

Афобазол предотвращает нарушения двигательной активности мышей при моделировании болезни Паркинсона 6-гидроксидофамином

Кадников И.А., Воронин М.В., Середенин С.Б.

ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», Москва

Резюме. *Актуальность.* Недостаточная эффективность терапии болезни Паркинсона обуславливает поиск новых фармакологических мишеней для достижения нейропротекторного действия и уменьшения выраженности моторных нарушений. Известно, что лигандная активация шаперона sigma-1 (SigmaR1) и ингибирование хинон-редуктазы-2 (NQO2) оказывают защитное влияние на клетки. Анксиолитик афобазол (5-этокси-2-[2-(морфолино)-этилтио] бензимидазола дигидрохлорид) взаимодействует с SigmaR1 и регуляторным сайтом NQO2, ингибируя фермент. Афобазол обладает нейропротекторной активностью в экспериментах *in vitro* и *in vivo*, однако комплексного изучения влияния препарата на координацию движений и уровень моторного дефицита при моделировании болезни Паркинсона не проводилось. *Цель.* Изучить влияние афобазола на время удерживания мышей в тесте «вращающийся стержень» при моделировании болезни Паркинсона введением 6-гидроксидофамина (6-OHDA). *Методы.* Исследовали поведение мышей самцов CD-1 (ICR) в тесте «вращающийся стержень» при постоянной и возрастающей скоростях вращения. Афобазол вводили в дозе 2,5 мг/кг в/б в течение 14 суток с началом курса через 30 мин после унилатерального интрастриатного введения 5 мкг 6-OHDA. *Результаты.* Хроническое введение афобазола увеличивает время удерживания опытных животных в 3,9 раза при тестировании на стержне с постоянной скоростью вращения по сравнению с группой плацебо. Афобазол нивелирует действие 6-OHDA при тестировании на стержне с возрастающей скоростью вращения, увеличивая время удерживания опытных животных в 1,6 раза по сравнению с группой плацебо. *Заключение.* Афобазол предотвращает нарушения поведения мышей в тесте «вращающийся стержень» при моделировании болезни Паркинсона 6-OHDA. Выявленный эффект афобазола может быть следствием его нейропротекторных свойств, обусловленных воздействием на SigmaR1 и NQO2.

Ключевые слова: 6-гидроксидофамин; вращающийся стержень; афобазол

Для цитирования:

Кадников И.А., Воронин М.В., Середенин С.Б. Афобазол предотвращает нарушения двигательной активности мышей при моделировании болезни Паркинсона 6-гидроксидофамином // *Фармакокинетика и фармакодинамика*. – 2018. – №3. – С.3–8. DOI: 10.24411/2587-7836-2018-10017.

Afobazole prevents motor function impairment in mice with 6-OHDA induced Parkinsonism

Kadnikov I.A., Voronin M.V., Seredenin S.B.

FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow

Resume. *Objective.* Current insufficiency in treatment of Parkinson's disease determines the search for new pharmacological targets to achieve neuroprotection and reduce the severity of motor impairment. It is known that ligand activation of chaperone sigma-1 (SigmaR1) and inhibition of quinone reductase 2 (NQO2) cause cytoprotection. Anxiolytic drug afobazole (5-Ethoxy-2-[2-(morpholino)-ethylthio]benzimidazole dihydrochloride) interacts with SigmaR1 and regulatory site of NQO2, inhibiting it. *In vivo* and *in vitro* experiments have demonstrated neuroprotective effect of afobazole. However, the effect of afobazole on motor deficit and motion coordination in model of Parkinson's disease was not studied. *Aim.* To study the influence of afobazole on latency to fall in rotarod test in mice with induced 6-hydroxydopamine (6-OHDA) Parkinsonism. *Methods.* Male CD-1 (ICR) mice were tested at accelerated and constant speed rotarod. Afobazole was administered during 14 days (2.5 mg/kg, ip) at course start 30 minutes after unilateral intrastratial injection of 5 µg 6-OHDA. *Results.* Chronic administration of afobazole (2.5 mg/kg) to hemiparkinsonian mice increases their latency to fall 3.9 fold contrary to placebo treated mice in constant speed rotarod. Afobazole negates 6-OHDA in accelerating rotarod increasing latency to fall 1.6 fold as compared to placebo group. *Conclusion.* Afobazole prevents motor function impairment in hemiparkinsonian mice with 6-OHDA lesion in rotarod test. Observed effect of afobazole can be a result of its neuroprotective properties derived from SigmaR1 and NQO2 interaction.

Keywords: 6-OHDA; rotarod; afobazole

For citations:

Kadnikov IA, Voronin MV, Seredenin SB. Afobazole prevents motor function impairment in mice with 6-OHDA induced Parkinsonism. *Farmakokinetika i farmakodinamika*. 2018;3:3–8. (In Russ). DOI: 10.24411/2588-0519-2018-10017.

Введение

Болезнь Паркинсона (БП) – хроническое нейродегенеративное заболевание, вызванное прогрессирующим разрушением нейронов чёрной субстанции. Ведущими симптомами заболевания являются гипокинезия, тремор, постуральная неустойчивость и мышечная ригидность. Одним из критериев успешности терапии БП является уменьшение тяжести этих симптомов [1]. Однако современные противопаркинсонические средства оказывают временное симптоматическое действие, что обуславливает поиск новых фармакологических мишеней для эффективной терапии БП. Ряд исследований указывает, что такими мишенями могут быть шаперон sigma-1 (SigmaR1) и фермент хинон-редуктаза-2 (NQO2). Шаперон SigmaR1 играет важную роль в адаптации клеток нервной системы к стрессовым воздействиям, регулируя процессы фолдинга белков в ЭПР и энергетический баланс митохондрий [2–4]. Лигандная активация SigmaR1 способствует его внутриклеточному перераспределению и проявлению шаперонной активности в отношении ионных каналов, рецепторов и ферментов цитоплазматической мембраны, что вносит важный вклад в нейропротекторное влияние [5, 6]. NQO2 катализирует восстановление орто- и пара-хинонов, в том числе хинонных производных дофамина, до гидрохинонов [7]. Известно, что гидрохинонные производные дофамина являются нестабильными соединениями, подверженными автоокислению, которое сопровождается генерацией супероксиданион радикала [8–10]. Поэтому ингибирование NQO2 может приводить к снижению продукции АФК и оказывать защитное действие на нейроны [11].

Анксиолитик афобазол (5-этокси-2-[2-(морфолино)-этилтио] бензимидазола дигидрохлорид) обладает сродством к SigmaR1 рецептору и мелатонинзависимому регуляторному сайту NQO2 (MT₃-рецептор) [12], при взаимодействии с которым афобазол ингибирует фермент [13]. В моделях *in vitro* и *in vivo* афобазол проявляет цитопротекторную и нейропротекторную активность. Данные научной периодики и собственные результаты показывают, что обе мишени вносят вклад в действие препарата [14–16]. В нашем недавнем исследовании выявлена способность афобазола препятствовать падению уровня дофамина в стриатуме мышей на модели БП, вызванной интратриатным введением 6-ОНДА [17]. При моделировании БП в эксперименте развитие дискинезии у животных является важным критерием повреждения дофаминергических структур [18]. Одной из наиболее распространённых методик

оценки нарушений двигательной активности является тест «вращающийся стержень» [19], который широко применяется для оценки эффективности действия различных соединений с противопаркинсонической активностью. Таким образом, целью нашей работы стало изучение влияния афобазола на время удерживания мышей в тесте «вращающийся стержень» при моделировании БП унилатеральным интратриатным введением 6-ОНДА.

Материалы и методы

Реактивы

Афобазол (5-этокси-2-[2-(морфолино)-этилтио] бензимидазола дигидрохлорид); ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», 6-гидроксидофамина гидрохлорид (6-ОНДА), аскорбиновая кислота, NaCl (Sigma-Aldrich), хлоралгидрат (Serva).

Животные

В работе использовали мышей-самцов аутбредной линии CD-1 (ICR) весом 25–30 г ($n = 30$). Животные были получены из НПП Питомника лабораторных животных ФИБХ. Мышей содержали в условиях вивария (20–22 °С, относительная влажность 30–70 %, 12-часовой световой цикл) по 10 особей в пластиковых клетках со свободным доступом к пище и воде.

Все процедуры с животными в исследовании были рассмотрены и утверждены комиссией Института по биоэтике на предмет соответствия этическим принципам обращения с животными.

Моделирование болезни Паркинсона интратриатным введением 6-ОНДА

За 30 минут до операции животное анестезировали хлоралгидратом (400 мг/кг, внутривенно). Анестезированное животное помещали в стереотаксические рамки (Stoelting Motorized Stereotaxis, Stoelting Co., Великобритания), где 6-ОНДА однократно вводили в правый стриатум в координатах $A = 0,4$; $L = 1,8$; $V = -3,5$, относительно брегмы [24]. Концентрация 6-ОНДА составляла 5 мкг на 1 мкл раствора, содержащего 0,9 % NaCl и 0,02 % аскорбиновой кислоты. Опытным животным (рис. 1) вводили 1 мкл раствора 6-ОНДА со скоростью 0,5 мкл/мин гамильтоновским шприцом с иглой из нержавеющей стали (30 gauge), спустя 2 минуты после инъекции иглу извлекали. Ложно-оперированным животным вводили 1 мкл контрольного раствора, содержащего 0,9 % NaCl и 0,02 % аскорбиновой кислоты, в тех же координатах (рис. 1).

Схема введения афобазола

Афобазол в дозе 2,5 мг/кг в/б и плацебо (вода для инъекций) вводили ежедневно на протяжении 14 суток с началом курса через 30 минут после интрастриатной инъекции 6-ОНДА или контрольного раствора (рис. 1). Животные были разделены на 3 группы: ложно оперированные, получавшие плацебо ($n = 10$); опытные, получавшие плацебо ($n = 10$); опытные, получавшие афобазол ($n = 9$).

Тест вращающийся стержень

Исследование двигательной активности мышей линии CD-1 в тесте вращающийся стержень проводили на экспериментальной установке Rota-rod/RS LE 8500 (диаметр стержня 3,2 см) (Panlab/Harvard Apparatus) (рис. 1). Для адаптации мышей в установке и исключения из исследования малоподвижных животных в эксперимент были включены две обучающие сессии. Первую обучающую сессию проводили на 12-е сутки после введения 6-ОНДА (рис. 1). Каждое животное дважды помещалось в экспериментальную установку при скорости вращения стержня 4 об./мин с перерывом не менее 60 минут. Вторую обучающую сессию проводили на 13-е сутки после введения 6-ОНДА при скорости вращения стержня 10 об./мин (рис. 1). Манипуляции с животными были аналогичны первой обучающей сессии. Животные, находившиеся на вращающемся стержне менее минуты в одной из обучающих сессий, исключались из эксперимента [20].

На 14-е сутки после введения 6-ОНДА исследовали способность мышей удерживаться в тесте при постоянной и увеличивающейся скоростях вращения стержня (рис. 1). Для этого экспериментальное животное помещали на вращающийся стержень с постоянной скоростью 20 об./мин и засекали время до падения животного со стержня на платформу. Во втором варианте теста экспериментальное животное помещали на стержень, вращающийся с начальной скоростью 4 об./мин, и замеряли время до падения на платформу. Максимальное число оборотов (40 об./мин) [21] достигалось за 1 минуту. Каждое животное проходило оба варианта теста по 3 раза с перерывом 30 минут между попытками. Замер времени прекращали после 120 секунд удерживания животного на стержне. Для статистической обработки данных каждого варианта теста отбиралось максимальное время удерживания из трёх попыток.

Математическая обработка экспериментальных данных

Табличные данные представлены в виде медианы и квартилей (Mdn (q25-75)). Проверку эксперимен-

тальных данных на соответствие нормальному распределению проводили с помощью теста Д'Агостино–Пирсона. Оценку статистической значимости полученных результатов проводили с применением одностороннего дисперсионного анализа Краскела–Уоллиса (Kruskal–Wallis test, Dunn's post hoc). Статистическую обработку и визуализацию полученных данных осуществляли с помощью программного пакета GraphPad 5.0.2 (GraphPad Software, San Diego California USA, www.graphpad.com).

Результаты

В условиях постоянной и возрастающей скоростей вращения стержня медианы времени удерживания для ложно-оперированных животных составили 117,5 секунды и 36 секунд соответственно (табл. 1). На 14-е сутки после унилатерального интрастриатного введения 6-ОНДА животные, получавшие плацебо, демонстрировали статистически значимые признаки моторного дефицита и нарушения координации движений. А именно, время удерживания опытных животных на стержне при постоянной скорости вращения уменьшалось на 82 % по сравнению с ложно-оперированными животными (табл. 1). При тестировании опытных мышей на стержне с возрастающей скоростью вращения время их удерживания на стержне снизилось на 50 % в сравнении с ложно-оперированными животными (табл. 1).

Хроническое введение афобазола в дозе 2,5 мг/кг на протяжении 14 суток после унилатерального интрастриатного введения 6-ОНДА приводит к увеличению времени удерживания в 3,9 раза при тестировании на стержне с постоянной скоростью вращения по сравнению опытными животными, получавшими плацебо, что составляет 70 % времени удерживания ложно-оперированных животных (табл. 1). Афобазол нивелировал действие 6-ОНДА при тестировании на стержне с возрастающей скоростью вращения, увеличивая время удерживания опытных животных в 1,6 раза (табл. 1) по сравнению с опытными животными, получавшими плацебо.

Обсуждение результатов

Использованные в работе варианты теста «вращающийся стержень» дают возможность комплексно описать параметры поведения животных в модели БП с учётом влияния таких факторов, как адаптация к условиям теста, продолжительность проведения теста [22] и степень повреждения nigrostriатного пути [23]. Вариант теста с постоян-

ной скоростью вращения обладает высокой чувствительностью при оценке моторного дефицита, вызванного небольшими морфологическими и функциональными изменениям nigrostriатного пути. Вариант теста с возрастающей скоростью вращения преимущественно отражает нарушение координации движений [23, 24]. Полученные в нашем исследовании параметры поведения ложно-оперированных животных при фиксированной скорости вращения стержня соответствуют ранее опубликованным данным, где большинство животных находились на стержне на протяжении всего времени тестирования [20, 25]. Снижение времени удерживания опытных животных на стержне в обоих вариантах теста в сравнении с ложно-оперированными животными свидетельствует о нарушении двигательной активности, характерном для повреждения nigrostriального пути в условиях унилатерального интратриатного введения 6-OHDA [25]. Полученные данные соответствуют снижению уровня дофамина в стриатуме опытных животных, получавших плацебо, зафиксированном нами в данной экспериментальной модели БП [17]. Предотвращение нарушений двигательной активности афобазолом в дозе 2,5 мг/кг в тесте «вращающийся стержень» соответствует нейропротекторному действию и согласуется с антипаркинсоническими эффектами других соединений [20, 26, 27].

Полученные результаты могут быть следствием регуляции SigmaR1 и NQO2. В ряде экспериментов было продемонстрировано агонистическое действие препарата на SigmaR1. Афобазол снижал вход ионов Ca^{2+} и H^+ в кортикальные нейроны в условиях ишемии и ацидоза. Антагонист SigmaR1 BD-1063 препятствовал развитию действия афобазола [28]. Афобазол блокирует миграцию мигроглии в ответ на АТР и УТР. Эти эффекты также статистически значимо ослаблялись антагонистами SigmaR1 [29]. Известно, что агонисты SigmaR1 оказывают нейропротекторное действие при моделировании БП. Хроническое введение селективного агониста SigmaR1 PRE-084 приводит к восстановлению нервных волокон при повреждении среднемозгового пучка головного мозга мышей, вызванном 6-OHDA [30]. На модели менадионовой генотоксичности *in vitro* было установлено, что цитопротекторное действие афобазола обусловлено не только взаимодействием препарата с SigmaR1, но и с MT_3 -рецептором [14]. Вклад регуляции NQO2 в защитные механизмы подтвержден на модели нейродегенерации, вызванной паракватом. Установлено, что введение селективного ингиби-

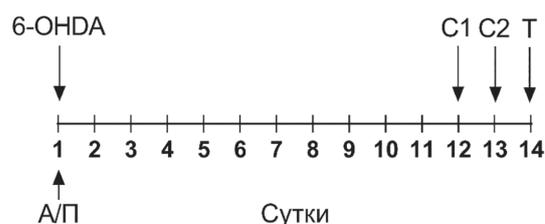


Рис. 1. Дизайн эксперимента

Примечания: 6-OHDA – однократное унилатеральное интратриатное введение 6-гидроксидофамина, А – начало курса введения афобазола, П – начало курса введения плацебо, C1 – первая обучающая сессия, C2 – вторая обучающая сессия, Т – тест «вращающийся стержень».

Таблица 1

Влияние 14-суточного введения афобазола на время удерживания в тесте «вращающийся стержень» мышей линии CD-1 при однократном унилатеральном интратриатном введении 6-OHDA

Экспериментальные группы		Время удерживания (с)	
		20 об./мин	4–40 об./мин
Л.О.	Плацебо <i>n</i> = 10	117,5 (101–120)	36 (24,75–42,25)
	6-OHDA	21 (16,25–37,75) ** <i>p</i> < 0,001	18 (14,5–26,5) * <i>p</i> = 0,031
	Афобазол (2,5 мг/кг) <i>n</i> = 9	82 (69,5–102) # <i>p</i> = 0,024	28 (24,5–33)

Примечания: Данные представлены в виде Mdn (q_{25} – q_{75}). *N* – количество животных в группе. Л.О. – ложно-оперированные животные. 6-OHDA – опытные животные. * – статистически значимые различия по сравнению с группой ложно-оперированных животных (*p* < 0,05, Kruskal–Wallis test, Dunn’s post hoc). ** – статистически значимые различия по сравнению с группой ложно-оперированных животных (*p* < 0,001, Kruskal–Wallis test, Dunn’s post hoc). # – статистически значимые различия по сравнению с группой опытных животных, получавших плацебо (*p* < 0,05, Kruskal–Wallis test, Dunn’s post hoc)

тора NQO2 в чёрную субстанцию головного мозга мышей снижало в тканях мозга содержание малонового диальдегида – маркера перекисного окисления липидов [31].

Таким образом, в настоящей работе показано, что афобазол при двухнедельном введении в дозе 2,5 мг/кг в/б предотвращает нарушения поведения мышей в тесте «вращающийся стержень» при моделировании БП унилатеральным интратриатным введением 6-OHDA. Выявленный эффект афобазола может быть следствием его нейропротекторных свойств, обусловленных воздействием на SigmaR1 и NQO2.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Кадников Илья Андреевич*Автор, ответственный за переписку*

e-mail: ikadnikov@gmail.com

ORCID ID: 0000-0001-8202-3967

SPIN-код: 8995-0919

н. с. лаборатории фармакологической генетики, ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», Москва

Воронин Михаил Владимирович

ORCID ID: 0000-0003-2477-0563

SPIN-код: 6321-4709

к. м. н., с. н. с., лаборатории фармакологической генетики, ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», Москва

Середенин Сергей Борисович

ORCID ID: 0000-0003-4482-9331

SPIN-код: 3896-4655

д. м. н., проф., академик РАН, заведующий лабораторией фармакологической генетики, ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», Москва

Kadnikov Ilya*Corresponding author*

e-mail: ikadnikov@gmail.com

ORCID ID: 0000-0001-8202-3967

SPIN code: 8995-0919

Research Officer laboratories of pharmacological genetics, FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow

Voronin Mikhail

ORCID ID: 0000-0003-2477-0563

SPIN code: 6321-4709

Candidate of Medical Sciences, Senior Research Officer, laboratories of pharmacological genetics, FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow

Seredenin Sergey

ORCID ID: 0000-0003-4482-9331

SPIN code: 3896-4655

Doctor of Medical Sciences, Prof., Academician of RAS, Head of the laboratory of pharmacological genetics, FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow

Литература / References

- Ebrahimi-Fakhari D, Saidi LJ, Wahlster L. Molecular chaperones and protein folding as therapeutic targets in Parkinson's disease and other synucleinopathies. *Acta Neuropathol Commun.* 2013;1:79. DOI: 10.1186/2051-5960-1-79
- Hayashi T, Su TP. Sigma-1 receptor chaperones at the ER-mitochondrion interface regulate Ca(2+) signaling and cell survival. *Cell.* 2007;131(3):596–610. DOI: 10.1016/j.cell.2007.08.036
- Harada S, Fujii C, Hayashi A, et al. An association between idiopathic Parkinson's disease and polymorphisms of phase II detoxification enzymes: glutathione S-transferase M1 and quinone oxidoreductase 1 and 2. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001;288(4):887–892. DOI: 10.1006/bbrc.2001.5868
- Nguyen L, Lucke-Wold BP, Mookerjee SA, et al. Role of sigma-1 receptors in neurodegenerative diseases. *J Pharmacol Sci.* 2015;127(1):17–29. DOI: 10.1016/j.jphs.2014.12.005
- Su TP, Su TC, Nakamura Y, et al. The Sigma-1 Receptor as a Pluripotent Modulator in Living Systems. *Trends Pharmacol Sci.* 2016;37(4):262–278. DOI: 10.1016/j.tips.2016.01.003
- Ruscher K, Wieloch T. The involvement of the sigma-1 receptor in neurodegeneration and neurorestoration. *J Pharmacol Sci.* 2015;127(1):30–35. DOI: 10.1016/j.jphs.2014.11.011
- Vella F, Ferry G, Delagrance P, et al. NRH:quinone reductase 2: an enzyme of surprises and mysteries. *Biochem Pharmacol.* 2005;71(1-2):1–12. DOI: 10.1016/j.bcp.2005.09.019
- Segura-Aguilar J, Paris I, Mucoz P, et al. Protective and toxic roles of dopamine in Parkinson's disease. *J Neurochem.* 2014;129(6):898–915. DOI: 10.1111/jnc.12686
- Reyber K, Perio P, Ferry G, et al. Insights into the redox cycle of human quinone reductase 2. *Free Radic Res.* 2011;45(10):1184–1195. DOI: 10.3109/10715762.2011.605788
- Asanuma M, Miyazaki I, Diaz-Corrales FJ, et al. Quinone formation as dopaminergic neuron-specific oxidative stress in the pathogenesis of sporadic Parkinson's disease and neurotoxin-induced parkinsonism. *Acta Med Okayama.* 2004;58(5):221–233. DOI: 10.18926/AMO/32105
- Cassagnes LE, Chhour M, Perio P, et al. Oxidative stress and neurodegeneration: The possible contribution of quinone reductase 2. *Free Radic Biol Med.* 2018;120:56–61. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2018.03.002
- Середенин С.Б., Воронин М.В. Нейропротекторные механизмы действия афобазола // *Экспериментальная и клиническая фармакология.* – 2009. – Т. 72. – №1. – С.3–11. [Seredenin SB, Voronin MV Neuroreceptor mechanisms involved in the action of afobazole. *Ekspierimental'naya i klinicheskaya farmakologiya.* 2009;72(1):3–11. (In Russ).]
- Kadnikov IA, Voronin MV, Seredenin SB. Effect of afobazole on activity of quinone reductase 2. *Pharmaceutical Chemistry Journal.* 2014;47(10):514–516. DOI: 10.1007/s11094-014-0993-y
- Voronin MV, Kadnikov IA. Contribution of Sigma-1 receptor to cytoprotective effect of afobazole. *Pharmacol Res Perspect.* 2016;4(6):e00273. DOI: 10.1002/prp2.273
- Behensky AA, Yasny IE, Shuster AM, et al. Stimulation of Sigma Receptors with Afobazole Blocks Activation of Microglia and Reduces Toxicity Caused by Amyloid-beta25–35. *J Pharmacol Exp Ther.* 2013;347(2):458–467. DOI: 10.1124/jpet.113.208348
- Behensky AA, Yasny IE, Shuster AM, et al. Afobazole Activation of sigma-1 Receptors Modulates Neuronal Responses to Amyloid-beta25–35. *J Pharmacol Exp Ther.* 2013;347(2):468–477. DOI: 10.1124/jpet.113.208330
- Воронин М.В., Кадников И.А., Середенин С.Б. Афобазол восстанавливает содержание дофамина при моделировании болезни Паркинсона 6-гидроксидофамином Афобазол восстанавливает содержание дофамина при моделировании болезни Паркинсона 6-гидроксидофамином // *Нейрохимия.* 2019 (в печати). [Voronin MV, Kadnikov IA, Seredenin SB. Afobazole restores strial dopamine in 6-hydroxydopamine

model of Parkinson disease. *Neurochemical Journal*. 2019. (In Russ.).

18. Blum D, Torch S, Lambeng N, et al. Molecular pathways involved in the neurotoxicity of 6-OHDA, dopamine and MPTP: contribution to the apoptotic theory in Parkinson's disease. *Prog Neurobiol*. 2001;65(2):135–172. DOI: 10.1016/S0301-0082(01)00003-X

19. Deacon RM. Measuring motor coordination in mice. *J Vis Exp*. 2013(75):e2609. DOI: 10.3791/2609

20. Goes ATR, Jesse CR, Antunes MS, et al. Protective role of chrysin on 6-hydroxydopamine-induced neurodegeneration a mouse model of Parkinson's disease: Involvement of neuroinflammation and neurotrophins. *Chem Biol Interact*. 2018;279:111–120. DOI: 10.1016/j.cbi.2017.10.019

21. Brooks SP, Dunnett SB. Tests to assess motor phenotype in mice: a user's guide. *Nat Rev Neurosci*. 2009;10(7):519–529. DOI: 10.1038/nrn2652

22. Jones BJ, Roberts DJ. The quantitative measurement of motor incoordination in naive mice using an accelerating rotarod. *J Pharm Pharmacol*. 1968;20(4):302–304

23. Monville C, Torres EM, Dunnett SB. Comparison of incremental and accelerating protocols of the rotarod test for the assessment of motor deficits in the 6-OHDA model. *J Neurosci Methods*. 2006;158(2):219–223. DOI: 10.1016/j.jneumeth.2006.06.001

24. Капица И.Г., Кокшенев И.И., Вальдман Е.А., и др. Изучение эффектов инъекционной формы гимантана на экспериментальных моделях паркинсонического синдрома // *Фармакокинетика и фармакодинамика*. 2012;2(5):10–16. [Kapitsa IG, Kokshenev II, Val'dman EA, et al. Izuchenie effektov in"ektsionnoi formy gimantana na eksperimental'nykh modelyakh parkinsonicheskogo sindroma. *Farmakokinetika i*

farmakodinamika. 2012;2(5):10–16. (In Russ).].

25. Alvarez-Fischer D, Henze C, Strenzke C, et al. Characterization of the striatal 6-OHDA model of Parkinson's disease in wild type and alpha-synuclein-deleted mice. *Exp Neurol*. 2008;210(1):182–193. DOI: 10.1016/j.expneurol.2007.10.012

26. Thornton E, Vink R. Treatment with a substance P receptor antagonist is neuroprotective in the intrastriatal 6-hydroxydopamine model of early Parkinson's disease. *PLoS One*. 2012;7(4):e34138. DOI: 10.1371/journal.pone.0034138

27. Morroni F, Tarozzi A, Sita G, et al. Neuroprotective effect of sulforaphane in 6-hydroxydopamine-lesioned mouse model of Parkinson's disease. *Neurotoxicology*. 2013;36:63–71. DOI: 10.1016/j.neuro.2013.03.004

28. Cuevas J, Rodriguez A, Behensky A, et al. Afobazole modulates microglial function via activation of both sigma-1 and sigma-2 receptors. *J Pharmacol Exp Ther*. 2011;339(1):161–172. DOI: 10.1124/jpet.111.182816

29. Cuevas J, Behensky A, Deng W, et al. Afobazole modulates neuronal response to ischemia and acidosis via activation of sigma-1 receptors. *J Pharmacol Exp Ther*. 2011;339(1):152–160. DOI: 10.1124/jpet.111.182774

30. Francardo V, Bez F, Wieloch T, et al. Pharmacological stimulation of sigma-1 receptors has neurorestorative effects in experimental parkinsonism. *Brain*. 2014;137(Pt 7):1998–2014. DOI: 10.1093/brain/awu107

31. Janda E, Parafati M, Aprigliano S, et al. The antidote effect of quinone oxidoreductase 2 inhibitor against paraquat-induced toxicity *in vitro* and *in vivo*. *Br J Pharmacol*. 2013;168(1):46–59. DOI: 10.1111/j.1476-5381.2012.01870.x