (n=5).

Вторая серия – подкожное введение масляного раствора ротенона в дозе 2,5 мг/кг 1 раз в день в течение 7 дней (n=5).

Третья серия – подкожное введение масляного раствора ротенона в дозе 2,5 мг/кг 1 раз в день в течение 28 дней (n=5).

После окончания введения ротенона или подсолнечного масла оценивали целостность ГЭБ по накоплению в ткани мозга красителя синего Эванса (Evans blue, «Sigma», США).

Шестая группа – исследование влияния индукции Pgp в гематоэнцефалическом барьере на проникновение ротенона в головной мозг, состояла из 2 серий:

Первая серия – контрольные животные, которым в течение 14 суток внутрижелудочно вводили крахмальный клейстер (n=15).

Вторая серия – введение рифампицина в дозе 20 мг/кг в крахмальном клейстере дважды в день в течение 14 суток [89] (n=20).

После окончания введения веществ животным внутривенно вводили ротенон в дозе 0,2 мг/кг. Для этого нейротоксин растворяли в ДМСО для получения раствора с концентрацией 1 мг/мл, а затем растворяли в воде для инъекций до получения раствора с концентрацией 0,2 мг/мл и вводили экспериментальным животным в объеме 1 мл/кг. Через 5, 15 и 30 мин после введения крыс выводили из эксперимента передозировкой золетила, забирали образцы коры больших полушарий головного мозга, в которых затем определяли концентрацию ротенона методом ВЭЖХ с УФ-детектированием. На каждую временную точку приходилось

по 5 животных. Дополнительно 5 животных после введения рифампицина выводили из эксперимента и забирали образцы среднего мозга, стриатума и коры больших полушарий головного мозга крыс для определения количества Pgp, для подтверждения индукции.

Седьмая группа – изучение влияния индукции Pgp на выраженность паркинсонизма при введении ротенона, состояла из 3 серий:

Первая серия – контрольные животные (n=5), которым подкожно вводили масло подсолнечное в дозе 1 мл/кг курсом 28 дней.

Вторая серия – животные (n=5), которым внутривенно вводили суспензию рифампицина в дозе 20 мг/кг в крахмальном клейстере дважды в день в течение 7 дней, а затем в течение 7 дней – ротенон подкожно в дозе 2,5 мг/кг один раз в сутки совместно с внутривенным введением рифампицина в дозе 20 мг/кг два раза в день.

Третья серия – животные (n=5), которым внутривенно вводили суспензию рифампицина в дозе 20 мг/кг дважды в день в течение 7 дней, а затем в течение 28 дней – масляный раствор ротенона подкожно в дозе 2,5 мг/кг один раз в сутки совместно с внутривенным введением рифампицина в дозе 20 мг/кг два раза в день.

В конце эксперимента у всех животных оценивали поведение – выраженность клинических проявлений паркинсонизма. Крыс второй и третьей серии подвергали эвтаназии, в образцах среднего мозга, стриатума определяли уровень дофамина, в образцах среднего мозга, стриатума и коры больших полушарий головного мозга – содержание Pgp.

2.3. Моделирование экспериментального паркинсонизма

Паркинсонический синдром моделировали подкожным введением ротенона. Ротенон является липофильным пестицидом из семейства изофлавоноидов, систематическое введение которого вызывает подавление активности

митохондриального комплекса I. Данные биохимические изменения приводят к избирательной дегенерации дофаминергических нейронов nigrostriатума с последующим ограничением дофаминергической нейротрансмиссии в головном мозге и нарушениям двигательных функций, характерным для БП [54].

Ротенон («Sigma», США) в виде масляного раствора (содержащий 2% диметилсульфоксида) вводили подкожно в дозе 2,5 мг/кг 1 раз в день в течение 7 и 28 дней для моделирования паркинсонического синдрома [8]. Для сокращения описания везде по тексту указано масло подсолнечное (без указания ДМСО).

2.4. Оценка выраженности паркинсонизма (поведения животных)

У животных всех серий оценивали основные (наличие гипо-, бради- и олигокинезии, постуральная нестабильность, неустойчивая походка) и дополнительные (ригидность мышц, тремор покоя, нарушение равновесия) признаки паркинсонизма по трехбалльной шкале, где 1 балл соответствовал низкой степени выраженности признака, 2 балла – средней степени, 3 балла – высокой степени, после чего рассчитывали суммарную выраженность признаков паркинсонизма [23].

2.5. Определение концентрации дофамина

Образцы среднего мозга и стриатума гомогенизировали на гомогенизаторе DIAХ 900 («Heidolph», Германия) при 26000 об./мин в фосфатном буфере (рН 7,2-7,4) на холоде в соотношении 1:10 в течение 1 мин, затем центрифугировали при 1750 g 10 мин. Анализировали надосадочный слой с помощью коммерческого набора (ELISA kit for Dopamine CEA851Ge, «Cloud-Clone Corp.», Китай) иммуноферментным анализом. Количество дофамина рассчитывали в пересчете на массу ткани, взятую для исследования.

2.6. Определение экспрессии гена *mdr1a*

Экспрессия гена *mdr1a* в образцах среднего мозга, стриатума и коры больших полушарий головного мозга крыс анализировалась методом полимеразной цепной реакции в реальном времени. Суммарную РНК выделяли с использованием набора RNeasy Mini Kit («QIAGEN», Германия) в соответствии с инструкцией производителя.

Концентрацию РНК в образцах определяли спектрофотометрически с помощью прибора NanoPhotometr NP80-Touch («Implen GmbH», Германия).

Для проведения ПЦР в реальном времени на первом этапе РНК в количестве 1 мкг подвергали обратной транскрипции с использованием набора реактивов «БиоМастер ОТ-ПЦР SYBR Blue (2×) для проведения ОТ-ПЦР в реальном времени с SYBR Green I» («Биолабмикс», Россия). Обратная транскрипция проводилась при температуре 45°C, время инкубации составило 10 минут, количество циклов – 1. Этот этап необходим для синтеза цепей кДНК. На втором этапе с синтезированной кДНК проводили ПЦР в реальном времени.

В качестве референсного гена, относительно которого вычислялась экспрессия *mdr1a*, был выбран ген, кодирующий глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназу (*gapdh*).

Последовательности прямого и обратного праймеров представлены в Таблице 1.

Таблица 1 – Праймеры, использованные в работе («Бигль», Россия)

| Для <i>mdr1</i> | |
|------------------|------------------------------|
| Прямой праймер | 5'-СТТСТТТГСТССТССАТТГС-3' |
| Обратный праймер | 5'-ССГСТГТТСТГТТТСТТТАГ-3' |
| Для <i>gapdh</i> | |
| Прямой праймер | 5'-ГТСССТСТГАСТТСААСАГСГ-3' |
| Обратный праймер | 5'-АССАСССТГТТГСТГТАГССАА-3' |

Исследование проводилось по нижеприведенным условиям температурных

циклов: денатурация (нагрев реакционной смеси) – при 95°C, охлаждение – при 53°C, элонгация – при 72°C.

Дальнейший анализ осуществлялся на амплификаторе нуклеиновых кислот Applied Biosystems Quant Studio 5 с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов ПЦР в режиме реального времени («Life Technologies Holdings Pte. Ltd.», Сингапур) с программным обеспечением QuantStudio Design and Analysis («Thermo Fisher Scientific», США). Расчет уровня экспрессии *mdr1a* осуществлялся относительно референсного гена.

2.7. Определение уровня Pgp

Образцы головного мозга (среднего мозга, стриатума и коры больших полушарий) гомогенизировали на гомогенизаторе DIAH 900 при 26000 об./мин в фосфатном буфере (pH 7,2-7,4) на холоде в соотношении 1:1 в течение 1 мин, затем подвергали трехкратному замораживанию–размораживанию при –20°C для разрушения цитоплазматических мембран, а затем центрифугировали при 1500 g 15 мин. Анализировали надосадочный слой методом иммуноферментного анализа (ELISA kit «BlueGene», Китай). Количество транспортера пересчитывали на общую массу белка, которую определяли по методу Брэдфорда («Themofisher» kit, США).

2.8. Оценка локализации Pgp в коре больших полушарий головного мозга крыс

Для оценки локализации Pgp в головном мозге крыс выполняли иммуногистохимическое исследование. Для этого образцы мозга фиксировали в 10%-ном растворе нейтрального формалина. Гистологический материал обрабатывали по стандартной методике: обезвоживали в растворах спирта этилового возрастающей концентрации, просветляли ксилолом и помещали в парафин. Перед реакцией иммунного окрашивания производили демаскировку антигенов тканей посредством нагревания на водяной бане в 10 мМ цитратном

буфере (рН 6,0), блокировали эндогенную пероксидазу 3%-м раствором H₂O₂. Затем инкубировали срезы с первичными антителами к Pgp (ABCBl antibody-middle region, «Aviva Systems Biology», США) в разведении 1:100 по стандартной методике. Для иммунного окрашивания использовали полимерную систему детекции с пероксидазной меткой («Dako», Дания). Ядра клеток окрашивали гематоксилином.

Микропрепарат фотографировали с помощью цифровой камеры («ЛОМО ТС- 500», Россия) при увеличении в 400 раз. В каждом гистологическом препарате оценивали 10 репрезентативных участков (10 фотографий).

В дальнейшем изображения подвергали анализу с применением медицинской программы для анализа и обработки цифровых изображений («ImageJ», США). С помощью плагина Colour Deconvolution, имеющего встроенную схему для анализа окраски «гематоксилин+диаминобензидин», изображение разделяли на синий и коричневый цвета.

2.9. Анализ проникновения субстрата гликопротеина-Р фексофенадина в головной мозг крыс

Проникновение субстрата гликопротеина-Р фексофенадина в головной мозг крыс оценивали после его однократного внутривенного введения в дозе 10 мг/кг массы.

В связи с отсутствием лекарственной формы фексофенадина для инъекций производили экстракцию лекарственного вещества из таблеток «Аллегра», («Sanofy», Франция) (180 мг) по следующей методике: одну таблетку измельчали и суспендировали в 20 мл ацетонитрила («ACROS ORGANICS», Бельгия) категории «Для ВЭЖХ», содержимое взбалтывали на приборе Shaker при 400 об./мин в течение 15 мин с последующим центрифугированием 15 мин при 1750 g. Надосадочный слой упаривали на роторно-вакуумном испарителе («Heidolph instruments», Германия) при 50⁰С и сухой остаток растворяли в 10 мл воды для

инъекций, полученный раствор фильтровался через бактериальный фильтр с диаметром пор 0,22 мкм («Corning», США). Концентрацию полученного раствора определяли методом ВЭЖХ-УФ [21]. Для исследования раствор вводился в хвостовую вену животных в объеме 2 мл/кг.

Через 5, 10, 15, 30, 45 и 60 мин после введения фексофенадина животные выводились из эксперимента. После этого для анализа у них забиралась кровь из брюшной аорты в гепаринизированные пробирки в объеме 4 мл и кора больших полушарий головного мозга. Кровь центрифугировалась при 1750 g 10 мин для получения плазмы. Образцы тканей и плазмы замораживались при -80°C до последующего анализа.

Экстракция фексофенадина из плазмы крови и из ткани коры больших полушарий головного мозга проводилась ацетонитрилом категории «Для ВЭЖХ».

Количественное определение фексофенадина в плазме крови крыс и в гомогенате головного мозга производили методом ВЭЖХ на хроматографической системе Stayer («Аквилон», Россия) с УФ-спектрофотометрическим детектированием при длине волны 220 нм.

Общее количество фексофенадина в системном кровотоке и в коре больших полушарий оценивали по площади под кривой концентрация фексофенадина (в крови или ткани коры больших полушарий головного мозга) – время (AUC0-t (плазма) или AUC0-t (мозг)), которые рассчитывали методом трапеций [17]:

$$\frac{1}{2} \sum_{i=1}^n [(c_i + c_{i-1}) \times (t_i - t_{i-1})]$$

где c – концентрация вещества в плазме крови или гомогенате, t – время забора образца плазмы или мозга.

Для оценки функциональной активности Pgr в ГЭБ был рассчитан показатель AUC0-t (мозг) / AUC0-t (плазма).

2.10. Анализ концентрации фексофенадина в плазме крови крыс

При анализе концентрации фексофенадина в плазме крови крыс вистар использовался высокоэффективный жидкостный хроматограф Stayer («Аквилон», Россия) с инжектором («Rheodyne», США) и УФ-спектрофотометрическим детектором при длине волны 220 нм в изократическом режиме. В качестве стандарта использовалась субстанция фексофенадина («Sigma-Aldrich», США).

Применялась хроматографическая колонка Phenomenex Synergi 4u Polar-RP 80A (250x4,6) с зернением 4 мкм. Температура разделения – 45⁰С. Скорость потока подвижной фазы – 1,0 мл/мин. Состав подвижной фазы по объему: вода деионизированная / ацетонитрил / ледяная уксусная кислота (50/50/0,1), рН=5,5. Время удерживания фексофенадина в указанных условиях составило 14,91±0,25 мин.

Для выделения фексофенадина к 1,5 мл плазмы крови крыс добавляли 4 мл ацетонитрила, встряхивали на приборе Shaker при 400 об./мин 15 мин, центрифугировали при 1750 g 15 мин и упаривали супернатант при 50⁰С. Коэффициент извлечения фексофенадина составил 83,6%.

Для построения калибровочных графиков готовили 6 стандартных растворов фексофенадина в плазме крови крыс следующих концентраций: 100, 400, 800, 2000, 10000 и 17000 нг/мл. Данные растворы были проанализированы в течение эксперимента троекратно. По полученным значениям были построены три калибровочных графика зависимости концентрации фексофенадина в плазме крови от площади его хроматографического пика.

Рассчитанные коэффициенты корреляции составили более 0,99. Отклонения концентраций калибровочных образцов, рассчитанные по уравнениям линейных зависимостей, от номинальных значений соответствовали принятым нормам – 20% для нижнего предела количественного определения, 15% для остальных точек.

Для анализа точности и прецизионности использовали образцы интактной плазмы крови крыс с добавлением стандартных растворов фексофенадина до получения концентраций 100, 300, 10000 и 17000 нг/мл.

Полученные величины прецизионности (относительного стандартного

отклонения) и правильности (относительной погрешности) соответствовали принятым нормам (не более 20% для нижнего предела количественного определения и не более 15% – для остальных точек).

Для оценки стабильности фексофенадина в плазме крови при хранении в замороженном состоянии (при -80°C) в течении 60 дней, а также при 3-кратной заморозке-разморозке готовили образцы с концентрацией 300 и 17000 нг/мл. Половину образцов анализировали сразу после приготовления, а остальные – после хранения в замороженном состоянии или заморозки-разморозки. В обоих случаях исследовали по 3 независимых образца. Правильность для каждой концентрации (для средних значений) находилась в пределах 15% от номинальных значений.

При последовательном анализе пробы с концентрацией фексофенадина 17000 нг/мл и холостой плазмы крови отсутствовали пики, соответствующие по времени удерживания пикам фексофенадина, что свидетельствует об отсутствии эффекта переноса.

Таким образом, методика количественного определения маркерного субстрата Pgp – фексофенадина в плазме крови крыс может быть использована для его анализа.

2.11. Анализ концентрации фексофенадина в коре больших полушарий головного мозга крыс

У крыс в соответствующий временной срок после внутривенного введения фексофенадина под наркозом извлекалась кора больших полушарий головного мозга. Образцы ткани массой 0,5 г гомогенизировали в 500 мкл воды деионизированной в течение 1 мин, после чего осаждали белок 4 мл ацетонитрила путем встряхивания на приборе Vortex в течение 15 мин с последующим центрифугированием 15 мин при 1750 g и забором надосадочного слоя для анализа. Степень извлечения целевого вещества составляла 81,3%.

При калибровке к аналогичной навеске интактной ткани добавлялась деионизированная вода, часть которой замещалась стандартным раствором

фексофенадина с концентрацией 10 мкг/мл в подвижной фазе в необходимом объеме для получения серии калибровочных растворов.

В гомогенате мозга предел обнаружения фексофенадина составил 35 нг/г, при этом соотношение сигнала к шуму базовой линии равнялось 3. Предел количественного определения целевого вещества соответствовал 50 нг/г.

Для построения калибровочных графиков готовили 6 стандартных растворов фексофенадина в гомогенате коры мозга крыс следующих концентраций: 50, 250, 500, 750, 1000 и 2000 нг/г. Данные растворы были проанализированы троекратно в процессе эксперимента. По полученным значениям были построены три калибровочных графика зависимости концентрации фексофенадина в гомогенате мозга крыс от площади его пика. Рассчитанные коэффициенты корреляции соответствовали принятым нормам (не менее 0,99).

Для оценки точности и прецизионности методики анализировали образцы интактного гомогената мозга крыс с добавлением стандартных растворов фексофенадина до получения концентраций 50, 150, 750 и 2000 нг/г в рамках трех циклов. Полученные величины прецизионности (относительного стандартного отклонения) и правильности (относительной погрешности) соответствовали принятым нормам (не более 20% для нижнего предела количественного определения и не более 15% – для других концентраций).

Стабильность фексофенадина в гомогенате коры больших полушарий головного мозга крыс была доказана при хранении в замороженном состоянии (при -80°C) в течении 60 дней, а также при 3-кратной заморозке-разморозке в концентрациях 150 и 2000 нг/г (правильность для каждой концентрации находилась в пределах 15% от номинальных значений).

При последовательном анализе пробы с концентрацией фексофенадина 2000 нг/г и образца холостого гомогената мозга на хроматограмме интактного гомогената мозга крысы отсутствовали пики, соответствующие по времени удерживания пикам фексофенадина, что свидетельствует об отсутствии эффекта переноса.

Таким образом, методика количественного определения маркерного

субстрата Pgr – фексофенадина в коре больших полушарий головного мозга крыс может быть использована для оценки его проникновения через ГЭБ.

2.12. Анализ проницаемости гематоэнцефалического барьера

Для контроля целостности ГЭБ при моделировании паркинсонического синдрома проводился анализ накопления в ткани мозга красителя синего Эванса (Evans blue, «Sigma», США) (внутривенное введение в хвостовую вену 2%-го изотонического раствора в объемной дозе 0,4 мл/100 г массы крысы). На фоне глубокой анестезии непосредственно перед декапитацией крысам выполняли транскардиальную перфузию 100 мл изотонического раствора для удаления интраваскулярного красителя. Затем животные выводились из эксперимента, у них извлекалась кора головного мозга и измельчалась ножницами. Затем краситель экстрагировался путем гомогенизации ткани в диметилформамиде (1 мл/100 г ткани) в течение 1 мин при 26000 об./мин и последующего настаивания при 60°C в течение суток. Далее суспензию центрифугировали 5 мин при 1750 g.

Концентрация синего Эванса определялась спектрофотометрически (спектрофотометр SmartSpec Plus, «Bio-Rad», США) при 620 нм. Количественное определение проводилось методом внешнего стандарта в аналогичном растворителе [182, 115].

2.13. Оценка выраженности окислительного стресса в коре больших полушарий головного мозга крыс

Образцы коры больших полушарий головного мозга крыс взвешивались на аналитических электронных весах («OHAUS Adventurer», США), измельчались ножницами, а затем гомогенизировались на холоде (при $t +2 - +4$ °C) в 0,05 М изотоническом фосфатном буфере с pH 7,4 (соотношение 1:10) с использованием гомогенизатора Поттера (16–20 ударов). Полученный гомогенат

центрифугировался при 3000 об./мин 10 минут (при $t +2 - +4$ °C). Супернатант хранился при температуре -80°C и использовался для анализа.

Анализ концентрации конечного продукта перекисного окисления липидов – ТБК-реактивных продуктов

В полученных гомогенатах с помощью коммерческого набора определялась концентрация ТБК-реактивных продуктов – конечного продукта перекисного окисления липидов (ПОЛ) («Агат», Россия).

Метод определения ТБК-реактивных продуктов основан на способности продуктов ПОЛ образовывать с тиобарбитуровой кислотой окрашенный комплекс, экстрагируемый бутанолом [224].

Оптическую плотность анализировали на спектрофотометре BioRad SmartSpec Plus («BioRad», США).

Концентрацию рассчитывали с использованием калибровочного графика и выражали в нмоль/мг белка.

Анализ концентрации карбонильных производных белков (продуктов окислительной модификации белков)

Концентрацию карбонильных производных белков оценивали с помощью коммерческого набора – Protein Carbonyl Content Assay Kit («Sigma Aldrich», США).

Метод определения карбонильных производных белков основан на их взаимодействии с 2,4-динитрофенилгидразином с образованием 2,4-динитрофенилгидразонов, которые регистрируют при длине волны 375 нм. Концентрацию карбонильных производных белков рассчитывали исходя из коэффициента экстинкции $E_{375} = 22 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ [232] и выражали в нмоль/мг белка.

Анализ выполняли на спектрофотометре для планшетов Stat Fax 2100 («Awareness Technology», США).

Анализ концентрации небелковых SH-групп

Концентрацию SH-групп определяли в ходе реакции восстановления дисульфид-5,5-дитиобис-2-нитробензоата (ДТНБ), растворенного в абсолютном этаноле (реагент Элмана – G.L. Ellman) с образованием эквивалентного количества окрашенных желтых анионов 2-нитро-5-тиобензоата. Белки осаждали абсолютным этанолом. Концентрацию SH-групп рассчитывали исходя из коэффициента экстинкции $\lambda_{412} = 13,6 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ [93]. Результаты выражали в мкмоль/мг белка.

Анализ активности антиоксидантного фермента глутатионпероксидазы

Кинетическое спектрофотометрическое определение активности фермента глутатионпероксидазы основано на регистрации уменьшения оптической плотности опытного образца при 340 нм, $t - 37^{\circ}\text{C}$ в результате протекания следующих реакций:



(GSH – глутатион восстановленный, ГПТБ – гидроперекись-трет-бутила - специфический субстрат для действия Se-зависимой глутатионпероксидазы, GSSG – глутатион окисленный).

НАДФН₂ служит донором восстановленных эквивалентов для реакции ферментативного восстановления глутатиона, который окисляется в реакции ферментативного восстановления гидроперекиси трет-бутила (гидроперекись трет-бутила – специфический субстрат для действия Se-зависимой глутатионпероксидазы). Чем выше активность глутатионпероксидазы, тем интенсивнее будет окисляться НАДФН₂, что отразится на интенсивности поглощения света с длиной волны 340 нм (она уменьшится). Результаты активности выражали в нмоль НАДФН₂/мин× мг белка [18].

Оптическую плотность анализировали на спектрофотометре BioRad SmartSpec Plus («BioRad», США).

Анализ концентрации белка

Полученные результаты пересчитывали на концентрацию белка в образце, которую анализировали методом Бредфорда (Pierce Coomassie Plus (Bradford) Assay Kit, «ThermoFisher», США) [65]. Анализ выполняли на спектрофотометре для планшетов Stat Fax 2100 («Awareness Technology», США).

2.14. Оценка относительного количества транскрипционного фактора Nrf2 в ядерной и цитоплазматической фракциях коры больших полушарий головного мозга крыс

Для изучения механизмов изменения экспрессии *mdr1a* под действием ротенона оценивали относительное количество транскрипционного фактора Nrf2 в ядерной и цитоплазматической фракциях коры больших полушарий головного мозга крыс методом вестерн-блот. Для выделения цитоплазматической и ядерной фракций образцы коры больших полушарий лизировали с помощью ReadyPrep Protein extraction kit (Cytoplasmic/Nuclear) («Bio-Rad», США) с ингибитором протеаз («Sigma Aldrich», США).

Полученные цитоплазматическую и ядерную фракции подвергали электрофорезу с использованием TGX Stain-Free FastCast Acrylamide Kit («Bio-Rad», США) в буферной системе Laemmli («BioRad», США). Перед загрузкой образцы обрабатывали в соответствии с протоколом Bio-Rad. Их смешивали с буфером для образцов Laemmli («Bio-Rad», США), содержащем 2,5% 2-меркаптоэтанола («Bio-Rad», США) в соотношении 1:1, инкубировали 5 мин при температуре 70°C. Гели подвергали электрофорезу при 100 В в течение 90 мин. Белки переносили на нитроцеллюлозную мембрану «Trans-Blot Turbo Mini-Size nitrocellulose» («Bio-Rad», США) с использованием Mini Trans-Blot («Bio-Rad», США) в течение 10 мин при 20 В и 1,3 А. Белки на мембране блокировали 1%-ным раствором Casein Blocker («Bio-Rad», США), содержащим 0,1% (по объему) Tween 20 («Sigma-Aldrich», Германия), при инкубации в течение 1 ч и комнатной

температуре.

Для определения относительного количества Nrf2 использовали первичные кроличьи поликлональные антитела (AF0639 Nrf2 Antibody, «Affinity», Китай) в разведении 1:1000 и инкубацией в течение 2 ч при температуре 37⁰С. Визуализацию первичных антител осуществляли с использованием вторичных козлиных антител (Goat anti-Rabbit IgG (H+L) Cross-Adsorbed Secondary Antibody, HRP, «Invitrogen», США) в разведении 1:4000 и инкубацией в течение 1 ч при комнатной температуре. Белки визуализировали хемилюминесценцией с помощью Chemi Doc XRS+ («Bio-Rad», США).

Интенсивность полученных полос (бэндов) анализировали денситометрически с помощью программного обеспечения ImageLab («Bio-Rad», США). Количество Nrf2 оценивали относительно содержания белка домашнего хозяйства GAPDH (первичные GAPDH Loading Control Monoclonal Antibody (GA1R), DyLight 68, «Invitrogen», США, разведение 1:1000, вторичные антитела - вторичные кроличьи антитела к первичным антителам GAPDH – Rabbit-anti-Mouse IgG (H+L) Secondary Antibody, HRP, «Invitrogen», США, разведение 1:4000).

2.15. Оценка относительного количества белков плотных межклеточных контактов в коре больших полушарий головного мозга крыс

Для изучения механизмов повышения проницаемости ГЭБ анализировали уровень белков плотных межклеточных контактов: ZO-1, окклюдина и E-кадгерина в коре больших полушарий головного мозга крыс методом вестерн-блот.

Для этого образцы коры больших полушарий измельчали и гомогенизировали в NP40 Cell Lysis Buffer Thermo («Thermo Fisher Scientific», США) с добавлением смеси ингибиторов протеиназ («Sigma-Aldrich», Германия) с помощью гомогенизатора Поттера (16–20 ударов) в соотношении масса ткани (мг): объем буфера (мл) 1:1, а затем инкубировали в течение 3 ч при 4⁰С и постоянном перемешивании. Полученный гомогенат центрифугировали при 22440 g в течение

10 мин (AvantiJXN-3, «BeckmanCoulter», США). Супернатант использовали для анализа.

30 мкг белков (количество белка анализировали методом Брэдфорда) подвергали электрофорезу с использованием TGX Stain-Free FastCast Acrylamide Kit («Bio-Rad», США) при 100 В в течение 90 мин. Перед загрузкой образцы смешивали с буфером для образцов Laemmli («Bio-Rad», США), содержащем 2,5% 2-меркаптоэтанола («Bio-Rad», США) в соотношении 1:1, инкубировали 5 мин при температуре 70°C. Белки переносили на нитроцеллюлозную мембрану «Trans-Blot Turbo Mini-Size nitrocellulose» («Bio-Rad», США) с использованием Mini Trans-Blot («Bio-Rad», США) в течение 10 мин при 20 В и 1,3 А. Белки на мембране блокировали 1%-ным раствором Casein Blocker («Bio-Rad», США), содержащим 0,1% (по объему) Tween 20 («Sigma-Aldrich», Германия), при инкубации в течение 1 ч и комнатной температуре.

Для определения относительного количества ZO-1, окклюдина и E-кадгерина методом вестерн-блот использовали первичные кроличьи поликлональные антитела (AF5145 антитело к ZO-1, DF7504 антитело к OCLN, AF0131 антитело к CDHE, «Affinity», КНР) в разведении 1:1000 и инкубацией в течение 2 ч при температуре 37°C.

Визуализацию первичных антител осуществляли с использованием вторичных козлиных антител (Goat anti-Rabbit IgG (H+L) Cross-Adsorbed Secondary Antibody, HRP, «Invitrogen», США) в разведении 1:4000 и инкубацией в течение 1 ч при комнатной температуре. Белки визуализировали хемилюминесценцией с помощью Chemi Doc XRS+ («Bio-Rad», США).

Молекулярная масса белков была подтверждена путем сравнения с маркерами молекулярной массы (Precision plus protein standards Dual Color, «Bio-Rad», США). Интенсивность полученных полос (бэндов) анализировали денситометрически с помощью программного обеспечения ImageLab («Bio-Rad», США). Количество ZO-1, окклюдина и E-кадгерина также оценивали относительно содержания белка домашнего хозяйства GAPDH.

2.16. Математико-статистические методы исследования

Статистическую обработку результатов проводили 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 данных статистическую значимость различий оценивали с помощью теста ANOVA, попарные сравнения выполняли с помощью критерия 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 с помощью критерия Манна-Уитни с поправкой Бонферонни. Данные представлены в виде среднего арифметического \pm стандартное отклонение среднего (SD) при нормальном распределении данных или медианы, нижнего и верхнего квартилей при распределении данных, отличном от нормального.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

3.1. Моделирование экспериментального паркинсонического синдрома

В настоящем исследовании паркинсонический синдром у крыс вистар моделировали подкожным введением ротенона в дозе 2,5 мг/кг 1 раз в день в течение 7 и 28 суток. Летальность при введении ротенона составила в среднем 29,9%.

На 7 сутки введения ротенона у животных отмечалось снижение уровня дофамина в стриатуме на 69,6% ($p=0,019$), на 28 сут. – на 93,9% ($p=0,008$) по сравнению с показателями контроля, в среднем мозге – на 72,7% ($p=0,095$) и на 68,7% ($p=0,032$) соответственно (Таблица 2). Достоверных различий между содержанием дофамина в среднем мозге на 7 и 28 дни введения ротенона выявлено не было ($p>0,05$), однако, в стриатуме концентрация дофамина на 28 день была ниже значения на 7 день на 80,0% ($p=0,056$).

Таблица 2 – 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.

Введение ротенона 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 сутки – 8 (6; 10) и достоверно превышал показатели контрольных животных ($p < 0,05$) (Таблица 3).

Таблица 3 – Признаки выраженности паркинсонизма при экспериментальном паркинсоническом синдроме (медиана, верхний и нижний квартили, $n=5$ в каждой серии)

| Серия/показатель | Контроль | Ротенон 7 дней | Ротенон 28 дней |
|--|----------|----------------|-----------------|
| Гипо-, бради- и олигокинезия, баллы | 0 (0; 0) | 0 (0; 0) | 1 (1; 2)* |
| Постуральная нестабильность, баллы | 0 (0; 0) | 1 (1; 1)* | 1 (1; 2)* |
| Неустойчивость походки, баллы | 0 (0; 0) | 1 (1; 1)* | 1 (0; 2) |
| Ригидность мышц, баллы | 0 (0; 0) | 0 (0; 1) | 2 (1; 2)* |
| Тремор покоя, баллы | 0 (0; 0) | 0 (0; 1) | 1 (1; 2)* |
| Оценка равновесия баллы | 0 (0; 0) | 1 (1; 2)* | 2 (2; 3)* |
| Суммарное значение, баллы | 0 (0; 0) | 4,5 (3; 6)* | 8 (6; 8)* |
| Примечание – * $p < 0,05$ – статистически значимые различия с показателями контроля. | | | |

Таким образом, выбранная экспериментальная модель паркинсонизма (подкожное введение ротенона в дозе 2,5 мг/кг 1 раз в день в течение 7 и 28 сут.) является адекватной.

3.2. Экспрессия гена *mdr1a*, количество и локализация гликопротеина-P в головном мозге крыс при экспериментальном паркинсоническом синдроме

Экспрессию гена *mdr1a* в среднем мозге, стриатуме и коре больших полушарий головного мозга крыс анализировали методом ПЦР в режиме реального времени, количество белка Pgp – методом ИФА, его локализацию в коре больших полушарий – иммуногистохимически.

При проведении иммуногистохимического исследования коры больших полушарий головного мозга крыс иммунопозитивная реакция наблюдалась в эндотелиальных клетках сосудов (Рисунок 6). Также иммунопозитивную реакцию

давали единичные ядра клеток. Полученные данные свидетельствуют о том, что Pgr в головном мозге локализуется преимущественно в гематоэнцефалическом барьере.

Подкожное ведение ротенона в дозе 2,5 мг/кг 1 раз в день в течение 7 и 28 сут. достоверно не влияло на локализацию Pgr, иммунопозитивная реакция отмечалась также преимущественно в эндотелиальных клетках ГЭБ (Рисунок 6).



Рисунок 6 – Иммуногистохимическая реакция с Pgr в коре больших полушарий головного мозга крыс при экспериментальном паркинсоническом синдроме, увеличение в 400 раз (n=5 в каждой серии)

На следующем этапе исследования была оценена экспрессия гена *mdr1a*, кодирующего Pgp, в среднем мозге, стриатуме и коре больших полушарий головного мозга крыс (Рисунки 7, 8).

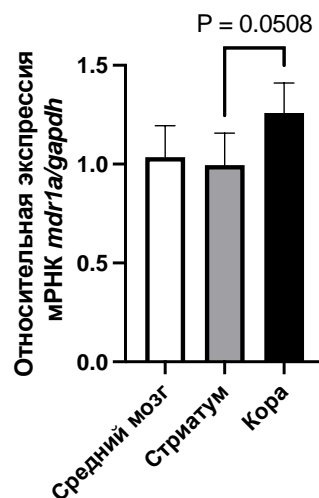


Рисунок 7 – Относительная экспрессия мРНК *mdr1a* в разных отделах мозга крыс, среднее±SD (n=5 в каждой серии)

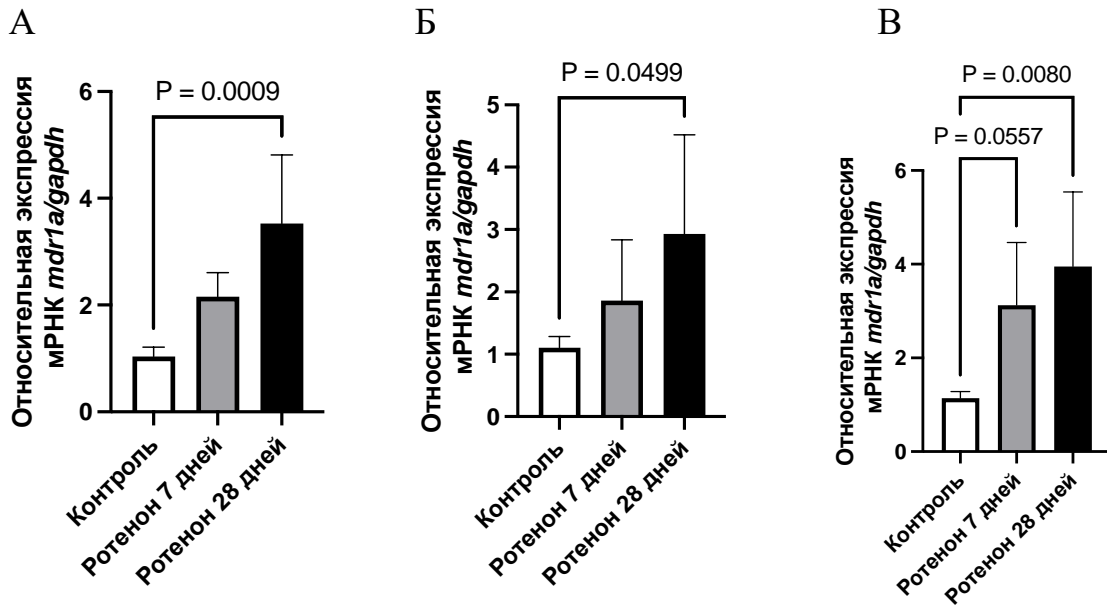


Рисунок 8 – Относительная экспрессия мРНК *mdr1a* в разных отделах мозга крыс при экспериментальном паркинсоническом синдроме, среднее±SD (n=5 в каждой серии)

Примечание – А – средний мозг; Б – стриатум; В – кора больших полушарий.

Уровень мРНК гена *mdr1a* в коре больших полушарий головного мозга крыс превышал экспрессию гена в стриатуме в 1,27 раза на грани достоверности ($p=0,0508$), а в остальных отделах мозга достоверно не различался (Рисунок 7).

Моделирование экспериментального паркинсонизма сопровождалось повышением экспрессии гена *mdr1a* на 7 день введения ротенона в коре больших полушарий головного мозга крыс в 2,73 раза ($p=0,0557$), а на 28 день в среднем мозге – в 3,4 раза ($p=0,0009$), в стриатуме – в 2,65 раз ($p=0,0499$), в коре больших полушарий – в 3,45 раз ($p=0,008$) соответственно (Рисунок 8).

При изучении количества белка Pgr в разных отделах головного мозга крыс были получены следующие результаты. Содержание Pgr в гомогенате среднего мозга, стриатума и коры больших полушарий головного мозга крыс составило 331,7 (304,5; 382,1) пг/мг белка, 325,2 (261,01; 702,4) пг/мг белка и 305,3 (289,35; 309,5) пг/мг белка соответственно и достоверно между собой не различалось (Таблица 4).

Таблица 4 – 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 белка | Средний мозг, пг/мг белка | Кора больших полушарий, пг/мг белка |
|--------------------|---------------------------|---------------------------|-------------------------------------|
| Контроль | 325,2 (261,01; 702,4) | 331,7 (304,5; 382,1) | 305,3 (289,35; 309,5) |
| Ротенон 7 дней | 352,9 (336,3; 405,8) | 312,9 (293,9; 1130,41) | 301,9 (281,23; 334,8) |
| Ротенон 28 дней | 273,4 (208,41; 297,05) | 258,3 (213,43; 289,62) | 311,3 (258,8; 373,43) |

Моделирование экспериментального паркинсонического синдрома достоверно не влияло на количество белка-транспортера во всех исследуемых тканях. Данный показатель достоверно от значений контрольных животных не отличался как на 7, так и на 28 сутки исследования (Таблица 4).

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

3.3. Проникновение субстрата гликопротеина-P – фексофенадина в головной мозг при экспериментальном паркинсоническом синдроме

Для оценки проникновения фексофенадина – субстрата Pgr в головной мозг животных при экспериментальном паркинсоническом синдроме его вводили внутривенно в дозе 10 мг/кг массы на 7 и 28 дни эксперимента. Дополнительно (чтобы исключить прямое ингибирование Pgr ротеноном) анализировали влияние однократного введения ротенона на проникновение в мозг фексофенадина.

В ходе исследования были получены следующие результаты (Таблицы 5, 6, 7). Динамика плазменных концентраций фексофенадина представлена в Таблице 5.

Таблица 5 – Концентрация фексофенадина в плазме крови крыс после введения ротенона мкг/мл (среднее \pm SD, n=5 на каждую временную точку)

| Серия эксперимента | Время после внутривенного введения фексофенадина (мин) | | | | | |
|--------------------|--|---------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| | 5 | 10 | 15 | 30 | 45 | 60 |
| Контроль | 18236,8 \pm | 9749,3 \pm | 4326,1 \pm | 2257,6 \pm | 1763,9 \pm | 984,0 \pm |
| | 3718,3 | 2712,4 | 1525,2 | 636,9 | 793,2 | 420,8 |
| Ротенон однократно | 14002,4 \pm | 10657,5 \pm | 5302,1 \pm | 2463,6 \pm | 1688,2 \pm | 1007,8 \pm |
| | 7565,3 | 2607,7 | 1147,7 | 761,5 | 637,6 | 373,6 |
| Ротенон 7 дней | 17566,4 \pm | 7333,3 \pm | 4386,0 \pm | 2360,6 \pm | 1795,9 \pm | 960,0 \pm |
| | 4468,8 | 5321,9 | 1699,8 | 606,7 | 863,8 | 389,2 |
| Ротенон 28 дней | 17631,2 \pm | 6630,8 \pm | 4487,1 \pm | 2761,8 \pm | 1713,2 \pm | 919,7 \pm |
| | 3434,9 | 2336,4 | 1462,9 | 782,8 | 850,7 | 389,2 |

Во всех экспериментальных сериях максимальная концентрация субстрата определялась через 5 мин после введения с постепенным снижением к 60 мин наблюдения. При этом плазменная концентрация фексофенадина во всех временных точках достоверно у животных изучаемых серий не различалась.

Значения концентраций фексофенадина в гомогенате коры больших полушарий головного мозга крыс экспериментальных серий представлены в Таблице 6.

Таблица 6 – Концентрация фексофенадина в гомогенате коры больших полушарий головного мозга крыс после введения ротенона, мкг/г ткани (медиана, верхний и нижний квартиль, n=5 на каждую временную точку)

| Серия эксперимента | Время после внутривенного введения фексофенадина (мин) | | | | | |
|--------------------|--|------------------|-----------------|-------------------|-----------------|-----------------|
| | 5 | 10 | 15 | 30 | 45 | 60 |
| Контроль | 166,7 | 91,7 | 80,9 | 139,2 | 85,0 | 57,2 |
| | (140,2; 236,0) | (73,5; 112,3) | (73,4; 88,3) | (138,0; 150,3) | (73,2; 99,3) | (52,1; 65,6) |

| | | | | | | |
|--|----------------------------|------------------------------|------------------------------|----------------------------|----------------------------|--------------------------|
| Ротенон однократно | 146,0 (143,3; 147,2) | 152,9 (133,5; 162,3) | 128,3 (122,7; 161,3) | 130,8 (109,2; 184,7) | 78,7 (76,2; 89,3) | 52,3 (47,2; 55,6) |
| Ротенон 7 дней | 430,8 (226,0; 607,2) | 526,3 (252,9; 712,6)** | 188,3 (142,7; 501,9)** | 171,6 (139,2; 438,0) | 188,8 (173,3; 285,0) | 77,9 (52,3; 125,6) |
| Ротенон 28 дней | 236,0 (207,2; 236,7) | 282,6 (262,9; 316,4)** | 201,9 (168,9; 243,4)** | 148,6 (138,0; 169,9) | 154,1 (144,9; 160,4) | 77,0 (64,3; 77,9) |
| Примечание –** $p < 0,01$ – статистически значимые различия с показателями контроля. | | | | | | |

Содержание фексофенадина в гомогенате коры больших полушарий головного мозга контрольных животных достигало максимальных значений через 5 мин после его внутривенного введения, а затем постепенно снижалось. У некоторых животных через 30 мин после введения отмечалась вторая волна подъема уровня субстрата P_{gr} , которая снижалась к 60 мин.

Однократное подкожное введение ротенона достоверно не влияло на концентрацию фексофенадина в гомогенате коры больших полушарий головного мозга крыс во всех временных точках по сравнению с контролем.

В то же время концентрация фексофенадина в гомогенате коры больших полушарий головного мозга крыс после 7-дневного введения ротенона была выше контрольных значений через 10 и 15 мин в 5,7 и в 2,3 раза соответственно (в обоих случаях $p=0,004$), а после 28-дневного введения через 10 мин в 3,08 раза ($p=0,004$) и через 15 мин – в 2,5 раза ($p=0,004$).

Общее содержание фексофенадина в плазме крови и гомогенате коры больших полушарий головного мозга крыс после его внутривенного введения оценивали с помощью расчета площади под фармакокинетической кривой концентрация-время (AUC_{0-t}).

При внутривенном введении контрольным крысам фексофенадина AUC_{0-t} (плазма) и AUC_{0-t} (мозг) вещества составили 266,2 (246,4; 285,6) мкг/мл*мин и 5,9 (5,8; 6,6) мкг/г*мин соответственно, а отношение данных параметров AUC_{0-t}

(мозг) / AUC_{0-t} (плазма) – 0,020 (0,019; 0,022).

Однократное введение ротенона статистически значимо не влияло на AUC_{0-t} (плазма), AUC_{0-t} (мозг) фексофенадина и их отношение AUC_{0-t} (мозг) / AUC_{0-t} (плазма) по сравнению с показателями контроля.

В то же время введение животным ротенона в течение 7 дней приводило к возрастанию AUC_{0-t} (мозг) фексофенадина в 2,02 раза ($p=0,0163$) и отношения AUC_{0-t} (мозг) / AUC_{0-t} (плазма) – в 2,4 раза ($p=0,0283$). 28-дневное введение ротенона вызывало увеличение AUC_{0-t} (мозг) фексофенадина в 1,75 раза ($p=0,0283$), а отношения AUC_{0-t} (мозг) / AUC_{0-t} (плазма) – в 2,27 раза ($p=0,0163$) по сравнению с контролем. При этом показатели животных на 7 и 28 дни введения ротенона достоверно между собой не различались (Таблица 7).

Таблица 7 – 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. | | | |

Полученные результаты свидетельствуют о том, что ротенон самостоятельно не влияет на белок-транспортёр Pgp, то есть не является его прямым ингибитором/активатором. В то же время при развитии паркинсонического синдрома, вызванного длительным (в течение 7 и 28 дней) введением ротенона, отмечается повышение проникновения маркерного субстрата Pgp – фексофенадина в головной мозг, что, учитывая данные об отсутствии изменения количества

транспортера в головном мозге животных, скорее всего, связано с повреждением ГЭБ.

3.4. Проницаемость гематоэнцефалического барьера при экспериментальном паркинсоническом синдроме

Для проверки гипотезы о повышении проницаемости ГЭБ на фоне развития экспериментального паркинсонического синдрома был выполнен эксперимент по исследованию проникновения азокрасителя синего Эванса в ткани мозга экспериментальных животных, а также в коре больших полушарий методом вестерн-блот было оценено относительное количество основных белков межклеточных контактов эндотелиальных клеток: ZO-1, окклюдина и E-кадгерина.

Моделирование экспериментального паркинсонического синдрома подкожным введением ротенона в дозе 2,5 мг/кг 1 раз в день в течение 7 и 28 сут. сопровождалось нарушением проницаемости ГЭБ, что подтверждалось накоплением в ткани головного мозга животных диазокрасителя синего Эванса, который в норме в ЦНС не проникает. Уровень красителя в мозге на фоне введения ротенона имел тенденцию к повышению по сравнению с показателями контроля на 7 день в 1,57 раза ($p=0,0805$), а на 28 день превышал их в 2,11 раза ($p=0,0031$) (Рисунок 9).

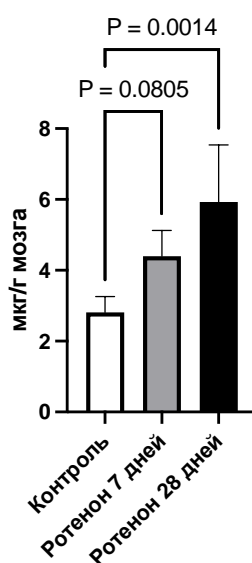


Рисунок 9 – Накопление красителя синего Эванса в головном мозге крыс при экспериментальном паркинсоническом синдроме, среднее \pm SD, n=5

При изучении уровня белков межклеточных контактов в коре больших полушарий головного мозга крыс при экспериментальном паркинсоническом синдроме были получены следующие результаты. Относительное количество ZO-1 снижалось на 7 сутки введения ротенона на 18,2% ($p=0,02$), относительное количество E-кадгерина уменьшалось на 7 сутки на 44,6% ($p=0,003$), на 28 сутки – на 28,1% ($p=0,01$), а относительное количество окклюдина снижалось на 36,5% ($p=0,002$) и 24,5% ($p=0,003$) на 7 и 28 сутки соответственно (Рисунок 10).

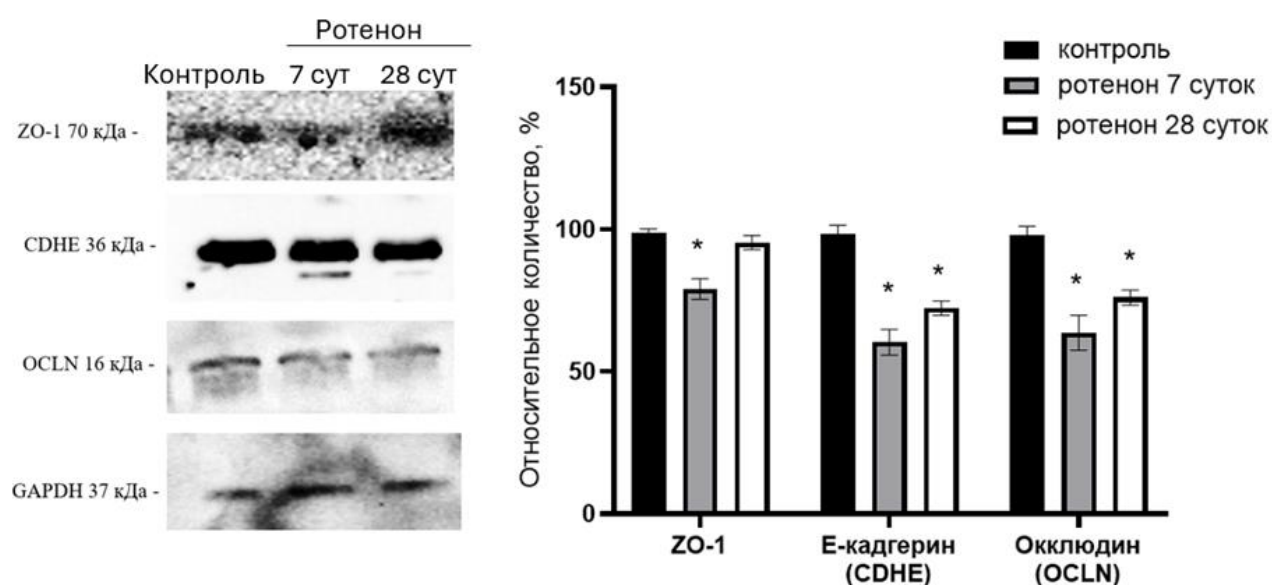


Рисунок 10 – Относительное количество белков межклеточных контактов ZO-1, E-кадгерина, окклюдина в головном мозге крыс при экспериментальном паркинсоническом синдроме, среднее \pm SD, n=5

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 вследствие нарушения структуры барьера, в частности со снижением уровня белков плотных межклеточных контактов эндотелиальных клеток.

3.5. Выраженность окислительного стресса при экспериментальном паркинсоническом синдроме

Для изучения механизмов, лежащих в основе полученных результатов – повышения экспрессии гена *mdr1a* при отсутствии изменения количества белка Pgp и повышения проницаемости ГЭБ при моделировании экспериментального паркинсонизма – была оценена выраженность окислительного стресса в коре больших полушарий головного мозга крыс. Для этого анализировали в гомогенате коры больших полушарий головного мозга крыс концентрации продуктов перекисного окисления липидов, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой (ТБК-реактивных продуктов), содержание продуктов окисления белков – карбонильных производных белков, уровень свободных небелковых SH-групп и активность антиоксидантного фермента Se-зависимой глутатионпероксидазы.

Развитие паркинсонического синдрома, вызванного введением ротенона, сопровождалось активацией свободнорадикального окисления в коре больших полушарий головного мозга крыс, о чем свидетельствует повышение уровня ТБК-реактивных продуктов на 7 день на 69,3% ($p=0,0009$), на 28 день – на 116,2% ($p=0,0001$) по сравнению с показателями контроля, увеличение концентрации карбонильных производных белков на 7 день – на 87,3% ($p=0,0027$), на 28 день – на 122,5% ($p=0,0001$) и снижение содержания небелковых SH-групп на 28 день – на 53,9% ($p=0,0088$).

Активность антиоксидантного фермента Se-зависимой глутатионпероксидазы на 7 день эксперимента имела тенденцию к повышению на 21,3% ($p=0,0828$) по сравнению с контролем, а на 28 день снижалась на 27,4% ($p=0,0238$) (Таблица 8).

Таблица 8 – 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*** |
| Небелковые 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, (данные представлены в виде среднего±SD – при нормальном распределении данных, медианы, нижнего и верхнего квартилей при распределении отличном от нормального). | | | |

Дополнительно методом вестерн-блот при развитии паркинсонического синдрома было оценено относительное количество и внутриклеточная локализация редокс-чувствительного транскрипционного фактора Nrf2.

Как на 7, так и на 28 день экспериментальной патологии относительное количество цитоплазматической фракции Nrf2 статистически значимо не изменялось по сравнению с показателями контроля. В отличие от этого относительное количество ядерной фракции Nrf2 увеличивалось на 7 день введения ротенона на 138,3% (p=0,0001), а на 28 день – на 137,9% (p=0,001) по сравнению со значениями контроля. Также отмечалось увеличение интегрального показателя – соотношения ядерной фракции Nrf2 к цитоплазматической: оно увеличивалось на 7 день – на 167,5% (p=0,0094), на 28 день – на 172,9% (p=0,0056). Полученные результаты свидетельствуют об активации Nrf2 (Рисунок 11).

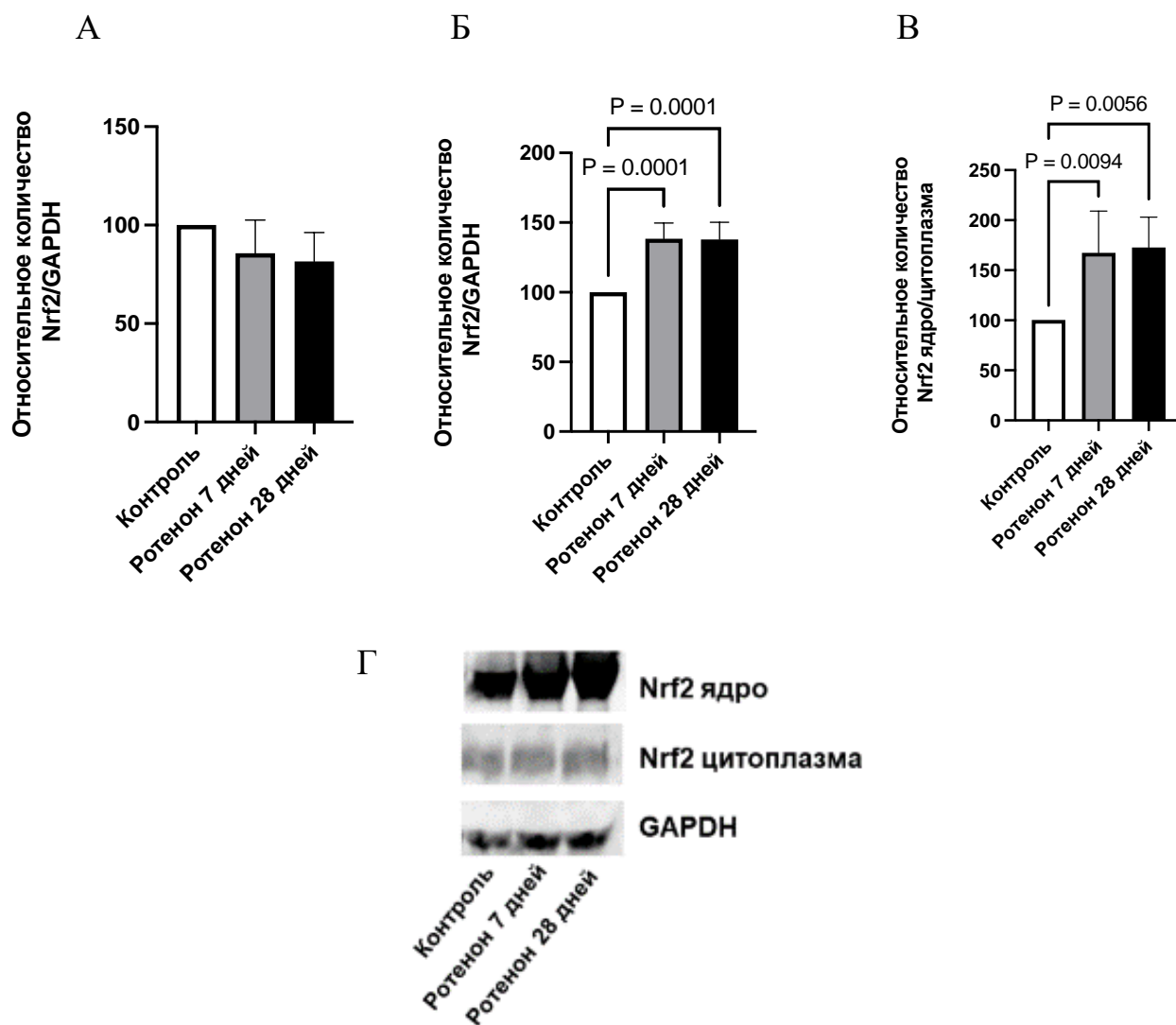


Рисунок 11 – Относительное количество Nrf2 в цитоплазматической и ядерной фракциях коры больших полушарий головного мозга крыс при экспериментальном паркинсоническом синдроме, среднее \pm SD, n=5

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

Таким образом, в ходе настоящего исследования установлено, что моделирование экспериментального паркинсонического синдрома сопровождается развитием окислительного стресса в коре больших полушарий головного мозга крыс, что проявляется в увеличении уровня продуктов окисления липидов и белков, а также снижением концентрации небелковых SH-групп. При этом происходит мобилизация и антиоксидантной системы защиты – на 7 сутки растет активность Se-зависимой глутатионпероксидазы, на протяжении всего

эксперимента активируется транскрипционный фактор Nrf2. Активация Nrf2 может вызывать повышение экспрессии гена *mdr1a*, выявленное нами ранее, при этом развитие окислительного стресса может сопровождаться повреждением белковой молекулы Pgp, что приводит к тому, что его количество не изменяется. Развитие окислительного стресса также может вызывать повреждение ГЭБ и повышение проникновения веществ в головной мозг.

3.6. Разработка и валидация методики количественного определения ротенона в коре больших полушарий головного мозга крыс методом ВЭЖХ

Ротенон является субстратом Pgp, поэтому на следующем этапе исследования планировалось оценить стратегию индукции белка-транспортера с целью профилактики развития экспериментального паркинсонизма, вызванного нейротоксином (предположительно, транспортер должен препятствовать проникновению нейротоксина в головной мозг и предотвращать развитие токсического паркинсонизма). В рамках выполнения данного блока работ оценивалось проникновение ротенона в головной мозг при индукции Pgp, а также выраженность симптомов паркинсонизма при введении ротенона на фоне индукции транспортера.

Вначале, для анализа концентрации ротенона в коре больших полушарий головного мозга крыс разрабатывалась методика его количественного анализа.

Определение ротенона в гомогенате коры больших полушарий головного мозга крыс осуществляли с использованием хроматографической системы Stayer («Аквилон», Россия) с УФ-спектрофотометрическим детектором UVV 104, при длине волны 296 нм. Применяли обращенно-фазную хроматографическую колонку Luna C18 100Å (250*4,6) с зернением 5 мкм. Ввод проб в петлю хроматографа осуществляли шприцом Microsyringes («Hamilton», Германия).

В качестве биологической матрицы использовался гомогенат данной ткани интактных крыс, полученный от 5 разных животных. Образцы мозга хранили в морозильной камере при -80°C .

Пробоподготовка осуществлялась следующим образом: ткань мозга массой 500 мг гомогенизировали при 24 000 об./мин в 500 мкл деионизированной воды в течение 1 мин на гомогенизаторе DIAH 900. Осаждение белков осуществляли ацетонитрилом (2,5 мл) путем встряхивания на шейкере при 500 об./мин в течение 10 мин, после чего центрифугировали при 1750 g в течение 10 мин и отбирали надосадочную жидкость.

Подготовка калибровочных растворов осуществлялась следующим образом: 5,0 мг ротенона растворяли в 5 мл ацетонитрила для получения матричного раствора с концентрацией 1,0 мг/мл. Из него путем разведения в деионизированной воде готовили 5 рабочих растворов в объеме 5 мл с концентрацией 62,5, 125,0, 250,0, 500,0, 1000,0 нг/мл, которые добавляли в объеме 500 мкл к 500 мг ткани мозга с последующей гомогенизацией. Матричный и рабочие растворы хранили при температуре -80°C . Диапазон концентраций целевого вещества был выбран на основе ожидаемых значений при внутривенном введении раствора ротенона крысам вистар.

Органический слой упаривали на роторно-вакуумном испарителе («Heidolph instruments», Германия). Сухой остаток растворяли в 250 мкл подвижной фазы и 100 мкл раствора вводили в хроматограф.

Условия хроматографирования были следующими: температура разделения – 37°C , скорость потока – 1 мл/мин. Подвижная фаза состояла из ацетонитрила и воды в объемном отношении 30:70. Время удерживания ротенона в данных условиях составило в среднем 6,72 мин.

Валидацию биоаналитической методики выполняли согласно Руководству по экспертизе лекарственных средств, том I, Правилам проведения исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов в рамках Евразийского экономического союза, 2016, Руководства EMA Guideline on bioanalytical method validation 1 и FDA Guidance for Industry: Bioanalytical method validation. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER). U.S. Government Printing Office: Washington, DC, 2018. European Medicines Agency. Committee for medicines products for human

use: London, 2011 по следующим параметрам: селективность; калибровочная кривая (линейность); нижний предел количественного определения; правильность; прецизионность; перенос пробы; стабильность ротенона в гомогенате мозга.

Селективность. Проводили анализ холостой пробы гомогената коры больших полушарий головного мозга крыс без добавления стандарта ротенона и образцов гомогената мозга с добавлением рабочих растворов ротенона до конечных концентраций 62,5–1000,0 нг/г. На хроматограммах образцов холостой пробы гомогената коры больших полушарий головного мозга крыс не наблюдалось пиков со временем удерживания, соответствующим времени удерживания ротенона (Рисунки 12, 13). Предел обнаружения ротенона в гомогенате коры больших полушарий головного мозга крыс составил 25,0 нг/г, при этом отношение сигнала к шуму (базовой линии) было не менее 3.

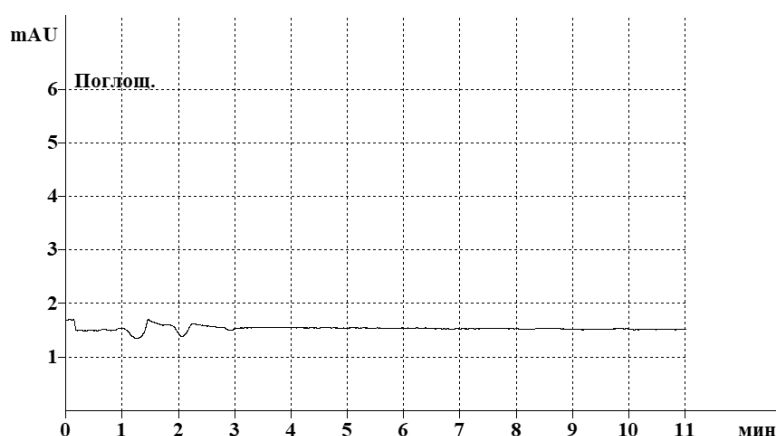


Рисунок 12 – Хроматограмма холостой матрицы

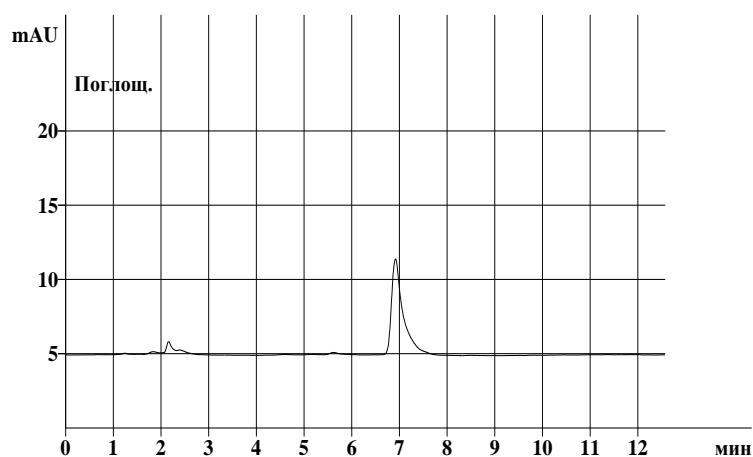


Рисунок 13 – Хроматограмма матрицы с добавлением рабочего раствора ротенона до конечной концентрации 125,0 нг/г

Нижний предел количественного определения ротенона составил 62,5 нг/г. При этом соотношение сигнала к шуму было не ниже 10, а точность и прецизионность определения не превышали 20%.

Калибровочная кривая. Проводили анализ 5 образцов холостой пробы гомогената коры больших полушарий головного мозга крыс с добавлением равных объемов рабочих растворов ротенона до получения концентраций 62,5, 125,0, 250,0, 500,0, 1000,0 нг/г. Калибровочные растворы готовили в 3 повторах. По результатам были построены 3 калибровочных графика в координатах зависимость площади пика ротенона от концентрации целевого вещества. Были получены следующие уравнения регрессии: $y = 2,9854x - 40,106$; $R^2 = 0,9981$; $y = 3,0619x - 49,706$; $R^2 = 0,9987$; $y = 3,0783x - 46,99$; $R^2 = 0,9971$. Рассчитанные коэффициенты корреляции соответствовали принятой норме (не менее 0,99). Отклонения концентраций калибровочных образцов, рассчитанные по уравнению линейной зависимости, от номинальных значений не превышали допустимых пределов (не более 20% для нижнего предела количественного определения и не более 15% – для более высоких концентраций калибровочных растворов) (Таблица 9).

Таблица 9 – Отклонения концентраций ротенона в калибровочных образцах от их номинальных значений

| Концентрация номинальная, нг/г | График 1 | | График 2 | | График 3 | |
|--------------------------------|---------------------------------|-------------|---------------------------------|-------------|---------------------------------|-------------|
| | концентрация рассчитанная, нг/г | точность, % | концентрация рассчитанная, нг/г | точность, % | концентрация рассчитанная, нг/г | точность, % |
| 62,5 | 69,0 | 10,4 | 65,3 | 4,5 | 66,8 | 6,9 |
| 125,0 | 140,2 | 12,1 | 138,3 | 10,6 | 143,1 | 14,5 |
| 250,0 | 243,1 | 2,8 | 246,1 | 1,6 | 248,2 | 0,7 |
| 500,0 | 473,9 | 5,21 | 478,8 | 4,2 | 466,0 | 6,8 |
| 1000,0 | 1011,4 | 1,14 | 1009,0 | 0,9 | 1013,1 | 1,3 |

Точность и прецизионность. Проводился анализ образцов гомогенатов коры больших полушарий головного мозга крыс с добавлением рабочих растворов ротенона до получения контролей качества следующих концентраций: 62,5, 200,0, 500,0 и 800,0 нг/г. Образцы анализировались в рамках трех циклов. Для оценки

точности и прецизионности внутри первого цикла анализировались 5 образцов каждой концентрации ротенона. Межцикловые точность и прецизионность анализировались во втором и третьем циклах. Значения стандартного отклонения (величина прецизионности) и относительной погрешности (величина точности) не превышали 20% (для нижнего предела количественного определения) и 15% (для всех остальных точек), что соответствует общепринятым нормам (Таблицы 10, 11).

Таблица 10 – Точность и прецизионность методики количественного определения ротенона в гомогенате коры больших полушарий головного мозга крыс внутри цикла

| Концентрация номинальная, нг/г | Концентрация рассчитанная, нг/г | Точность, % | Среднее, нг/г | Средняя точность, % | SD | Прецизионность, % |
|--------------------------------|---------------------------------|-------------|---------------|---------------------|------|-------------------|
| 62,5 | 66,8 | 6,9 | 66,6 | 6,6 | 2,2 | 3,3 |
| | 64,6 | 3,4 | | | | |
| | 70,3 | 12,5 | | | | |
| | 65,2 | 4,3 | | | | |
| | 66,4 | 6,2 | | | | |
| 200,0 | 209,3 | 4,65 | 207,8 | 3,9 | 16,1 | 7,7 |
| | 210,8 | 5,4 | | | | |
| | 221,4 | 10,7 | | | | |
| | 180,3 | 9,9 | | | | |
| | 217,0 | 8,5 | | | | |
| 500,0 | 465,9 | 6,8 | 471,4 | 5,7 | 10,3 | 2,2 |
| | 473,1 | 5,4 | | | | |
| | 488,4 | 2,3 | | | | |
| | 461,3 | 7,7 | | | | |
| | 469,5 | 6,1 | | | | |
| 800,0 | 785,4 | 1,8 | 773,5 | 3,3 | 25,3 | 3,3 |
| | 766,4 | 4,2 | | | | |
| | 805,3 | 0,7 | | | | |
| | 774,1 | 3,2 | | | | |
| | 726,5 | 7,9 | | | | |

Таблица 11 – Точность и прецизионность методики количественного определения ротенона в гомогенате коры больших полушарий головного мозга крыс между циклами

| Концентрация номинальная, нг/г | Концентрация рассчитанная, нг/г | Точность, % | Среднее, нг/г | Средняя точность, % | SD | Прецизионность, % |
|--------------------------------|---------------------------------|-------------|---------------|---------------------|------|-------------------|
| 62,5 | 66,6 | 6,6 | 68,0 | 8,9 | 2,0 | 2,9 |
| | 67,2 | 7,5 | | | | |
| | 70,3 | 12,5 | | | | |
| 200,0 | 207,8 | 3,8 | 193,2 | 3,4 | 13,1 | 6,7 |
| | 181,9 | 9,1 | | | | |
| | 190,1 | 5,0 | | | | |
| 500,0 | 471,6 | 5,6 | 483,7 | 3,3 | 14,1 | 2,9 |
| | 499,2 | 0,2 | | | | |
| | 480,3 | 3,9 | | | | |
| 800,0 | 773,2 | 3,3 | 774,0 | 3,3 | 11,0 | 1,4 |
| | 785,2 | 1,9 | | | | |
| | 763,2 | 4,6 | | | | |

Стабильность. Для оценки стабильности ротенона в гомогенате коры головного мозга крыс при хранении в замороженном состоянии (при -80°C) в течение 60 дней, при 3-кратной заморозке-разморозке, а также в течение 10 ч при комнатной температуре после пробоподготовки готовили образцы с концентрацией 200,0 и 800,0 нг/г. Половину образцов анализировали сразу после приготовления, а остальные – после хранения в замороженном состоянии, заморозки-разморозки или при хранении после пробоподготовки. Во всех случаях анализировали по 3 независимых образца. Точность для каждой концентрации (для средних значений) находилась в пределах 15% от номинальных значений.

Перенос пробы. При последовательном анализе пробы гомогената мозга с концентрацией ротенона 1000,0 нг/г и образца холостой пробы гомогената мозга на хроматограмме холостой пробы отсутствовали пики, соответствующие по времени удерживания пикам ротенона.

Таким образом, разработана и валидирована методика количественного определения ротенона в гомогенате коры больших полушарий головного мозга крыс. Данная методика является селективной, чувствительной, точной и

прецизионной и позволяет оценить содержание ротенона в коре больших полушарий головного мозга крыс с целью изучения его проникновения через гематоэнцефалический барьер.

3.7. Проникновение ротенона в головной мозг крыс при индукции активности гликопротеина-P

При оценке возможности снижения проникновения субстрата Pgp – нейротоксина ротенона в головной мозг при индукции белка-транспортера были получены следующие результаты. Индукцию Pgp вызывали внутрижелудочным введением рифампицина в дозе 20 мг/кг два раза в день в течение 14 дней. Для подтверждения индукции Pgp оценивали количество транспортера в среднем мозге, стриатуме и коре больших полушарий головного мозга крыс.

В ходе исследования было показано, что введение рифампицина в течение 14 дней вызывает повышение количества Pgp в стриатуме в 6,1 раза ($p=0,004$), в среднем мозге в 3,3 раза ($p=0,004$), в коре больших полушарий в 2,79 раза ($p=0,004$) (Таблица 12). Полученные данные подтверждают индукцию изучаемого белка-транспортера.

Таблица 12 – Влияние рифампицина на количество Pgp в стриатуме, среднем мозге и коре больших полушарий головного мозга крыс (медиана, верхний и нижний квартили, $n=5$ в каждой серии)

| Серия эксперимента | Стриатум, пг/мг белка | Средний мозг, пг/мг белка | Кора больших полушарий, пг/мг белка |
|--|-----------------------------|-----------------------------|-------------------------------------|
| Контроль | 325,2 (261,01; 702,4) | 331,7 (304,5; 382,1) | 305,3 (289,35; 309,5) |
| Рифампицин 14 дней | 1995,8 (1532,9; 2107,3)* | 1095,4 (943,7; 1245,61)* | 853,79 (835,23; 950,57)* |
| Примечание – * $p<0,01$ – статистически значимые различия с показателями контроля. | | | |

При этом количество дофамина в стриатуме и среднем мозге крыс достоверно от значений контроля не отличалось (Рисунок 14).

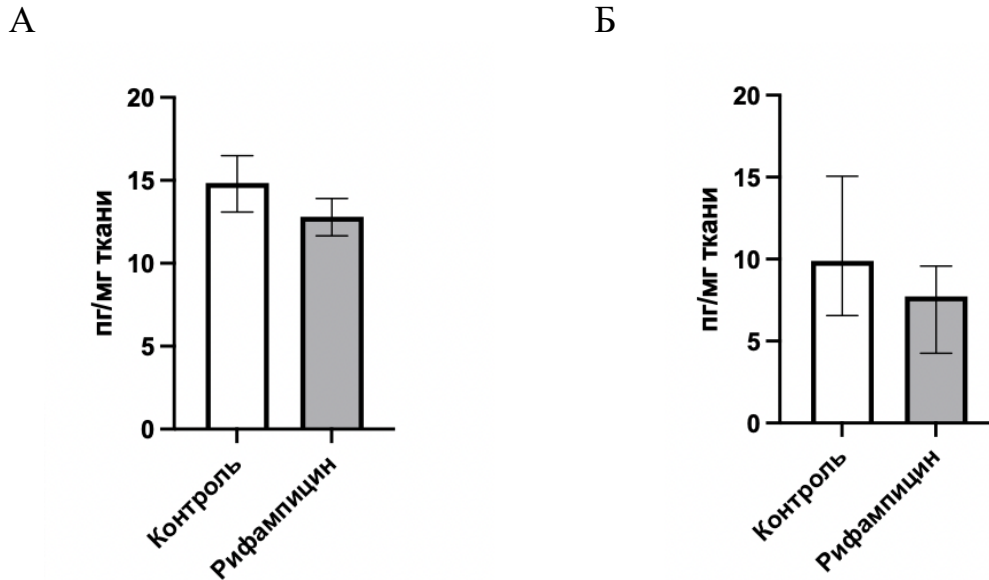


Рисунок 14 –Уровень дофамина в стриатуме и среднем мозге после введения рифампицина (медиана, нижний и верхний квартили, n=5)

Примечание – А – стриатум; Б – средний мозг.

При изучении концентрации ротенона в гомогенате коры больших полушарий головного мозга крыс после его внутривенного введения в дозе 0,2 мг/кг массы контрольным крысам и животным после курсового введения рифампицина были получены следующие результаты.

Концентрация ротенона в коре больших полушарий головного мозга контрольных крыс достигала максимальной концентрации на 5 мин после внутривенного введения тестируемого вещества, а затем постепенно снижалась, достигая минимальных значений на 30 мин.

При введении ротенона после предварительной индукции Pgr курсовым введением рифампицина концентрация нейротоксина в головном мозге крыс через 5 мин после введения снижалась на 46,6% ($p < 0,001$) по сравнению с контролем, а в остальные сроки достоверно от него не отличалась. При это концентрация ротенона также плавно снижалась от 5 к 30 мин (Таблица 13).

Таблица 13 – Влияние индукции Pgp на концентрацию ротенона в коре больших полушарий головного мозга крыс (нг/г ткани, среднее±SD, n=5 на каждую временную точку)

| Серия эксперимента | Время после внутривенного введения ротенона | | |
|--------------------|---|------------|-----------|
| | 5 мин | 15 мин | 30 мин |
| Контроль | 325,0±44,6 | 134,3±36,9 | 79,9±8,2 |
| Рифампицин 14 дней | 173,5±14,9* | 122,8±25,6 | 74,0±26,6 |

Примечание – * p<0,001 – статистически значимые различия с показателями контроля.

Дополнительно в рамках исследования рассчитывали значение площади под кривой концентрация ротенона в мозге-время – AUC0-t, которая показывает общее количество ротенона, проникшее в головной мозг через гематоэнцефалический барьер (Рисунок 15). В ходе исследования было показано, что AUC0-t ротенона в мозге животных, которым предварительно вводили рифампицин, была на 28,1% (p=0,0055) ниже, чем у контрольных животных.

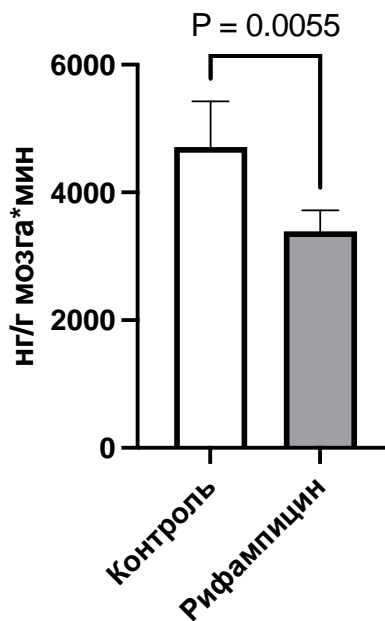


Рисунок 15 – Влияние индукции Pgp на общее количество ротенона (AUC0-t) в коре больших полушарий головного мозга крыс (среднее±SD, n=5)

Таким образом, в совокупности полученные результаты свидетельствуют о том, что предварительная индукция Pgr в ГЭБ коры больших полушарий головного мозга крыс, вызванная введением рифампицина, приводит к снижению проникновения ротенона в головной мозг после его внутривенного введения.

3.8. Влияние индукции гликопротеина-P в гематоэнцефалическом барьере на развитие экспериментального паркинсонического синдрома, вызванного нейротоксином ротеноном

На заключительном этапе исследования оценивалась возможность профилактики развития экспериментального паркинсонизма, вызванного введением ротенона, за счет предварительной индукции Pgr с помощью курсового применения рифампицина.

Рифампицин вводили внутривенно в дозе 20 мг/кг два раза в день в течение 7 суток, а затем в течение 7 или 28 дней – в аналогичной дозе совместно с ротеноном, который вводили подкожно в дозе 2,5 мг/кг один раз в сутки.

Предварительное введение рифампицина перед введением ротенона, а затем совместно с нейротоксином в течение 7 и 28 дней приводило к повышению количества Pgr в стриатуме в 3,37 раза ($p=0,024$) и 4,2 раза ($p=0,009$), в среднем мозге – в 2,38 раза ($p=0,016$) и в 2,36 раза ($p=0,066$), в коре больших полушарий – в 2,69 раза ($p=0,048$) и 2,96 раза ($p=0,009$) соответственно по сравнению с контролем. Полученные данные свидетельствуют об индукции Pgr при совместном введении рифампицина и ротенона (Таблица 14).

Таблица 14 – Влияние комбинации рифампицина и ротенона на количество Pgr (пг/мг белка) в стриатуме, среднем мозге и коре больших полушарий головного мозга крыс (медиана, верхний и нижний квартили, $n=5$ в каждой серии)

| 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. | | | |

При оценке уровня дофамина в стриатуме и среднем мозге при введении ротенона на фоне индукции Pgp были получены следующие результаты. Содержание дофамина в стриатуме на 7 день введения комбинации веществ достоверно от показателей контроля не отличалось, а на 28 день снижалось на 63,9% (p=0,027). Концентрация дофамина в среднем мозге как на 7, так и на 28 сутки введения комбинации ротенона и рифампицина достоверно от значений контроля не отличалась (p>0,05).

При этом стоит отметить, что концентрация дофамина в стриатуме и среднем мозге при изолированном введении ротенона снижалась как на 7, так и на 28 сутки эксперимента (Таблица 15).

Таблица 15 – 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 дофаминаа в среднем мозге |
|--|------------------------------|-----------------------------------|
| Контроль | 14,8 (13,9; 15,9) | 9,9 (7,5; 13,0) |
| Ротенон 7 дней | 4,5 (2,2; 5,6)* | 2,7 (1,7; 5,9)# |
| Ротенон 28 дней | 0,88 (0,66; 1,03)** | 3,1 (2,7; 4,0)* |
| 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, ** p<0,01 –статистически значимые различия с показателями контроля; # p<0,1 – различия с показателями контроля (серия 1, введение масла подсолнечного); ^ p<0,01 – статистически значимые различия с серией изолированного введения ротенона. | | |

При оценке выраженности признаков паркинсонизма у животных, которым вызывали индукцию Pgp перед введением ротенона, были получены следующие результаты.

Изолированное внутрижелудочное введение рифампицина в дозе 20 мг/кг массы два раза в день в течение 14 дней статистически значимо не влияло на поведение животных, изучаемые показатели не отличались от значений у контрольных животных.

На 7 день введения комбинации рифампицина и ротенона у животных начинали развиваться типичные признаки паркинсонизма – постуральная нестабильность, неустойчивость походки, ригидность мышц и тремор покоя. При этом суммарное значение баллов, характеризующее выраженность клинической картины паркинсонизма, превышало показатели контроля и не отличалось от значений животных серии изолированного применения ротенона (Таблица 16).

Таблица 16 – Признаки выраженности паркинсонизма на 7 день при предварительной индукции Pgp перед моделированием экспериментального паркинсонического синдрома (медиана, верхний и нижний квартили, n=5 в каждой серии)

| Серия/показатель | Контроль | Рифампицин 14 дней | Ротенон 7 дней | Рифампицин+ротенон 7 дней |
|--|----------|-----------------------|-------------------|------------------------------|
| Гипо-, бради- и олигокинезия, баллы | 0 (0; 0) | 0 (0; 0) | 0 (0; 0) | 0 (0; 0) |
| Постуральная нестабильность, баллы | 0 (0; 0) | 0 (0; 0) | 1 (1; 1)* | 1 (1; 1)* |
| Неустойчивость походки, баллы | 0 (0; 0) | 0 (0; 0) | 1 (1; 1)* | 1 (1; 1)* |
| Ригидность мышц, баллы | 0 (0; 0) | 0 (0; 0) | 0 (0; 1) | 1,0 (0,25; 1) |
| Тремор покоя, баллы | 0 (0; 0) | 0 (0; 0) | 0 (0; 1) | 1,0 (0,25; 1) |
| Оценка равновесия, баллы | 0 (0; 0) | 0 (0; 0) | 1 (1; 2)* | 1 (1; 1)* |
| Суммарное значение, баллы | 0 (0; 0) | 0 (0; 0) | 4,5 (3; 6)* | 5 (3,5; 5,0)* |
| Примечание – * p<0,05– статистически значимые различия с показателями контроля; # p<0,05 – статистически значимые различия с изолированным введением ротенона. | | | | |

В то же время предварительная индукция Рgr у крыс, которым вводили ротенон в течение 28 дней, приводила к уменьшению выраженности признаков паркинсонизма по сравнению с крысами, получавшими только ротенон (Таблица 17), суммарный балл выраженности признаков паркинсонизма снизился на 43,7% ($p < 0,05$), однако, он все равно превышал показатели контрольных животных ($p < 0,05$) (Таблица 17).

Таблица 17 – Признаки выраженности паркинсонизма на 28 день при предварительной индукции Рgr перед моделированием экспериментального паркинсонического синдрома (медиана, верхний и нижний квартили, $n=5$ в каждой серии)

| Серия/показатель | Контроль | Рифампицин 14 дней | Ротенон 28 дней | Рифампицин+ ротенон 28 дней |
|--|----------|-----------------------|--------------------|-----------------------------------|
| Гипо-, бради- и олигокинезия, баллы | 0 (0; 0) | 0 (0; 0) | 1 (1; 2)* | 0 (0; 0)# |
| Постуральная нестабильность, баллы | 0 (0; 0) | 0 (0; 0) | 1 (1; 2)* | 1 (1; 1)* |
| Неустойчивость походки, баллы | 0 (0; 0) | 0 (0; 0) | 1 (0; 2) | 1 (1; 1)* |
| Ригидность мышц, баллы | 0 (0; 0) | 0 (0; 0) | 2 (1; 2)* | 1 (0; 1) |
| Тремор покоя, баллы | 0 (0; 0) | 0 (0; 0) | 1 (1; 2)* | 1 (0; 1) |
| Оценка равновесия, баллы | 0 (0; 0) | 0 (0; 0) | 2 (2; 3)* | 1 (1; 1)*, # |
| Суммарное значение, баллы | 0 (0; 0) | 0 (0; 0) | 8 (6; 8)* | 4,5 (3,5; 5)*, # |
| Примечание – * $p < 0,05$ – статистически значимые различия с показателями контроля; # $p < 0,05$ – статистически значимые различия с изолированным введением ротенона. | | | | |

Таким образом, профилактическая индукция Рgr в головном мозге крыс, вызванная введением рифампицина, перед введением ротенона, снижает выраженность паркинсонического синдрома, моделируемого нейротоксином.

ОБСУЖДЕНИЕ

Болезнь Паркинсона (БП) – это нейродегенеративное заболевание центральной нервной системы (ЦНС), которое приводит к потере дофамин-продуцирующих нейронов в черной субстанции [30]. Данное заболевание является вторым по распространенности в мире нейродегенеративным заболеванием после болезни Альцгеймера [19]. Распространенность БП в Российской Федерации составляет от 48,9 до 139,9 на 100000 населения [35].

Причиной БП может быть множество различных факторов, как эндогенных, так и экзогенных. Одним из значимых на сегодняшний день является воздействие нейротоксинов, в первую очередь пестицидов [34]. Люди, которые имеют контакт с пестицидами, заболевают в 1,5 раза чаще [3].

Гематоэнцефалический барьер (ГЭБ) – защитный барьер, ограничивающий ЦНС от нейротоксических веществ, циркулирующих в крови [207]. Характерной особенностью данного барьера является наличие плотных связей между эндотелиальными клетками за счет присутствия белков межклеточных контактов, а также эффлюксных белков-транспортеров, в частности гликопротеина-P (Pgp), что делает барьер низкопроницаемым для различных веществ [27].

Pgp является трансмембранным АТФ-зависимым белком-транспортером, который осуществляет эффлюкс эндогенных и экзогенных веществ различной химической природы, тем самым препятствует их проникновению в клетки [197]. Pgp играет защитную роль, предупреждая проникновение своих субстратов через ГЭБ в головной мозг и выводя их обратно в просвет сосуда [206].

В имеющихся исследованиях по изучению функционирования и экспрессии Pgp в ГЭБ при БП получены противоречивые результаты. Ряд авторов наблюдали увеличение проникновения субстратов Pgp в ткань мозга, что связывали со снижением активности транспортера при патологии [189, 61, 78] или выявляли значительное снижение экспрессии Pgp [66]. В то же время в других исследованиях не было получено данных об изменении в количестве белка [55] или было установлено значительное его увеличение [20, 38].

В ходе выполнения диссертационного исследования мы провели комплексную оценку локализации Pgp, экспрессии гена *mdr1a*, кодирующего транспортер и количества данного белка при экспериментальном паркинсоническом синдроме, проанализировали состояние ГЭБ, изучили биохимические механизмы данных изменений и оценили роль Pgp в защите головного мозга от воздействия нейротоксина – субстрата транспортера, вызывающего развитие токсического паркинсонизма.

Экспериментальный паркинсонический синдром моделировали подкожным введением ротенона крысам вистар в дозе 2,5 мг/кг массы один раз в день в течение 7 и 28 дней. Ротенон является мощным ингибитором митохондриального комплекса I. Это приводит к накоплению активных форм кислорода, что в конечном итоге приводит к повреждению клеток [101] и вызывает высокоселективную нейродегенерацию дофаминергического nigростриарного пути с образованием включений альфа-синуклеина, которые сходны с тельцами Леви при БП [72,112].

Введение ротенона в течение 7 и 28 дней вызывало снижение концентрации дофамина в стриатуме и среднем мозге, а также приводило к развитию типичных признаков паркинсонизма: уменьшалась двигательная активность, появлялись поструральная нестабильность, неустойчивость походки, ригидность мышц и тремор покоя, нарушалось равновесие. Таким образом, выбранная экспериментальная модель паркинсонизма является адекватной.

В ходе настоящего исследования было установлено, что в головном мозге Pgp локализуется преимущественно в эндотелиальных клетках ГЭБ. Моделирование экспериментального паркинсонического синдрома приводило к повышению экспрессии гена *mdr1a* в среднем мозге, стриатуме и коре больших полушарий головного мозга крыс. В то же время количество белка Pgp и его локализация статистически значимо не изменялись. Для изучения механизмов данных изменений была оценена выраженность окислительного стресса в головном мозге крыс при экспериментальном паркинсоническом синдроме. Было установлено, что введение ротенона в течение 7 и 28 дней вызывало активацию

свободнорадикального окисления, накопление продуктов окисления липидов – ТБК-реактивных продуктов и продуктов окисления белков – карбонильных производных белков. Полученные результаты согласуются с данными литературы [183]. Так, Li N. и соавт. (2003) показали, что клетки HT1080, сверхэкспрессирующие супероксиддисмутазу магния, были более устойчивы к апоптозу, вызванному ротеноном, чем контрольные клетки [146]. Видимо, при введении ротенона происходит окисление молекулы Pgp, поэтому повышение уровня *mdr1a* не приводит к повышению количества белка.

В то же время при введении ротенона была выявлена активация редокс-чувствительного транскрипционного фактора Nrf2 – повышение его уровня в ядерной фракции коры больших полушарий головного мозга крыс.

Nrf2 – редокс-чувствительный фактор транскрипции, реагирующий на изменение соотношения восстановленных и окисленных SH-групп в белках. Его экспрессия увеличивается с развитием окислительного стресса и направлена на защиту клетки от воздействия свободных радикалов [47]. В нормальных условиях этот фактор транскрипции образует комплекс с белком-репрессором Keap 1 (их связывание регулируется рядом протеинкиназ), что, с одной стороны, способствует убиквитинированию и протеасомной деградации Nrf2 (необходимым условием этого процесса является наличие двух остатков цистеина в молекуле Keap 1), а с другой стороны, препятствует его проникновению из цитоплазмы в ядро [107, 154]. После активации комплекс Keap1-Nrf2 диссоциирует, Nrf2 транслоцируется в ядро, где связывается с элементами антиоксидантного ответа и активирует транскрипцию защитных ферментов и белков. Активация гена Nrf2 усиливает экспрессию генов, которые кодируют антиоксидантные ферменты в клетках, такие как гем-оксигеназа, глутатионпероксидаза и НАДН-хинон-оксидоредуктаза (NQO1). Кроме того, Nrf2 активирует митохондриальный фактор транскрипции А (TFAM), который регулирует репликацию митохондриальной ДНК (мтДНК) [101, 107].

В свою очередь Nrf2 является одним из основных факторов, стимулирующих

экспрессию *MDR1/mdr1* [141]. Таким образом, повышение экспрессии *mdr1a*, выявленное в нашем исследовании, может быть связано с активацией редокс-чувствительного фактора Nrf2.

На следующем этапе исследования оценивали проницаемость ГЭБ для субстрата Pgp – фексофенадина после его внутривенного введения при моделировании экспериментального паркинсонизма. Дополнительно анализировали влияние однократного введения ротенона на проникновение фексофенадина в головной мозг животных – для оценки прямого влияния нейротоксина на транспортер.

В ходе исследования было установлено, что однократное введение ротенона не влияет на проникновение фексофенадина в головной мозг животных, в то же время курсовое введение, вызывающее развитие экспериментального паркинсонизма, сопровождалось повышением проникновения субстрата Pgp через ГЭБ. Полученные результаты свидетельствуют о том, что сам ротенон не влияет на активность Pgp, а повышение проникновения фексофенадина, скорее всего, связано с повреждением ГЭБ.

В научной литературе результаты по исследованию проницаемости ГЭБ при БП противоречивы, однако большинство работ подтверждают гипотезу повышения проницаемости барьера. Pisani V. и соавт. (2012) обнаружили увеличение содержания альбумина в спинномозговой жидкости пациентов с БП по сравнению с контрольной группой [116]. Carvey P.M. и соавт. (2005) показали, что у крыс, которым вводили 6-гидроксидофамин (6-OHDA), происходило увеличение утечки меченного FITC-альбумина из сосудистого русла в полосатые тела мозга [38]. Gray M.T. соавт. (2015) обнаружили, что количество сывороточного белка, железа и экстравазированных эритроцитов при БП выше, чем в контрольном полосатом теле [104]. Напротив, Haussermann P. и соавт. (2001) в своем исследовании не выявили увеличения проницаемости ГЭБ при БП [121].

Для подтверждения сделанного вывода о повышении проницаемости ГЭБ были выполнены эксперименты по оценке проникновения в мозг синего Эванса, и изучено количество белков межклеточных контактов при моделируемом

экспериментальном паркинсоническом синдроме. Краситель синий Эванс при попадании в кровь образует прочную связь с альбумином и в норме не проникает через ГЭБ [131]. В ходе исследования показано достоверное повышение уровня красителя в мозге крыс на фоне введения ротенона по сравнению с контрольными животными, что свидетельствует о повышении проницаемости ГЭБ при введении ротенона.

Дополнительно анализировали количество белков межклеточных контактов ZO-1, окклюдина и E-кадгерина методом вестерн-блот. Данные белки соединяют между собой эндотелиальные клетки ГЭБ, ограничивая параклеточную диффузию переносимых кровью веществ [190]. Нами было выявлено снижение относительного количества всех изучаемых белков межклеточных контактов, что подтверждает связь повышения проникновения субстрата Pgp фексофенадина в головной мозг с повышением проницаемости ГЭБ вследствие нарушения структуры барьера, в частности снижения количества белков плотных межклеточных контактов – ZO-1, окклюдина и E-кадгерина.

На заключительном этапе исследования была изучена возможность снижения проникновения ротенона в головной мозг, а соответственно профилактики развития токсического паркинсонизма, при индукции Pgp.

Многие пестициды, такие как ротенон, диазинон, MPP+ и другие, являются субстратами Pgp, а значит их проникновение в головной мозг зависит от функционирования данного белка-транспортера [178]. В нескольких эпидемиологических исследованиях была показана связь этих пестицидов с повышенным риском развития БП, что также подтверждалось в моделях токсичности на животных и исследованиях *in vitro* [172]. Индукция Pgp в ГЭБ может увеличить Pgp-опосредованный эффлюкс нейротоксинов, что может быть использовано в терапевтических целях для повышения выведения из головного мозга эндогенных нейротоксичных соединений и снижения проникновения экзогенных нейротоксинов [202].

В настоящем исследовании индукцию Pgp вызывали внутрижелудочным введением рифампицина. Считается, что рифампицин повышает экспрессию Pgp,

действуя через PXR [6]. Нами было показано повышение содержания Pgr в среднем мозге, стриатуме и коре больших полушарий головного мозга крыс при введении рифампицина.

Для анализа концентрации ротенона в коре больших полушарий головного мозга была разработана чувствительная методика его количественного анализа. В доступной литературе был обнаружен ряд методик по определению уровня ротенона в плазме крови [132], растительных экстрактах [109, 219], головном мозге [195]. Однако авторы в основном использовали масс-спектрометрический метод детекции. Мы использовали более доступный УФ-спектрофотометрический способ. Методика была валидирована по всем параметрам согласно Руководству по экспертизе лекарственных средств, том I, правилам проведения исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов в рамках Евразийского экономического союза [113]. Ее аналитический диапазон составил 62,5 – 1000 нг/г, что позволяет ее использовать для оценки концентрации ротенона в образцах коры больших полушарий головного мозга крыс.

С помощью разработанной методики количественного определения ротенона было обнаружено, что индукция Pgr препятствует проникновению нейротоксина в головной мозг животных. На основании полученных данных было высказано предположение, что профилактическая индукция белка-транспортера может снизить проявления экспериментального паркинсонического синдрома, вызванного введением ротенона, и являться одним из способов профилактики развития данной патологии.

Стратегия индукции Pgr с целью защиты от токсических веществ описана в некоторых исследованиях. Так, индукция Pgr производными тиоксантоновой кислоты снижает токсичность, вызванную паракватом в клетках линии Caco-2 [170]. Лечение препаратами, которые повышают активность Pgr в ГЭБ, может быть многообещающим подходом для ослабления симптомов болезни Альцгеймера, вызванной отложением β -амилоида, путем усиления выведения нейротоксичных A β -пептидов из головного мозга [181].

В нашем исследовании было показано, что индукция Pgr в ГЭБ головного

мозга крыс с помощью курсового введения рифампицина вызывает снижение выраженности клинических проявлений паркинсонизма, а также повышает уровень дофамина в стриатуме и среднем мозге по сравнению с животными, которым не вводили рифампицин и моделировали паркинсонизм. Таким образом, нами было доказано, что профилактическая индукция Pgr снижает выраженность паркинсонического синдрома и может быть рассмотрена как новая терапевтическая/профилактическая стратегия.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в ходе настоящего исследования на крысах самцах вистар была изучена экспрессия, количество, локализация, активность и механизмы регуляции Pgp в головном мозге крыс на фоне экспериментального паркинсонического синдрома и перспектива индукции белка-транспортера для профилактики развития паркинсонизма, вызванного нейротоксином ротеноном.

Экспериментальный паркинсонический синдром моделировали подкожным введением ротенона один раз в день в дозе 2,5 мг/кг в течение 7 и 28 суток, а развитие патологии подтверждали по клинической картине и снижению уровня дофамина в среднем мозге и стриатуме.

В ходе исследования было установлено, что развитие экспериментального паркинсонического синдрома повышает экспрессию гена *mdr1a*, кодирующего Pgp, но это не приводит к изменению количества белка и его локализации в головном мозге крыс. Повышение экспрессии гена *mdr1a*, может быть связано с активацией редокс-чувствительного транскрипционного фактора Nrf2, что было выявлено в настоящем исследовании, а отсутствие повышения количества белка Pgp обусловлено развитием окислительного стресса при экспериментальном паркинсоническом синдроме и повреждением его молекулы.

Также при моделировании паркинсонизма отмечалось повышение проникновения фексофенадина-субстрата Pgp в головной мозг животных после его однократного внутривенного введения в дозе 10 мг/кг. Данные изменения проницаемости ГЭБ также связаны с развитием окислительного стресса и повреждением белков межклеточных контактов: ZO-1, окклюдина и E-кадгерина.

На завершающем этапе исследования было показано, что индукция Pgp в ГЭБ головного мозга крыс, вызванная курсовым введением классического индуктора транспортера – рифампицина внутривенно в дозе 20 мг/кг массы два раза в день, снижает проникновение ротенона в головной мозг животных, что уменьшает выраженность развития паркинсонизма, вызванного введением ротенона в течение 7 и 28 дней.

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-Р 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-Р 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-Р – 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-Р 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 Pgp соответственно) по сравнению с изолированным введением ротенона показывает перспективность индукции функциональной активности транспортера для профилактики развития паркинсонизма при контакте с нейротоксинами.

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

1. Целесообразна оценка принадлежности других нейротоксических веществ к субстратам гликопротеина-Р и изучение их проникновения в головной мозг при индукции транспортера.

2. Тестирование нейропротекторных лекарственных веществ на принадлежность к индукторам гликопротеина-Р с целью оценки возможности их использования для профилактики развития токсического паркинсонизма.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- БП – Болезнь Паркинсона;
- ВЭЖХ-УФ – высокоэффективная жидкостная хроматография с ультрафиолетовым детектированием;
- ГПТБ – гидроперекись-трет-бутила;
- ГЭБ – гематоэнцефалический барьер;
- ДДТ – дихлордифенилтрихлорэтан;
- ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота;
- ДТНБ – дисульфид-5,5-дитиобис-2-нитробензоата;
- ЖКТ – желудочно-кишечный тракт;
- ИФА – иммуноферментный анализ;
- КБП – кора больших полушарий;
- ксЧС – компактная часть черной субстанции;
- мРНК – матричная рибонуклеиновая кислота;
- МРТР – 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридин;
- мтДНК – митохондриальная дезоксирибонуклеиновая кислота;
- ПОЛ – перекисное окисление липидов;
- ПЦР – полимеразная цепная реакция;
- ПЭТ – позитронно-эмиссионная томография;
- РНК – рибонуклеиновая кислота;
- СМА – средняя мозговая артерия;
- ТБК – тиобарбитуровая кислота;
- ЦНС – центральная нервная система;
- ЦСЖ – цереброспинальная жидкость;
- 6-ОНДА – 6-гидроксидофамин;
- AhR – рецептор ариловых углеводородов (англ.: aryl hydrocarbon receptor);
- AUC – площадь под фармакокинетической кривой (англ.: Area Under the Curve);
- BCRP – белок устойчивости рака молочной железы (англ.: breast cancer resistance

protein);

CAR – конститутивный андростановый рецептор (англ.: constitutive androstane receptor);

CYP450 – Cytochrome P450;

DBP – карман связывания лекарственного средства (англ.: drug-binding pocket);

GAPDH – глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа;

GSH – глутатион восстановленный;

GSSG – глутатион окисленный;

HepG2 – гепатоцеллюлярной карциномы печени;

ICHs- короткие спирали внутриклеточного взаимодействия (англ.: short intracellular coupling helices);

JAM – соединительные молекулы адгезии (англ.: junctional adhesion molecules);

LXR – печеночные X рецепторы (англ.: Liver X receptors);

MAGUKs – мембраноассоциированный гуанилаткиназоподобный белок (англ.: membrane-associated guanylate kinases);

MDR1 – множественная лекарственная устойчивость (англ.: Multi-Drug Resistance);

nAChR – никотиновые ацетилхолиновые рецепторы (англ.: nicotinic acetylcholine receptor);

NBD – нуклеотидсвязывающий домен (англ.: nucleotide-binding domain);

NF-κB- ядерный фактор каппа В (англ.: nuclear factor kappa B);

Nrf2 – ядерный фактор эритроидного происхождения-2 (англ.: nuclear factor erythroid 2-related factor 2);

OATP – полипептиды, транспортирующие органические анионы (англ.: organic anion transporting polypeptides);

PARK1 – ген, кодирующий альфа-синуклеин;

PARK2 – ген, кодирующий убиквитин-лигазы;

PARK7 – ген, кодирующий антиоксидант DJ-1;

Pgp – гликопротеин-P (англ.: P-glycoprotein);

PINK1 – ген, кодирующий киназу;

PPAR α – рецептор активируемый пролифератом пероксисом (англ.: Peroxisome proliferator-activated receptor alpha);

PrP – прионный белок (англ.: Prion protein);

PrP^{Sc} – аномальная изоформа прионного белка (англ.: Prion protein scrapie);

PXR – Прегнан X рецептор (англ.: pregnane X receptor);

SD – стандартное отклонение;

Sp3 – специфический белок 3 (англ.: specificity protein 3);

TJ – плотные контакты (англ.: tight junctions);

TMD – трансмембранный домен (англ.: transmembrane domain);

TMHs – трансмембранные альфа спирали (англ.: transmembrane α -helices);

TNF α – фактор некроза опухолей α (англ.: tumor necrosis factor α);

UCHL1 – убиквитин-карбокси-концевая гидролаза L1 (англю: Ubiquitin carboxy-terminal hydrolase L1);

VDR – рецептор витамина Д (англ.: vitamin D receptor);

ZO – зонулин (англ.: Zonula-occludens).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Анализ принадлежности препарата Ноопепт к субстратам и модуляторам функциональной активности ABCB1-белка в эксперименте *in vivo* / И. В. Черных, А. В. Щулькин, Е. Н. Якушева [и др.] – Текст: непосредственный // Российский медико-биологический вестник имени академика И.П. Павлова. – 2017. – Т. 25, № 1. – С. 30-36.
2. Ахметжанов, В. К. Болезнь Паркинсона. Критерии диагностики. дифференциальная диагностика / В. К. Ахметжанов, Ч. С. Шашкин, Т. Т. Керимбаев – Текст: непосредственный // Нейрохирургия и неврология Казахстана. – 2016. – Т 45, № 4. – С. 18-25.
3. Ахметжанов, В. К. Болезнь Паркинсона. Патофизиология экстрапирамидной системы. Современные представления о причинах возникновения и патогенезе паркинсонизма / В. К. Ахметжанов, Ч. С. Шашкин, Б. Д. Джамантаева. – Текст: непосредственный // Журнал «Нейрохирургия и неврология Казахстана». – 2016. – № 2 (43). – С. 44-51.
4. Болезнь Паркинсона: (Этиология, патогенез, клиника, диагностика, лечение, профилактика) / Г. Н. Крыжановский, И. Н. Карабань, С. В. Магаеева [и др.]. – Москва: Медицина, 2002. – 336 с. – Текст: непосредственный.
5. Влияние афобазола на функциональную активность ABCB1-белка у добровольцев с низкой тревожностью / Е. Н. Якушева, И. В. Черных, А. В. Щулькин [и др.] – Текст: непосредственный // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2019. – Т. 82, № 3. – С. 17-21.
6. Влияние рифампицина на индукцию активности MDR1/P-gp в провоспалительных макрофагах человека / Е. М. Павлова, М. В. Ерохина, Е. Ю. Рыбалкина [и др.]. – Текст: непосредственный // Антибиотики и химиотерапия. – 2022. – Т. 67, № 3-4. – С. 16-22.
7. Влияние этилметилгидроксипиридина сукцината на функциональную активность транспортера гликопротеина-P в гематоэнцефалическом барьере крыс

в норме и при гипоксической гипоксии / П. Ю. Мыльников, А. В. Щулькин, И. В. Черных, Е. Н. Якушева – Текст: непосредственный // Фармакокинетика и фармакодинамика. – 2021. – № 2. – С. 25-30.

8. Воронков, Д. Н. Изменения в нигростриатных образованиях мозга при моделировании паркинсонизма, индуцированного ротеноном (количественное иммуноморфологическое исследование) / Д. Н. Воронков, Ю. В. Дикалова, Р. М. Худоевков. – Текст: непосредственный // Анналы неврологии. – 2013. – Т. 7, № 2. – С. 34-38.

9. Воспроизведение реакций пассивного избегания после введения нейротензина в прилежащее ядро мозга у крыс на фоне действия резерпина / Н. П. Шугалев, А. В. Ставровская, Н. Г. Ямщикова [и др.]. – Текст: непосредственный // Журнал высшей нервной деятельности им. И.П. Павлова. – 2012. – Т. 62, № 3. – С. 357-363.

10. Гематоэнцефалический барьер / Д. В. Чоботько, А. Р. Лебедев, П. В. Жибанов, Д. Р. Зотова. – Текст: непосредственный // Международный студенческий научный вестник. – 2021. – № 2. – С. 29.

11. Гликопротеин-Р: строение, регуляция, значение в фармакотерапии заболеваний / А. В. Байрашевская, А. В. Муленкова, Т. И. Шлапакова, П. П. Загоскин. – Текст: непосредственный // Медицинский альманах. – 2020. – Т. 64, № 3. – С. 36-42.

12. Гликопротеин-Р: структура, физиологическая роль и молекулярные механизмы модуляции функциональной активности / Е. Н. Якушева, И. В. Черных, А. В. Щулькин, Н. М. Попова – Текст: непосредственный // Успехи физиологических наук. – 2014. – Т. 45, № 4. – С. 89-98.

13. Григорьян, Г. А. Экспериментальные модели болезни Паркинсона на животных / Г. А. Григорьян, А. С. Базян – Текст: непосредственный // Успехи физиологических наук. – 2007. – Т. 38, № 4. – С. 80-88.

14. Екимова, И. В. Возрастные особенности резистентности нигростриатной системы при протеасомной дисфункции у крыс / И. В. Екимова, Д. В. Плаксина, Р.

С. Калинин –Текст: непосредственный // Журнал эволюционной биохимии и физиологии. – 2018. – Т. 54, № 6. – С. 431-434.

15. Иллариошкин, С. Н. Руководство по диагностике и лечению болезни Паркинсона / С. Н. Иллариошкин, О. С. Левин. – Москва: ООО "ИПК Парето-Принт", 2017. – 336 с. – Текст: непосредственный.

16. Иллариошкин, С. Н. Этиология болезни Паркинсона: новые представления и новые вызовы / С. Н. Иллариошкин – Текст: непосредственный // Болезнь Паркинсона и расстройства движений : Руководство для врачей по материалам III Национального конгресса по болезни Паркинсона и расстройствам движений (с международным участием), Москва, 21–24 сентября 2014 года / Под редакцией С.Н. Иллариошкина, О.С. Левина. – Москва: ЗАО «РКИ Соверо пресс», 2014. – С. 5-13.

17. Каркищенко, И. И. Фармакокинетика / И. И. Каркищенко, В. В. Хоронько, В. Н. Каркищенко. – Ростов-на-Дону: Феникс, 2001. – 284 с. – Текст: непосредственный.

18. Ланкин, В. З. Ингибирование перекисления липидов и детоксикация липоперекисей защитными ферментативными системами (супероксиддисмутаза, глутатион-пероксидаза, глутатион-редуктаза) при экспериментальном злокачественном росте / В. З. Ланкин, С. М. Гуревич. – Текст: непосредственный // ДАН СССР. – 1976. – Т. 226, № 3. – С. 705-708.

19. Левин, О. С. Болезнь Паркинсона / О. С. Левин, Н. В. Федорова. – Москва: МЕДПресс-информ, 2012. – 352 с. – ISBN 978-5-98322-863-4. – Текст: непосредственный.

20. Малиновская, Н.А. Роль НАД⁺-зависимых механизмов в регуляции нейрон-глиальных взаимодействий при ишемии головного мозга и нейродегенерации: специальность 14.03.03 «Патологическая физиология»: автореферат диссертации на соискание ученой степени доктора медицинских наук / Малиновская Наталия Александровна; Красноярский гос. медицинский ун-т им. проф. В. Ф. Войно Ясенецкого» – Кемерово, 2014. – 47 с.: ил. –Место защиты:

Кем ГМА. –Текст: непосредственный.

21. Метод анализа функциональной активности гликопротеина-Р в гематоэнцефалическом барьере / И. В. Черных, А. В. Шулькин, П. Ю. Мыльников [и др.] – Текст: непосредственный // Нейрохимия. – 2019. – Т. 36, № 1. – С. 84-88.

22. Механизм влияния тестостерона на белок-транспортер Р-гликопротеин / А. А. Слепнев, А. В. Шулькин, Ю. В. Абаленихина [и др.] –Текст: непосредственный // Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова. – 2022. – Т. 108, № 9. – С. 1188-1199.

23. Миронов, А. Н. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая / А. Н. Миронов. – Москва: Гриф и К, 2012. – 944 с. – ISBN 978-5-8125-1466-3 – Текст: непосредственный.

24. Моргун, А. В. Основные функции гематоэнцефалического барьера / А. В. Моргун – Текст: непосредственный // Сибирский медицинский журнал (Иркутск). – 2012. – Т. 109, № 2. – С. 5-8.

25. Мыльников, П. Ю. Влияние этилметилгидроксипиридина сукцината на функционирование гликопротеина-Р в гематоэнцефалическом барьере в норме и при острой гипоксической гипобарической гипоксии: специальность 3.3.6. «Фармакология, клиническая фармакология»: автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата биологических наук / Мыльников Павел Юрьевич; Рязанский гос. медицинский ун-т им. акад. И.П. Павлова. Рязань, 2021. –24 с.: ил. – Место защиты: ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фармакологии имени В.В. Закусова» – Текст: непосредственный.

26. Новое направление профилактики и терапии болезни Паркинсона / И. В. Черных, А. В. Шулькин, Н. М. Попова [и др.] – Текст: непосредственный // Неврологический журнал. – 2018. – Т. 23, № 6. – С. 282-289.

27. Оконенко, Т. И. Гематоэнцефалический барьер – основные структуры и функции / Т. И. Оконенко, А. П. Новикова, Е. Е. Румянцев. – Текст: непосредственный // Современные вопросы биомедицины. – 2024. – Т. 8, № 1. – С. 142-150.

28. Паракватная модель паркинсонизма и выявление фосфорилированного α -синуклеина в энтеральной нервной системе у крыс / А. В. Ставровская, Д. Н. Воронков, К. А. Кутукова [и др.]. – Текст: непосредственный // Вестник Российского государственного медицинского университета. – 2019. – № 5. – С. 63-69.

29. Раздорская, В. В. Статистика амбулаторных случаев болезни Паркинсона / В. В. Раздорская, Г. К. Юдина, О. Н. Воскресенская. – Текст: непосредственный // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. – 2012. – Т. 112, № 9. – С. 72-76.

30. Ткач, В. В. Нейрохирургическое лечение Болезни Паркинсона / В. В. Ткач, О. Б. Францишко, А. В. Ткач – Текст: непосредственный // Modern Science. – 2021. – № 4-4. – С. 206-211.

31. Функциональная активность гликопротеина-Р в гематоэнцефалическом барьере на фоне ишемии–реперфузии головного мозга / И. В. Черных, А. В. Щулькин, Е. Н. Якушева [и др.] – Текст: непосредственный // Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова. – 2019. – Т. 105, № 5. – С. 657-664.

32. Функциональная активность гликопротеина-Р при экспериментальных манипуляциях / Е. Н. Якушева, А. В. Щулькин, И. В. Черных, Д. С. Титов. – Текст: непосредственный // Российский медико-биологический вестник им. академика И. П Павлова. – 2014. – Т. 22, № 2. – С. 76-79.

33. Черных, И. В. Фармакологическая регуляция гликопротеина-р в терапии нарушений мозгового кровообращения: специальность 3.3.6. «Фармакология, клиническая фармакология»: диссертация на соискание ученой степени доктора биологических наук / Черных Иван Владимирович; Рязанский гос. медицинский университет им. акад. И.П. Павлова. – Рязань, 2021. – 262 с. – Текст: непосредственный.

34. Экзогенные факторы риска возникновения болезни Паркинсона / О. И. Куликова, Т. Н. Федорова, В. И. Кузнецов, В. С. Орлова. – Текст: непосредственный // Экология человека. – 2019. – № 1. – С. 34-49.

35. Эпидемиология болезни Паркинсона в мире и в России / А. А. Таппахов, Т. Е. Попова, Т. Я. Николаева [и др.] – Текст: непосредственный // Забайкальский медицинский вестник. – 2016. – № 4. – С. 151-159.
36. Этиология и патогенез болезни Паркинсона – взгляд на проблему сегодня / А. М. Бубликова, Е. А. Статинова, Ю. И. Коценко, В. С. Сохина – Текст: непосредственный // Университетская клиника. – 2016. – Т. 12, № 2. – С. 67-69.
37. Якушева, Е. Н. Структура и функционирование белка множественной лекарственной устойчивости / Е. Н. Якушева, Д. С. Титов – Текст: непосредственный // Биохимия. – 2018. – Т. 83, № 8. – С. 1148-1172.
38. 6-Hydroxydopamine-induced alterations in blood–brain barrier permeability / P. M. Carvey, C. H. Zhao, B. Hendey [et al.]. – Text: visual // European Journal of Neuroscience. – 2005. – Vol. 22, № 5. – P. 1158-1168.
39. A practical assessment protocol for clinically relevant P-glycoprotein-mediated drug-drug interactions / L. Bogaard, K. Tsoi, B. d. van [et al.]. – Text: visual // Frontiers in Pharmacology. – 2024. – Vol. 15.
40. A short guide to the tight junction / S. Citi, M. Fromm, M. Furuse [et al.]. – Text: visual // Journal of Cell Science. – 2024. – Vol. 137, № 9. – P. 1-12.
41. Abdullahi, W. Blood-brain barrier dysfunction in ischemic stroke: targeting tight junctions and transporters for vascular protection / W. Abdullahi, D. Tripathi, P. T. Ronaldson. – Text: visual // American Journal of Physiology-Cell Physiology. – 2018. – Vol. 315, № 3. – P. 343-356.
42. Activity of P-glycoprotein, a β -amyloid transporter at the blood brain barrier, is compromised in patients with mild Alzheimer disease / A. K. Deo, S. Borson, J. M. Link [et al.]. – Text: visual // Journal of Nuclear Medicine. – 2014. – Vol. 55, № 7. – P. 1106-1111.
43. Agency for toxic substances and disease registry, United States Department of Health and Human Services – Toxicological profile for toxaphene – 2010. – Text: electronic. – URL: <https://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiledocs/index.html?id=548&tid=99> (date accessed: 17.12.2023)

44. Alam, A. Structure and mechanism of human ABC transporters / A. Alam, K. P. Locher. – Text: visual // Annual review of biophysics. – 2023. – Vol. 52, № 1. – P. 275-300.
45. AlaSOPro mutation in the gene encoding α -synuclein in Parkinson's disease / R. Krüger, W. Kuhn, T. Müller [et al.]. – Text: visual // Nature Genetics. – 1998. – Vol. 18, № 2. – P. 106-108.
46. Amyloid- β contributes to blood-brain barrier leakage in transgenic human amyloid precursor protein mice and in humans with cerebral amyloid angiopathy / M. S. Hartz, B. Bauer, L. B. Soldner [et al.]. – Text: visual // Stroke. – 2012. – Vol. 43, № 2. – P. 514-523.
47. An overview of NRF2 signaling pathway and its role in inflammation / S. Saha, B. Buttari, E. Panieri [et al.]. – Text: visual // Molecules. – 2020. – Vol. 25, № 22. – P. 5474.
48. Anti-hormonal therapy in breast cancer and its effect on the blood-brain barrier / C. J. Curtaz, L. Kiesel, P. Meybohm [et al.]. – Text: visual // Cancers. – 2022. – Vol. 14, № 20. – P. 5132.
49. Aschner, M. Colloquium C012: manganese in CNS neurotoxicity and idiopathic Parkinson's disease / M. Aschner, R. Nass. – Text: visual // Journal of Neurochemistry. – 2006. – № 96. – P. 89-90.
50. Association between MDR1 gene polymorphisms and Parkinson's disease in Asian and Caucasian populations: a meta-analysis / S. Ahmed, R. S. Husain, S. Kumar, V. Ramakrishnan. – Text: visual // Journal of the Neurological Sciences. – 2016. – Vol. 368. – P. 255-262.
51. Association of cumulative lead exposure with Parkinson's disease / M. G. Weisskopf, J. Weuve, H. Nie [et al.]. – Text: visual // Environmental health perspectives. – 2010. – Vol. 118, № 11. – P. 1609-1613.
52. Baldwin, W. S. Phase 0 of the xenobiotic response: nuclear receptors and other transcription factors as a first step in protection from xenobiotics / W. S. Baldwin. – Text: visual // Nuclear Receptor Research. – 2019. – Vol. 6. – P.101447.

53. Bartels, A. L. Blood-brain barrier P-glycoprotein function in neurodegenerative disease / A. L. Bartels. – Text: visual // *Current Pharmaceutical Design*. – 2011. – Vol. 17, № 26. – P. 2771-2777.

54. Begley, D. ABC transporters and the blood-brain barrier / D. Begley. – Text: visual // *Current Pharmaceutical Design*. – 2004. – Vol. 10, № 12. – P. 1295-1312.

55. Beta-asarone and levodopa co-administration increase striatal dopamine level in 6-hydroxydopamine induced rats by modulating P-glycoprotein and tight junction proteins at the blood-brain barrier and promoting levodopa into the brain / L. Huang, M. Deng, Y. He [et al.]. – Text: visual // *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*. – 2016. – Vol. 43, № 6. – P. 634-643.

56. Biochemical analysis of cybrids expressing mitochondrial DNA from contursi kindred Parkinson's subjects / R. H. Swerdlow, J. K. Parks, D. S. Cassarino [et al.]. – Text: visual // *Experimental Neurology*. – 2001. – Vol. 169, № 2. – P. 479-485.

57. Blauwendraat, C. The genetic architecture of Parkinson's disease / C. Blauwendraat, M. A. Nalls, A. B. Singleton. – Text: visual // *The Lancet Neurology*. – 2020. – Vol. 19, № 2. – P. 170-178.

58. Blood-brain barrier alterations and edema formation in different brain mass lesions / P. Solar, M. Hendrych, M. Barak [et al.]. – Text: visual // *Frontiers in Cellular Neuroscience*. – 2022. – Vol. 16. – P. 1-20.

59. Blood–brain barrier and neurodegenerative diseases –modeling with iPSC-derived brain cells / Y. Wu, T. Sonninen, S. Peltonen [et al.]. – Text: visual // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2021. – Vol. 22, № 14. – P. 7710.

60. Blood–brain barrier breakdown in dementia with Lewy bodies / J. Gan, Z. Xu, Z. Chen [et al.]. – Text: visual // *Fluids and Barriers of the CNS*. – 2024. – Vol. 21, № 1.

61. Blood–brain barrier dysfunction in parkinsonian midbrain in vivo / R. Kortekaas, K. L. Leenders, J. C. van Oostrom [et al.]. – Text: visual // *Annals of Neurology*. – 2005. – Vol. 57, № 2. – P. 176-179.

62. Blood–brain barrier pathology in Alzheimer's and Parkinson's disease: implications for drug therapy / B. S. Desai, A. J. Monahan, P. M. Carvey, B. Hendey. – Text: visual // *Cell Transplantation*. – 2007. – Vol. 16, № 3. – P. 285-299.
63. Bodor, M. Characterization of the human MDR1 gene / M. Bodor, E. J. Kelley, R. J. Ho. – Text: visual // *The AAPS Journal*. – 2005. – Vol. 7, № 1. – P. 1-5.
64. Bové, J. Neurotoxin-based models of Parkinson's disease / J. Bové, C. Perier. – Text: visual // *Neuroscience*. – 2012. – Vol. 211. – P. 51-76.
65. Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding / M. M. Bradford. – Text: visual // *Analytical Biochemistry*. – 1976. – Vol. 72, № 1-2. – P. 248-254.
66. Brain endothelial P-Glycoprotein level is reduced in Parkinson's disease via a vitamin D receptor-dependent pathway / H. Kim, J. Shin, Y. Lee [et al.]. – Text: visual // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2020. – Vol. 21, № 22. – P. 1-15.
67. Bukowski, K. Mechanisms of multidrug resistance in cancer chemotherapy / K. Bukowski, M. Kciuk, R. Kontek. – Text: visual // *Int J Mol Sci*. – 2020. – Vol. 21, № 9. – P. 3233
68. Cacabelos, R. Parkinson's disease: from pathogenesis to pharmacogenomics / R. Cacabelos. – Text: visual // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2017. – Vol. 18, № 3. – P. 551.
69. Cerebrovascular P-glycoprotein expression is decreased in Creutzfeldt–Jakob disease / S. Vogelgesang, M. Glatzel, L. C. Walker [et al.]. – Text: visual // *Acta Neuropathologica*. – 2006. – Vol. 111, № 5. – P. 436-443.
70. Chai, A. B. Regulation of P-Glycoprotein in the brain / A. B. Chai, R. Callaghan, I. C. Gelissen. – Text: visual // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2022. – Vol. 23, № 23. – P. 14667.
71. Chronic parkinsonism in humans due to a product of meperidine-analog synthesis / W. J. Langston, P. Ballard, J. W. Tetrud, I. Irwin. – Text: visual // *Science*. – 1983. – Vol. 219, № 4587. – P. 979-980.

72. Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson's disease / R. Betarbet, T. B. Sherer, G. MacKenzie [et al.]. – Text: visual // *Nature Neuroscience*. – 2000. – Vol. 3, № 12. – P. 1301-1306.

73. Clinical relevance of hepatic and renal P-gp/BCRP inhibition of drugs: an international transporter consortium perspective / K. S. Taskar, X. Yang, S. Neuhoff [et al.]. – Text: visual // *Clinical Pharmacology & Therapeutics*. – 2022. – Vol. 112, № 3. – P. 573-592.

74. Colpaert, F. Pharmacological characteristics of tremor, rigidity and hypokinesia induced by reserpine in rat / F. Colpaert. – Text: visual // *Neuropharmacology*. – 1987. – Vol. 26, № 9. – P. 1431-1440.

75. CRM197-induced blood–brain barrier permeability increase is mediated by upregulation of caveolin-1 protein / P. Wang, Y. Liu, X. Shang, Y. Xue. – Text: visual // *Journal of Molecular Neuroscience*. – 2010. – Vol. 43, № 3. – P. 485-492.

76. Cytoplasmic domains of the transporter associated with antigen processing and P-glycoprotein interact with subunits of the proteasome / G. S. Begley, A. R. Horvath, J. C. Taylor, C. F. Higgins. – Text: visual // *Molecular Immunology*. – 2005. – Vol. 42, № 1. – P. 137-141.

77. De lange, E. Potential role of ABC transporters as a detoxification system at the blood- CSF barrier / E. De lange. – Text: visual // *Advanced Drug Delivery Reviews*. – 2004. – Vol. 56, № 12. – P. 1793-1809.

78. Decreased blood–brain barrier P-glycoprotein function in the progression of Parkinson's disease, PSP and MSA / A. L. Bartels, A. T. Willemsen, R. Kortekaas [et al.]. – Text: visual // *Journal of Neural Transmission*. – 2008. – Vol. 115, № 7. – P. 1001-1009.

79. Differential effects of the organochlorine pesticide DDT and its metabolite p,p'-DDE on p-glycoprotein activity and expression / A. Shabbir, S. DiStasio, J. Zhao [et al.]. – Text: visual // *Toxicology and Applied Pharmacology*. – 2005. – Vol. 203, № 2. – P. 91-98.

80. Differential transport properties of two mdr gene products are distinguished

by progesterone / C. P. Yang, D. Cohen, L. M. Greenberger [et al.]. – Text: visual // *Journal of Biological Chemistry*. – 1990. – Vol. 265, № 18. – P. 10282-10288.

81. Disruption of the mouse *mdr1a* P-glycoprotein gene leads to a deficiency in the blood-brain barrier and to increased sensitivity to drugs / A. H. Schinkel, J. M. Smit, O. v. Tellingen [et al.]. – Text: visual // *Cell*. – 1994. – Vol. 77, № 4. – P. 491-502.

82. Dissecting the forces that dominate dimerization of the nucleotide binding domains of ABCB1 / D. Szöllősi, G. Szakács, P. Chiba, T. Stockner. – Text: visual // *Biophysical Journal*. – 2018. – Vol. 114, № 2. – P. 331-342.

83. Dopaminergic loss and inclusion body formation in alpha-synuclein mice: implications for neurodegenerative disorders / E. Masliah, E. Rockenstein, I. Veinbergs [et al.]. – Text: visual // *Science*. – 2000. – Vol. 287, № 5456. – P. 1265–1269.

84. Dotiwala, A.K. Anatomy, head and neck: blood brain barrier / A.K. Dotiwala, C. McCausland, N.S. Samra. – StatPearls Publishing, 2024. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK519556/> (accessed: 15.02.2023). – Text: electronic.

85. Double-knockout mice for α - and β -synucleins: Effect on synaptic functions / S. Chandra, F. Fornai, H. Kwon [et al.]. – Text: visual // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2004. M Vol. 101, № 41. – P. 14966-14971.

86. Down regulation of DJ-1 enhances cell death by oxidative stress, ER stress, and proteasome inhibition / T. Yokota, K. Sugawara, K. Ito [et al.]. – Text: visual // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. – 2003. – Vol. 312, № 4. – P. 1342-1348.

87. Dutheil, F. Interaction between ABCB1 and professional exposure to organochlorine insecticides in Parkinson disease / F. Dutheil, P. Beaune, C. Tzourio. – Text: visual // *Archives of Neurology*. – 2010. – Vol. 67, № 6. – P. 739-745.

88. Dysfunction of ABC transporters at the blood-brain barrier: Role in neurological disorders / E. Gil-Martins, D. J. Barbosa, V. Silva [et al.]. – Text: visual // *Pharmacology & Therapeutics*. – 2020. – Vol. 213. – P. 107554.

89. Effect of different oral doses of isoniazid-rifampicin in rats / S. V. Rana, R.

Pal, K. Vaiphie, K. Singh. – Text: visual // *Molecular and Cellular Biochemistry*. – 2006. – Vol. 289, № 1-2. – P. 39-47.

90. Effect of P-glycoprotein (P-gp) inducers on exposure of P-gp substrates: review of clinical drug–drug interaction studies / M. Elmeliegy, M. Vourvahis, C. Guo, D. D. Wang. – Text: visual // *Clinical Pharmacokinetics*. – 2020. – Vol. 59, № 6. – P. 699-714.

91. Effect of P-glycoprotein inhibition at the blood–brain barrier on brain distribution of (R)-[11C] verapamil in elderly vs. young subjects / M. Bauer, B. Wulkersdorfer, R. Karch [et al.]. – Text: visual // *British Journal of Clinical Pharmacology*. – 2017. – Vol. 83, № 9. – P. 1991-1999.

92. ElAli, A. Liver X receptor activation enhances blood–brain barrier integrity in the ischemic brain and increases the abundance of ATP-binding cassette transporters ABCB1 and ABCC1 on brain capillary cells / A. ElAli, D. M. Hermann. – Text: visual // *Brain Pathology*. – 2011. – Vol. 22, № 2. – P. 175-187.

93. Ellman, G. L. Tissue sulfhydryl groups / G. L. Ellman. – Text: visual // *Archives of Biochemistry and Biophysics*. – 1959. – Vol. 82, № 1. – P. 70-77.

94. Environmental risk factors and Parkinson's disease / H. H. Liou, M. C. Tsai, C. J. Chen [et al.]. – Text: visual // *Neurology*. – 1997. – Vol. 48, № 6. – P. 1583-1588.

95. Environmental risk factors and Parkinson's disease: selective degeneration of nigral dopaminergic neurons caused by the herbicide paraquat / A. L. McCormack, M. Thiruchelvam, A. B. Manning-Bog [et al.]. – Text: visual // *Neurobiology of Disease*. – 2002. – Vol. 10, № 2. – P. 119-127.

96. Environmental toxins trigger PD-like progression via increased alpha-synuclein release from enteric neurons in mice / F. Pan-Montojo, M. Schwarz, C. Winkler [et al.]. – Text: visual // *Scientific Reports*. – 2012. – Vol. 2, № 1 – P. 1-12.

97. Estimating the prevalence of Parkinson's disease (PD) and proportions of patients with associated dementia and depression among the older adults based on secondary claims data / O. Riedel, D. Bitters, U. Amann [et al.]. – Text: visual // *International Journal of Geriatric Psychiatry*. – 2016. – Vol. 31, № 8. – P. 938-943.

98. Examination of diverse iron-chelating agents for the protection of differentiated PC12 cells against oxidative injury induced by 6-hydroxydopamine and dopamine / P. Hašková, L. Applová, H. Jansová [et al.]. – Text: visual // *Scientific Reports*. – 2022. – Vol. 12, № 1.– P. 9765.

99. Expression of multi-drug resistance 1 mRNA in human and rodent tissues: reduced levels in Parkinson patients / M. Westerlund, A. C. Belin, L. Olson, D. Galter. – Text: visual // *Cell and Tissue Research*. – 2008. – Vol. 334, № 2. – P. 179-185.

100. Foley, P. B. A brief history of brain iron accumulation in Parkinson disease and related disorders / P. B. Foley, D. J. Hare, K. L. Double. – Text: visual // *Journal of Neural Transmission*. – 2022. – Vol. 129, № 5-6. – P. 505-520.

101. Forced exercise activates the NrF2 pathway in the striatum and ameliorates motor and behavioral manifestations of Parkinson's disease in rotenone-treated rats / D. M. Monir, M. E. Mahmoud, O. G. Ahmed [et al.]. – Text: visual // *Behavioral and Brain Functions*. – 2020. – Vol. 16, № 1. – P. 9.

102. Global trends in the incidence, prevalence, and years lived with disability of Parkinson's disease in 204 countries/territories from 1990 to 2019 / Z. Ou, J. Pan, S. Tang [et al.]. – Text: visual // *Frontiers in Public Health*. – 2021. – Vol. 9. – P. 1-16.

103. Gorbunova, E. E. Binding of the andes virus nucleocapsid protein to RhoGDI induces the release and activation of the permeability factor RhoA / E. E. Gorbunova, E. R. Mackow. – Text: visual // *Journal of Virology*. – 2021. – Vol. 95, № 17. – P. 1-16.

104. Gray, M. T. Striatal blood–brain barrier permeability in Parkinson'S disease / M. T. Gray, J. M. Woulfe. – Text: visual // *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*. – 2015. – Vol. 35, № 5. – P. 747-750.

105. Greene, C. Claudin-5: gatekeeper of neurological function / C. Greene, N. Hanley, M. Campbell. – Text: visual // *Fluids and Barriers of the CNS*. – 2019. – Vol. 16, № 1. – P. – 3.

106. Gromnicova, R. Transcriptional control of the multi-drug transporter ABCB1 by transcription factor Sp3 in different human tissues / R. Gromnicova, I. Romero, D. Male. – Text: visual // *PLoS ONE*. – 2012. – Vol. 7, № 10. – P. 48189.

107. He, F. NRF2, a transcription factor for stress response and beyond / F. He, X. Ru, T. Wen. – Text: visual // International Journal of Molecular Sciences. – 2020. – Vol. 21, № 13. – P. 4777.

108. High levels of mitochondrial DNA deletions in substantia nigra neurons in aging and Parkinson disease / A. Bender, K. J. Krishnan, C. M. Morris [et al.]. – Text: visual // Nature Genetics. – 2006. – Vol. 38, № 5. – P. 515-517.

109. High-throughput assay of rotenone in olive oil using atmospheric pressure chemical ionization tandem mass spectrometry / L. D. di, G. Grassi, F. Mazzotti [et al.]. – Text: visual // Journal of Mass Spectrometry. – 2004. – Vol. 39, № 12. – P. 1437-1440.

110. Ho, M. S. Microglia in Parkinson's disease / M. S. Ho. – Text: visual // Advances in experimental Medicine and Biology. – 2019. – Vol. 1175 – P. 335-353.

111. Homology modeling of the human P-glycoprotein (ABCB1) and insights into ligand binding through molecular docking studies / L. L. Mora, N. Minovski, A. A. Caballero [et al.]. – Text: visual // International Journal of Molecular Sciences. – 2020. – Vol. 21, № 11. – P. 4058.

112. Hoöglinger, G. U. The Rotenone model of Parkinsonism — the five years inspection / G. U. Hoöglinger, W. H. Oertel, E. C. Hirsch. – Text: visual // Journal of Neural Transmission. Supplementum. – 2006. – № 70. – P. 269-272.

113. HPLC methods of fexofenadine quantitative analysis in rabbits' liver / P. Yu. Mylnikov, I. V. Chernykh, A. V. Shchulkin [et al.] // Pharmacy & Pharmacology. – 2020. – Vol. 8, № 1. – P. 40-47.

114. Hypersensitivity of DJ-1-deficient mice to 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) and oxidative stress / R. H. Kim, P. D. Smith, H. Aleyasin [et al.]. – Text: visual // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2005. – Vol. 102, № 14. – P. 5215-5220.

115. Hypertonic saline downregulates endothelial cell-derived VEGF expression and reduces blood-brain barrier permeability induced by cerebral ischaemia via the VEGFR2/eNOS pathway / Q. Wang, Y. Deng, L. Huang [et al.]. – Text: visual // International Journal of Molecular Medicine – 2019. – Vol. 44, № 3. – P. 1078-1090.

116. Increased blood-cerebrospinal fluid transfer of albumin in advanced Parkinson's disease / V. Pisani, A. Stefani, M. Pierantozzi [et al.]. – Text: visual // *Journal of Neuroinflammation*. – 2012. – Vol. 9, № 1. – P. 188.

117. Increased reactive oxygen species production in the brain after repeated low-dose pesticide paraquat exposure in rats. a comparison with peripheral tissues / K. Kuter, P. Nowak, K. Gołombiowska, K. Ossowska. – Text: visual // *Neurochemical Research*. – 2010. – Vol. 35, № 8. – P. 1121-1130.

118. Increased sensitivity to MPTP in human α -synuclein A30P transgenic mice / M. Nieto, F. J. Gil-Bea, E. Dalfó [et al.]. – Text: visual // *Neurobiology of Aging*. – 2006. – Vol. 27, № 6. – P. 848-856.

119. Industrial toxicants and Parkinson's disease / M. W. Caudle, T. S. Guillot, C. R. Lazo, G. W. Miller. – Text: visual // *NeuroToxicology*. – 2012. – Vol. 33, № 2. – P. 178-188.

120. Inhibition of Rho-kinase protects cerebral barrier from ischaemia-evoked injury through modulations of endothelial cell oxidative stress and tight junctions / C. L. Gibson, K. Srivastava, N. Sprigg [et al.]. – Text: visual // *Journal of Neurochemistry*. – 2014. – Vol. 129, № 5. – P. 816-826.

121. Integrity of the blood–cerebrospinal fluid barrier in early Parkinson's disease / P. Haussermann, W. Kuhn, H. Przuntek, T. Muller. – Text: visual // *Neuroscience Letters*. – 2001. – Vol. 300, № 3. – P. 182-184.

122. Interactions between antiparkinsonian drugs and ABCB1/P-glycoprotein at the blood–brain barrier in a rat brain endothelial cell model / S. Vautier, A. Milane, C. Fernandez [et al.]. – Text: visual // *Neuroscience Letters*. – 2008. – Vol. 442, № 1. – P. 19-23.

123. Intestinal P-gp and putative hepatic OATP1B induction: international transporter consortium perspective on drug development implications / M. J. Zamek-Gliszczynski, M. Patel, X. Yang [et al.]. – Text: visual // *Clinical Pharmacology & Therapeutics*. – 2020. – Vol. 109, № 1. – P. 55-64.

124. Is Pesticide use related to Parkinson disease? Some clues to heterogeneity in

study results / M. van der Mark, M. Brouwer, H. Kromhout [et al.]. – Text: visual // *Environmental Health Perspectives*. – 2012. – Vol. 120, № 3. – P. 340-347.

125. Is P-Glycoprotein functionally expressed in the limiting membrane of endolysosomes? A Biochemical and ultrastructural study in the rat liver / B. Gericke, I. Wienböcker, G. Brandes, W. Löscher. – Text: visual // *Cells*. – 2022. – Vol. 11, № 9. – P. 1556.

126. Jellinger, K. A. Neuropathology and pathogenesis of extrapyramidal movement disorders: a critical update –I. Hypokinetic-rigid movement disorders / K. A. Jellinger. – Text: visual // *Journal of Neural Transmission*. – 2019. – Vol. 126, № 8. – P. 933-995.

127. Jia, R. Blood-brain barrier pathology in cerebral small vessel disease / R. Jia, G. Solé-Guardia, A. J. Kiliaan. – Text: visual // *Neural Regeneration Research*. – 2023. – Vol. 19, № 6. – P. 1233-1240.

128. Juliano, R. L. A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants / R. L. Juliano, V. Ling. – Text: visual // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*. – 1976. – Vol. 455, № 1. – P. 152-162.

129. Kadry, H. A blood–brain barrier overview on structure, function, impairment, and biomarkers of integrity / H. Kadry, B. Noorani, L. Cucullo. – Text: visual // *Fluids and Barriers of the CNS*. – 2020. – Vol. 17, № 1. – P. 69.

130. Karthika, C. P-Glycoprotein efflux transporters and its resistance its inhibitors and therapeutic aspects. / C. Karthika, R. Sureshkumar. – Text: visual // *Creatinine - A Comprehensive Update*. – 2020. – P. 1-12

131. Kaya, M. Assessment of permeability in barrier type of endothelium in brain using tracers: evans blue, sodium fluorescein, and horseradish peroxidase / M. Kaya, B. Ahishali. – Text: visual // *Methods in Molecular Biology*. – 2011. – Vol. 763. – P. 369-382.

132. LC–MS–MS determination of rotenone, deguelin, and rotenolone in human serum / P. Caboni, G. Sarais, S. Vargiu [et al.]. – Text: visual // *Chromatographia*. – 2008. – Vol. 68, № 9-10. – P. 739-745.

133. Lecoeur, S. Effect of organophosphate pesticide diazinon on expression and activity of intestinal P-glycoprotein / S. Lecoeur, B. Videmann, M. Mazallon. – Text: visual // *Toxicology Letters*. – 2006. – Vol. 161, № 3. – P. 200-209.

134. Lewy bodies, iron, inflammation and neuromelanin: pathological aspects underlying Parkinson's disease / P. Riederer, T. Nagatsu, B. H. Youdim [et al.]. – Text: visual // *Journal of Neural Transmission*. – 2023. – Vol. 130, № 5. – P. 627-646.

135. Loo, T. W. The dileucine motif at the COOH terminus of human multidrug resistance P-glycoprotein is important for folding but not activity / T. W. Loo, C. M. Bartlett, D. M. Clarke. – Text: visual // *Journal of Biological Chemistry*. – 2005. – Vol. 280, № 4. – P. 2522-2528.

136. Manganese ethylene-bis-dithiocarbamate and selective dopaminergic neurodegeneration in rat: a link through mitochondrial dysfunction / J. Zhang, V. A. Fitsanakis, G. Gu [et al.]. – Text: visual // *Journal of Neurochemistry*. – 2003 – Vol. 84, № 2. – P. 336-346.

137. Mass spectrometry analysis of neurotransmitter shifting during neurogenesis and neurodegeneration of PC12 cells / Y. Jao, Y. Chao, J. Chan, Y. H. Hsu. – Text: visual // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2024. – Vol. 25, № 19. – P. 10399.

138. McCormack, A. L. Effects of L-dopa and other amino acids against paraquat-induced nigrostriatal degeneration / A. L. McCormack, D. M. Di. – Text: visual // *Journal of Neurochemistry*. – 2003. – Vol. 85, № 1. – P. 82-86.

139. MDR1 C3435T polymorphism and interaction with environmental factors in risk of Parkinson's disease: a case-control study in Japan / C. Kiyohara, H. Fukuyama, N. Sakae [et al.]. – Text: visual // *Drug Metabolism and Pharmacokinetics*. – 2013. – Vol. 28, № 2. – P. 138-143.

140. Mechanism of cytotoxicity of paraquat / T. Fukushima, K. Yamada, N. Hojo [et al.]. – Text: visual // *Experimental and Toxicologic Pathology*. – 1994. – Vol. 46, № 6. – P. 437-441.

141. Mechanism of multidrug resistance to chemotherapy mediated by

P-glycoprotein (Review) / Y. Tian, Y. Lei, Y. Wang [et al.]. – Text: visual // International Journal of Oncology. – 2023. – Vol. 63, № 5. – P. 119.

142. Mechanism of toxicity of pesticides acting at complex I: relevance to environmental etiologies of Parkinson's disease / T. B. Sherer, J. R. Richardson, C. M. Testa [et al.]. – Text: visual // Journal of Neurochemistry. – 2006. – Vol. 100, № 6. – P. 1469-1479.

143. Mechanistic insights expatiating the redox-active-metal-mediated neuronal degeneration in Parkinson's disease / T. Behl, P. Madaan, A. Sehgal [et al.]. – Text: visual // International Journal of Molecular Sciences. – 2022. – Vol. 23, № 2. – P. 678.

144. Mice lacking alpha-synuclein are resistant to mitochondrial toxins / P. Klivenyi, D. Siwek, G. Gardian [et al.]. – Text: visual // Neurobiology of Disease. – 2006. – Vol. 21, № 3. – P. 541-548.

145. Miller, D. Regulation of ABC transporters at the blood–brain barrier / D. Miller. – Text: visual // Clinical Pharmacology & Therapeutics. – 2015. – Vol. 97, № 4. – P. 395-403.

146. Mitochondrial complex I inhibitor rotenone induces apoptosis through enhancing mitochondrial reactive oxygen species production / N. Li, K. Ragheb, G. Lawler [et al.]. – Text: visual // Journal of Biological Chemistry. – 2003. – Vol. 278, № 10. – P. 8516-8525.

147. Mitochondrial DNA deletions are abundant and cause functional impairment in aged human substantia nigra neurons / Y. Kraytsberg, E. Kudryavtseva, A. C. McKee [et al.]. – Text: visual // Nature Genetics. – 2006. – Vol. 38, № 5. – P. 518-520.

148. Mora, L. L. Recent advances on P-glycoprotein (ABCB1) transporter modelling with in silico methods / L. L. Mora, M. Novič. – Text: visual // International Journal of Molecular Sciences. – 2022. – Vol. 23, № 23. – P. 14804.

149. Mutation in the α -synuclein gene identified in families with Parkinson's disease / M. H. Polymeropoulos, G. I. Di, R. C. Duvoisin [et al.]. – Text: visual // Science. – 1997. – Vol. 276, № 5321. – P. 2045-2047.

150. Neuropathology in mice expressing human alpha-synuclein / H. van der Putten, K.H. Wiederhold, A. Probst [et al.]. – Text: visual // *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*. – 2000. – Vol. 20, № 16. – P. 6021-6029.

151. Neuropharmaceutical properties of naringin against Alzheimer's and Parkinson's diseases / S. Poudineh, M. Poudineh, T. Ghotbi [et al.]. – Text: visual // *Galen Medical Journal*. – 2022. – Vol. 11.

152. New insights into mitochondria in health and diseases / Y. Li, H. Zhang, C. Yu [et al.]. – Text: visual // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2024. – Vol. 25, № 18. – P. 9975.

153. Newly synthesized oxygenated xanthenes as potential P-Glycoprotein activators: in vitro, ex vivo, and in silico studies / E. Martins, V. Silva, A. Lemos [et al.]. – Text: visual // *Molecules*. – 2019. – Vol. 24, № 4. – P. 707.

154. Nrf2/Keap1/ARE signaling: Towards specific regulation / A.V. Ulasov, A.A. Rosenkranz, G.P. Georgiev [et al.]. – Text: visual // *Life Sci*. – 2022. – Vol. 291. – P.120111

155. Occupational factors and risk of Parkinson's disease: A population-based case–control study / J. A. Firestone, J. I. Lundin, K. M. Powers [et al.]. – Text: visual // *American Journal of Industrial Medicine*. – 2009. – Vol. 53, № 3. – P. 217-223.

156. Oxidative stress in Parkinson's disease / S. Nikam, P. Nikam, S. K. Ahaley, A. V. Sontakke. – Text: visual // *Indian Journal of Clinical Biochemistry*. – 2009. – Vol. 24, № 1. – P. 98-101.

157. Pal, C. Targeting mitochondria with small molecules: A promising strategy for combating Parkinson's disease / C. Pal. – Text: visual // *Mitochondrion*. – 2024. – Vol. 79. – P. 101971.

158. Paraquat neurotoxicity is mediated by the dopamine transporter and organic cation transporter-3 / P. M. Rappold, M. Cui, A. S. Chesser [et al.]. – Text: visual // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2011. – Vol. 108, № 51. – P. 20766-20771.

159. Parkin-deficient mice exhibit nigrostriatal deficits but not loss of dopaminergic neurons / M. S. Goldberg, S. M. Fleming, J. J. Palacino [et al.]. – Text: visual // *Journal of Biological Chemistry*. – 2003. – Vol. 278, № 44. – P. 43628-43635

160. Parkinson disease male-to-female ratios increase with age: French nationwide study and meta-analysis / F. Moisan, S. Kab, F. Mohamed [et al.]. – Text: visual // *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*. – 2015. – Vol. 87, № 9. – P. 952-957.

161. Parkinson's disease and the environment / N. Ball, W. Teo, S. Chandra, J. Chapman. – Text: visual // *Frontiers in Neurology*. – 2019. – Vol. 10. – P. 218.

162. Parkinson's disease brain mitochondrial complex I has oxidatively damaged subunits and is functionally impaired and misassembled / P. M. Keeney, J. Xie, R. A. Capaldi, J. P. Bennett. – Text: visual // *The Journal of Neuroscience*. – 2006. – Vol. 26, № 19. – P. 5256-5264.

163. Parkinson's disease: A case-control study of occupational and environmental risk factors / C. Hertzman, M. Wiens, D. Bowering [et al.]. – Text: visual // *American Journal of Industrial Medicine*. – 1990. – Vol. 17, № 3. – P. 349-355.

164. Pathan, N. Tailoring of P-glycoprotein for effective transportation of actives across blood-brain-barrier / N. Pathan, P. Shende. – Text: visual // *Journal of Controlled Release*. – 2021. – Vol. 335. – P. 398-407.

165. Pesticide exposure and risk of Parkinson's disease: A family-based case-control study / D. B. Hancock, E. R. Martin, G. M. Mayhew [et al.]. – Text: visual // *BMC Neurology*. – 2008. – Vol. 8, № 1. – P. 6.

166. Pesticide exposure and self-reported Parkinson's disease in the agricultural health study / F. Kamel, C. Tanner, D. Umbach [et al.]. – Text: visual // *American Journal of Epidemiology*. – 2006. – Vol. 165, № 4. – P. 364-374.

167. Pesticides and risk of Parkinson disease / J. A. Firestone, T. Smith-Weller, G. Franklin [et al.]. – Text: visual // *Archives of Neurology*. – 2005. – Vol. 62, № 1. – P. 91-95.

168. Pesticides exposure as etiological factors of Parkinson's disease and other

neurodegenerative diseases –A mechanistic approach / M. T. Baltazar, R. J. Dinis-Oliveira, M. L. de [et al.]. – Text: visual // *Toxicology Letters*. – 2014. – Vol. 230, № 2. – P. 85-103.

169. P-glycoprotein and drug resistance in systemic autoimmune diseases / A. Picchianti-Diamanti, M. Rosado, M. Scarsella [et al.]. – Text: visual // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2014. – Vol. 15, № 3. – P. 4965-4976.

170. P-glycoprotein induction in Caco-2 cells by newly synthesized thioxanthenes prevents paraquat cytotoxicity / R. Silva, A. Palmeira, H. Carmo [et al.]. – Text: visual // *Archives of Toxicology*. – 2014. – Vol. 89, № 10. – P. 1783-1800.

171. P-glycoprotein induction: an antidotal pathway for paraquat-induced lung toxicity / R. J. Dinis-Oliveira, F. Remião, J. A. Duarte [et al.]. – Text: visual // *Free Radical Biology and Medicine*. – 2006. – Vol. 41, № 8. – P. 1213-1224.

172. P-Glycoprotein transport of neurotoxic pesticides / S. E. Lacher, K. Skagen, J. Veit [et al.]. – Text: visual // *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. – 2015. – Vol. 355, № 1. – P. 99-107.

173. P-glycoprotein: a role in the export of amyloid- β in Alzheimer's disease? / A.B. Chai, G.K.F. Leung, R. Callaghan [et al.]. – Text: visual // *FEBS Journal*. – 2020. – Vol. 287, № 4 – P. 612-625.

174. Physiological expression and function of the MDR1 transporter in cytotoxic T lymphocytes / M.L. Chen, A. Sun, W. Cao [et al.]. – Text: visual // *Journal of Experimental Medicine*. – 2020. – Vol. 217, № 5. – P. e20191388

175. Possible environmental, occupational, and other etiologic factors for Parkinson's disease / A. Seidler, W. Hellenbrand, B. P. Robra [et al.]. – Text: visual // *Neurology*. – 1996. – Vol. 46, № 5. – P. 1275-1284.

176. Potentiated and preferential effects of combined paraquat and maneb on nigrostriatal dopamine systems: environmental risk factors for Parkinson's disease? / M. Thiruchelvam, B. J. Brockel, E. K. Richfield [et al.]. – Text: visual // *Brain Research*. – 2000. – Vol. 873, № 2. – P. 225-234.

177. PPAR- α , a lipid-sensing transcription factor, regulates blood–brain barrier

efflux transporter expression / V. R. More, C. R. Campos, R. A. Evans [et al.]. – Text: visual // *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*. – 2016. – Vol. 37, № 4. – P. 1199-1212.

178. Preventing Parkinson's disease: an environmental agenda / B. M. De, S. M. Goldman, G. W. Miller [et al.]. – Text: visual // *Journal of Parkinson's Disease*. – 2022. – Vol. 12, № 1. – P. 45-68.

179. Pro-inflammatory cytokine regulation of P-glycoprotein in the developing blood-brain barrier / M. Iqbal, H. L. Ho, S. Petropoulos [et al.]. – Text: visual // *PLoS ONE*. – 2012. – № 7. – P. 43022.

180. Projected number of people with Parkinson disease in the most populous nations, 2005 through 2030 / ER. Dorsey, R. Constantinescu, JP. Thompson [et al.]. – Text: visual // *Neurology*. – 2007. – Vol. 68, № 5. – P. 384-386.

181. Promoting the clearance of neurotoxic proteins in neurodegenerative disorders of ageing / B. Boland, C. Louis, M. Spedding [et al.]. – Text: visual // *Nature Reviews Drug Discovery*. – 2018. – Vol. 17, № 9. – P. 660-688.

182. Quercetin improves blood-brain barrier dysfunction in rats with cerebral ischemia reperfusion via Wnt signaling pathway / Z. Jin, J. Ke, P. Guo [et al.]. – Text: visual // *American Journal of Translational Research*. – 2019. – Vol. 11, № 8. – P. 4683-4695.

183. Ramsay, R. R. Relation of superoxide generation and lipid peroxidation to the inhibition of NADH-Q oxidoreductase by rotenone, piericidin A, and MPP⁺ / R. R. Ramsay, T. P. Singer. – Text: visual // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. – 1992. – Vol. 189, № 1. – P. 47-52.

184. Reactive microglia are positive for HLA-DR in the substantia nigra of Parkinson's and Alzheimer's disease brains / P. L. McGeer, S. Itagaki, B. E. Boyes, E. G. McGeer. – Text: visual // *Neurology*. – 1988. – Vol. 38, № 8. – P. 1285-1291.

185. Reactive oxygen species regulated mitochondria-mediated apoptosis in PC12 cells exposed to chlorpyrifos / J. E. Lee, J. H. Park, I. C. Shin, H. C. Koh. – Text: visual

// Toxicology and Applied Pharmacology. – 2012. – Vol. 263, № 2. – P. 148-162.

186. Receptor-assisted nanotherapeutics for overcoming the blood–brain barrier / A. Mhaske, S. Shukla, K. Ahirwar [et al.]. – Text: visual // Molecular Neurobiology. – 2024. – Vol. 61, № 11. – P. 8702-8738.

187. Regulation of ABC efflux transporters at blood-brain barrier in health and neurological disorders / H. Qosa, D. S. Miller, P. Pasinelli, D. Trotti. – Text: visual // Brain Research. – 2015. – Vol. 1628. – P. 298-316.

188. Regulation of P-glycoprotein during oxidative stress / A. V. Shchulkin, Y. V. Abalenikhina, O. V. Kosmachevskaya [et al.]. – Text: visual // Antioxidants. – 2024. – Vol. 13, № 2. – P. 215.

189. Role of two efflux proteins, ABCB1 and ABCG2 in blood-brain barrier transport of bromocriptine in a murine model of MPTP-Induced dopaminergic degeneration / S. Vautier, A. Milane, C. Fernandez [et al.]. – Text: visual // Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences. – 2009. – Vol. 12, № 2. – P. 199-208.

190. Ronaldson, P. T. Targeting transporters: Promoting blood–brain barrier repair in response to oxidative stress injury / P. T. Ronaldson, T. P. Davis. – Text: visual // Brain Research. – 2015. – Vol. 1623. – P. 39-52.

191. Rotenone, paraquat, and Parkinson's disease / C. M. Tanner, A. Blair, D. M. Umbach [et al.]. – Text: visual // Environmental Health Perspectives. – 2011. – Vol. 119, № 6. – P. 866-872.

192. Schapira, A. H. Etiology and pathogenesis of Parkinson's disease / A. H. Schapira, P. Jenner. – Text: visual // Movement Disorders. – 2011. – Vol. 26, № 6. – P. 1049-1055.

193. Schapira, H. V. Mitochondrial pathology in Parkinson's disease / H. V. Schapira. – Text: visual // Mount Sinai Journal of Medicine: A Journal of Translational and Personalized Medicine. – 2011. – Vol. 78, № 6. – P. 872-881.

194. Schlossmacher, M. G. Parkinson's disease: assays for the ubiquitin ligase activity of neural parkin / M. G. Schlossmacher, H. Shimura. – Text: visual // Ubiquitin-

Proteasome Protocols. – 2005. – Vol. 301. – P. 351-370.

195. Sex differences in rotenone sensitivity reflect the male-to-female ratio in human Parkinson's disease incidence / B. M. De, M. Fazzari, E. M. Rocha [et al.]. – Text: visual // Toxicological Sciences. – 2019. – Vol. 170, № 1. – P. 133-143.

196. Shadrina, M. I. Molecular mechanisms of pathogenesis of parkinson's disease / M. I. Shadrina, P. A. Slominsky, S. A. Limborska. – Text: visual // International Review of Cell and Molecular Biology. – 2010. – Vol. 281. – P. 229-266.

197. Sharom, F. J. The P-glycoprotein multidrug transporter / F. J. Sharom. – Text: visual // Essays in Biochemistry. – 2011. – Vol. 50. – P. 161-178.

198. Shrimanker I, Parkinsonism / Shrimanker I, Tadi P, Sánchez-Manso JC. – Text: electronic // StatPearls Publishing. – 2022. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK542224/> (date of the application: 15.08.2023)

199. Size-selective loosening of the blood-brain barrier in claudin-5-deficient mice / T. Nitta, M. Hata, S. Gotoh [et al.]. – Text: visual // The Journal of Cell Biology. – 2003. – Vol. 161, № 3. – P. 653-660.

200. Soares-Da-Silva, P. Outward transfer of dopamine precursor L-3,4-dihydroxyphenylalanine (L-dopa) by native and human P-glycoprotein in LLC-PK (1) and LLC-GA5 col300 renal cells / P. Soares-Da-Silva, M. P. Serrão. – Text: visual // The Journal of pharmacology and experimental therapeutics. — 2000. – Vol. 293, № 2. – P. 697-704.

201. Specific role of tight junction proteins claudin-5, occludin, and ZO-1 of the blood-brain barrier in a focal cerebral ischemic insult / H. Jiao, Z. Wang, Y. Liu [et al.]. – Text: visual // Journal of Molecular Neuroscience. – 2011. – Vol. 44, № 2. – P. 130-139.

202. St. John's wort extract with a high hyperforin content does not induce P-glycoprotein activity at the human blood-brain barrier / M. El Biali, M. Zeitlinger, M. Hacker [et al.]. – Text: visual // Clinical and Translational Science. – 2024. – Vol. 17, № 5.

203. Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease / H. Braak,

K. D. Tredici, U. Rüb [et al.]. – Text: visual // *Neurobiology of Aging*. – 2003. – Vol. 24, № 2. – P. 197-211.

204. Stern, S. Clinical relevance of the constitutive androstane receptor / S. Stern, R. Kurian, H. Wang. – Text: visual // *Drug Metabolism and Disposition*. – 2022. – Vol. 50, № 7. – P. 1010-1018.

205. Striatal dopaminergic pathways as a target for the insecticides permethrin and chlorpyrifos / D. J. Karen, W. Li, P. R. Harp [et al.]. – Text: visual // *NeuroToxicology*. – 2001. – Vol. 22, № 6. – P. 811-817.

206. Structural and functional aspects of P-glycoprotein and its inhibitors / S. Mollazadeh, A. Sahebkar, F. Hadizadeh [et al.]. – Text: visual // *Life Sciences*. – 2018. – Vol. 214. – P. 118-123.

207. Structure and function of the blood–brain barrier / J. N. Abbott, A. K. Patabendige, E. M. Dolman [et al.]. – Text: visual // *Neurobiology of Disease*. – 2010. – Vol. 37, № 1. – P. 13-25.

208. Structure of P-Glycoprotein reveals a molecular basis for poly-specific drug binding / S. G. Aller, J. Yu, A. Ward [et al.]. – Text: visual // *Science*. – 2009. – Vol. 323, № 5922. – P. 1718-1722.

209. Structure–function relationships in the human P-glycoprotein (ABCB1): insights from molecular dynamics simulations / L. L. Mora, Y. Pérez-Castillo, N. Minovski, M. Novič. – Text: visual // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2021. – Vol. 23, № 1. – P. 362.

210. Tellingén, O. V. The importance of drug-transporting P-glycoproteins in toxicology / O. V. Tellingén. – Text: visual // *Toxicology Letters*. – 2001. – Vol. 120, № 1-3. – P. 31-41.

211. Tempol modulates changes in xenobiotic permeability and occludin oligomeric assemblies at the blood-brain barrier during inflammatory pain / J. J. Lochhead, G. McCaffrey, L. Sanchez-Covarrubias [et al.]. – Text: visual // *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. – 2012. – Vol. 302, № 3. – P.

582-593.

212. The emerging evidence of the Parkinson pandemic / R. E. Dorsey, T. Sherer, M. S. Okun, B. R. Bloem. – Text: visual // *Journal of Parkinson's Disease*. – 2018. – Vol. 8, № 1. – P. 3-8.

213. The homodimeric ATP-binding cassette transporter LmrA mediates multidrug transport by an alternating two-site (two-cylinder engine) mechanism / H. W. van Veen, A. Margolles, M. Muller [et al.]. – Text: visual // *The EMBO Journal*. – 2000. – Vol. 19, № 11. – P. 2503-2514.

214. The prevalence of Parkinson's disease: A systematic review and meta-analysis / T. Pringsheim, N. Jette, A. Frolkis, D. L. Steeves. – Text: visual // *Movement Disorders*. – 2014. – Vol. 29, № 13. – P. 1583-1590.

215. The pyrethroids permethrin and cyhalothrin are potent inhibitors of the mitochondrial complex I / B. Gassner, A. Wüthrich, G. Scholtysik, M. Solioz. – Text: visual // *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. – 1997. – Vol. 281, № 2. – P. 855-860.

216. The role of nitric oxide in paraquat-induced oxidative stress in rat striatum / M. Djukic, M. C. Jovanovic, M. Ninkovi [et al.]. – Text: visual // *Jovanovic Annals of Agricultural and Environmental Medicine* – 2007. – Vol 14, № 2. – P. 247-252

217. The role of pregnane X receptor (PXR) in substance metabolism / Y. Lv, Y. Luo, H. Ren [et al.]. – Text: visual // *Frontiers in Endocrinology*. – 2022. – Vol. 13.

218. The three mouse multidrug resistance (mdr) genes are expressed in a tissue-specific manner in normal mouse tissues / J. M. Croop, M. Raymond, D. Haber [et al.]. – Text: visual // *Molecular and Cellular Biology*. – 1989. – Vol. 9, № 3. – P. 1346-1350.

219. The utility of ultra-performance liquid chromatography/electrospray ionisation time-of-flight mass spectrometry for multi-residue determination of pesticides in strawberry / M. J. Taylor, G. A. Keenan, K. B. Reid, D. U. Fernández. – Text: visual // *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. – 2008. – Vol. 22, № 17. – P. 2731-2746.

220. Theoretical insights on helix repacking as the origin of P-glycoprotein promiscuity / C. A. Bonito, R. J. Ferreira, M. U. Ferreira [et al.]. – Text: visual // *Scientific Reports*. – 2020. – Vol. 10, № 1. – P. 9823.

221. TNF activates P-glycoprotein in cerebral microvascular endothelial cells / C. Yu, A. J. Kastin, H. Tu [et al.]. – Text: visual // *Cellular Physiology and Biochemistry*. – 2007. – Vol. 20, № 6. – P. 853-858.

222. Transporter regulation in critical protective barriers: focus on brain and placenta / V. Taggi, M. R. Riera, M. Piquette-Miller [et al.]. – Text: visual // *Pharmaceutics*. – 2022. – Vol. 14, № 7. – P. 1376.

223. Twelves, D. Systematic review of incidence studies of Parkinson's disease / D. Twelves, S. M. Perkins, C. Counsell. – Text: visual // *Movement Disorders*. – 2002. – Vol. 18, № 1. – P. 19-31.

224. Uchiyama, M. Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test / M. Uchiyama, M. Mihara. – Text: visual // *Analytical Biochemistry*. – 1978. – Vol. 86, № 1. – P. 271-278.

225. Ungerstedt, u. Behavioral, physiological, and neurochemical changes after 6-hydroxydopamine-induced degeneration of the nigro-striatal dopamine neurons / Ungerstedt, T. Ljungberg, G. Steg. – Text: visual // *Advances in neurology*. – 1974. – № 5. – P. 421-426.

226. Vautier, S. ABCB1: the role in Parkinson's disease and pharmacokinetics of antiparkinsonian drugs / S. Vautier, C. Fernandez. – Text: visual // *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*. – 2009. – Vol. 5, № 11. – P. 1349-1358.

227. Vázquez-Vélez, G. E. Parkinson's disease genetics and pathophysiology / G. E. Vázquez-Vélez, H. Y. Zoghbi. – Text: visual // *Annual Review of Neuroscience*. – 2021. – Vol. 44, № 1. – P. 87-108.

228. Vila, M. Neuromelanin, aging, and neuronal vulnerability in Parkinson's disease / M. Vila. – Text: visual // *Movement Disorders*. – 2019. – Vol. 34, № 10. – P. 1440-1451.

229. Vila, M. Targeting programmed cell death in neurodegenerative diseases / M. Vila, S. Przedborski. – Text: visual // *Nature Reviews Neuroscience*. – 2003. – Vol. 4, № 5. – P. 365-375.

230. Wang, X. Constitutive androstane receptor-mediated up-regulation of ATP-driven xenobiotic efflux transporters at the blood-brain barrier / X. Wang, D. B. Sykes, D. S. Miller. – Text: visual // *Molecular Pharmacology*. – 2010. – Vol. 78, № 3. – P. 376-383.

231. Watabe, M. Mitochondrial complex I inhibitor rotenone-elicited dopamine redistribution from vesicles to cytosol in human dopaminergic SH-SY5Y cells / M. Watabe, T. Nakaki. – Text: visual // *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. – 2007. – Vol. 323, № 2. – P. 499-507.

232. Weber, D. Determination of protein carbonyls in plasma, cell extracts, tissue homogenates, isolated proteins: Focus on sample preparation and derivatization conditions / D. Weber, M. J. Davies, T. Grune. – Text: visual // *Redox Biology*. – 2015. – Vol. 5. – P. 367-380.

233. Well-water consumption and Parkinson's disease in rural California / N. M. Gatto, M. Cockburn, J. Bronstein [et al.]. – Text: visual // *Environmental Health Perspectives*. – 2009. – Vol. 117, № 12. – P. 1912-1918.

234. Wiener, S. W. Nerve agents: a comprehensive review / S. W. Wiener, R. S. Hoffman. – Text: visual // *Journal of Intensive Care Medicine*. – 2004. – Vol. 19, № 1. – P. 22-37.

235. Yu, S. Zonula occludens proteins signaling in inflammation and tumorigenesis / S. Yu, J. He, K. Xie. – Text: visual // *International Journal of Biological Sciences*. – 2023. – Vol. 19, № 12. – P. 3804-3815.

236. Ziram causes dopaminergic cell damage by inhibiting e1 ligase of the proteasome / A. P. Chou, N. Maidment, R. Klintonberg [et al.]. – Text: visual // *Journal of Biological Chemistry*. – 2008. – Vol. 283, № 50. – P. 34696-34703.