

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ  
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки  
Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова  
Российской академии наук

Научный доклад об основных результатах подготовленной научно-  
квалификационной работы (диссертации)

**ЗАЩИТНЫЕ ЭФФЕКТЫ СТРЕСС-ИНДУЦИРУЕМОГО ШАПЕРОНА  
HSP70 В МОДЕЛИ БОЛЕЗНИ ПАРКИНСОНА У КРЫС**

Белан Дарья Владимировна

06.06.01 - Биологические науки

03.03.01 – Физиология

Научный руководитель:

к.б.н., доцент Екимова Ирина Васильевна

ИЭФБ РАН  
Санкт-Петербург  
2020

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### *Актуальность исследования*

Болезнь Паркинсона (БП) - хроническое неизлечимое нейродегенеративное заболевание, связанное с постепенной гибелью дофамин (ДА)-ергических нейронов в компактной части чёрной субстанции (ЧСкч) головного мозга. Сегодня БП - это второе по распространенности нейродегенеративное заболевание, уступающее по частоте встречаемости лишь болезни Альцгеймера. Особенностью БП является длительная (20-30 лет) доклиническая стадия - бессимптомный промежуток от начала развития нейродегенеративного процесса до появления моторных дисфункций, характерных для БП (Пастухов, 2013; Пастухов и др., 2010а; Угрюмов, 2014). Одной из причин неизлечимости БП является поздняя постановка диагноза, которая производится только после появления четко выраженных моторных симптомов при переходе БП к клинической стадии. На этом этапе процесс нейродегенерации в ЧСкч достигает 60-70%, а уровень ДА в стриатуме снижается до 70%. Основной комплекс терапевтических подходов, применяемых в современной медицине, направлен на устранение или ослабление двигательных симптомов, а не замедление процесса нейродегенерации (Угрюмов, 2014).

Согласно современному представлению, разработка фармакологической стратегии лечения БП должна быть направлена не столько на облегчение симптомов, сколько на предотвращение лежащего в основе патогенеза БП процесса накопления белков с неправильной укладкой, ведущего к гибели нейронов (Jones et al., 2014; Угрюмов, 2014). Одними из многообещающих терапевтических агентов являются белки семейства HSP70. Функционирование HSP70 в клетке связано: (1) с исправлением поврежденных белков, для которых требуется белок-укладывающая машина, называемая шаперонами (Hartl, 1996); (2) с направлением денатурированных и аномальных белков в протеасомы и лизосомы на деградацию (Ciechanover et al., 1995). Дисфункция HSP70 может приводить к нарушению конформации белков и их агрегации, что может вносить вклад в патогенез БП и других нейродегенеративных заболеваний (Kim et al., 2013). Так, низкое содержание белков семейства HSP70, в частности, индуцибельного Hsp70, обнаружено в секционном материале ЧСкч тканей головного мозга пациентов с БП *postmortem* (Alvarez-Erviti et al., 2010). Развитие обширной нейродегенерации в нигростриатной системе пациентов с БП сопровождается ослаблением синтеза шаперонов семейства HSP70 вследствие низкой экспрессии генов, кодирующих белки HSP70 и фактор транскрипции теплового шока HSF1, необходимый для запуска синтеза HSP70 (Mandel et al., 2005). Более того, самый низкий уровень Hsp70 обнаруживается в ДА-ергических нейронах, содержащих агрегаты везикулярного белка  $\alpha$ -синуклеина, нарушение укладки которого является молекулярной основой развития нейродегенерации при БП. Показано, что ряд белков теплового шока (Hsp27, Hsp40, Hsp60, Hsp70, Grp78, Hsp90) локализуется вместе с конгломератами  $\alpha$ -

синуклеина в тельцах Леви в образцах ЧСкч, стриатума и других структур головного мозга у пациентов с БП, теряя при этом свою функциональную активность (Hinault et al., 2010).

За последние 10 лет накопились данные о защитном действии стресс-индуцируемого шаперона Hsp70 в моделях эпилепсии, нарушений сна и эндотоксемии (Ekimova et al., 2010; Kustanova et al., 2006; Lapshina and Ekimova, 2010, 2019; Пастухов и др., 2010б). Кроме того, защитный эффект экзогенного Hsp70 отмечен в некоторых моделях БП у трансгенных животных со сверхэкспрессией  $\alpha$ -синуклеина (Auluck et al., 2002; Dong et al., 2005). Показано, что в модели БП у крыс, созданной на основе угнетения работы протеасом в ЧСкч, выживают нейроны с повышенным содержанием Hsp70 (Пастухов и др., 2011). Однако прямых доказательств, подтверждающих роль стресс-индуцируемого белка теплового шока Hsp70 в молекулярных механизмах нейропротекции и защиты функций мозга от нейротоксических факторов при БП, до сих пор не получено. Остается неясным, сопряжено ли снижение или повышение содержания Hsp70 с выживаемостью нейронов в ЧСкч, являющейся значимой для БП структурой головного мозга.

**ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ** – установить роль стресс-индуцируемого белка теплового шока Hsp70 в молекулярных механизмах нейропротекции и защиты функций мозга от нейротоксических факторов в моделях болезни Паркинсона, созданных на основе ингибирования протеасом головного мозга у крыс.

#### **ЗАДАЧИ ИССЛЕДОВАНИЯ:**

1. Определить содержание индуцибельного белка Hsp70 в нейронах ЧСкч при системном введении ингибитора экспрессии белков теплового шока кверцетина в модели доклинической стадии БП у крыс.
2. Изучить изменения показателей нейродегенерации и компенсаторных процессов в нигростриатной системе и моторного поведения крыс при введении кверцетина в модели доклинической стадии БП.
3. Выяснить, проникает ли меченый флуоресцентным красителем Hsp70 в дофаминергические нейроны компактной части черной субстанции при интраназальном введении в модели клинической стадии БП у крыс.
4. Исследовать изменения показателей нейродегенерации и компенсаторных процессов в нигростриатной системе и моторного поведения крыс при интраназальном введении Hsp70 в модели клинической стадии БП.

#### ***Положения, выносимые на защиту***

- 1) Уменьшение содержания стресс-индуцируемого белка теплового шока Hsp70 в дофаминергических нейронах компактной части черной субстанции является одной из причин быстрой прогрессии нейродегенерации и ослабления компенсаторных процессов в нигростриатной системе при моделировании болезни Паркинсона у крыс.

2) Увеличение содержания Hsp70 в дофаминергических нейронах компактной части черной субстанции препятствует развитию нейродегенерации и приводит к активации DA-ергических компенсаторных процессов в nigrostriatной системе в модели болезни Паркинсона у крыс.

### ***Научная новизна работы***

В модели доклинической стадии БП у крыс впервые показано, что снижение содержания стресс-индуцируемого белка Hsp70 в DA-ергических нейронах ЧСкч способствует прогрессированию нейродегенерации и ускоряет переход патофизиологических признаков БП из доклинической в клиническую стадию БП. Впервые установлено, что увеличение содержания Hsp70 в нейронах путем его интраназальной доставки в мозг в модели клинической стадии БП у животных замедляет развитие нейродегенерации и способствует активации DA-ергических компенсаторных процессов в nigrostriatной системе. Полученные данные указывают на важную роль Hsp70 в механизмах нейропротекции и пластичности мозга при развитии Паркинсон-подобной патологии.

### ***Теоретическая и практическая значимость работы***

Результаты настоящего исследования имеют значение для понимания нейропротективной роли стресс-индуцируемого шаперона Hsp70 в таком фатальном неизлечимом заболевании как болезнь Паркинсона. Теоретическое значение диссертационной работы состоит в доказательстве защитного действия стресс-индуцируемого шаперона Hsp70 при развитии Паркинсон-подобной патологии. Полученные в работе результаты о защитном потенциале рекомбинантного белка Hsp70 человека в моделях БП у животных могут способствовать развитию методов и технологий превентивной фармакотерапии БП и других нейродегенеративных заболеваний. Данные, полученные в ходе выполнения работы, могут быть применены в курсах лекций по физиологии для студентов и аспирантов биологических и медицинских специальностей университетов.

## **МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ**

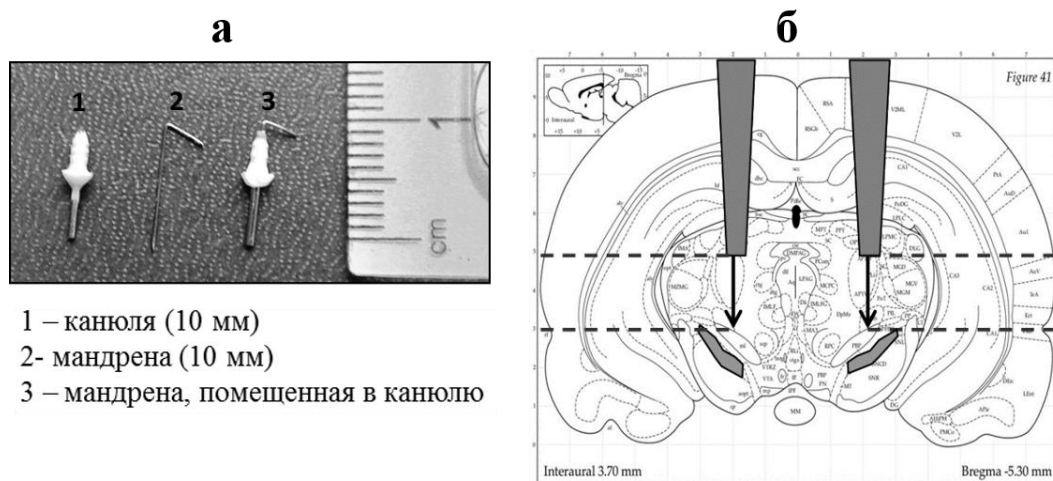
### ***Животные***

Опыты проводились на половозрелых крысах-самцах популяции Вистар 5 месяцев с массой тела 250-300 г (n=49). На протяжении всего исследования животные находились в одиночных клетках в виварии ИЭФБ РАН (t = 23-25 °С, световой режим 12:12 ч), вода и пища давались без ограничения. В исследованиях соблюдались основные биоэтические правила в соответствии с принципами Базельской декларации и протоколом, утвержденным этическим комитетом ИЭФБ РАН.

## Подготовка к экспериментам

### 1. Изготовление канюль

За 7 дней до первой микроинъекции лактацистина проводилась операция по вживлению направляющих канюль. Канюли изготавливались из игл 23G x 1/2'' (0.6 мм x 15 мм). Длина канюль составляла 10 мм, внутренний диаметр – 0.5 мм. Для недопущения попадания в полость канюли посторонних частиц (пыли, шерсти животного, опилок и т.д.) внутрь канюль помещались мандрены, изготовленные из игл 30G x 1/2'' (0.3 мм x 13 мм). Длина мандрен – 10 мм, внешний диаметр – 0.3 мм (рис. 1 а).



**Рисунок 1.** Схема локализация канюль и мест микроинъекции. Серым схематично показаны канюли и компактная часть черной субстанции. Стрелки – места микроинъекций. По (Paxinos and Watson, 2006) с изменениями.

### 2. Подготовка шприца для микроинъекций:

Микроинъекции лактацистина и фосфатного буфера выполнялись локально в ЧСкч с помощью шприца фирмы Hamilton (5 мкл). Игла для введения изготавливалась вручную из иглы 30G x 1/2'' (0.3 мм x 13 мм) и присоединялась к шприцу Hamilton с помощью полиэтиленовой трубочки. Длина иглы – 12 мм, внешний диаметр 0.3 мм.

## Экспериментальные группы животных

I. Для воспроизведения ранее разработанных в лаборатории моделей доклинической и клинической стадий БП у крыс (Пастухов и др., 2010а; Пастухов и др., 2011) использовался специфический ингибитор ферментативной активности протеасом лактацистин. Лактацистин синтезируется почвенными микроорганизмами (*Streptomyces lactacystinaeus* и другими), поэтому рассматривается как природный нейротоксин (Fenteany et al., 1995). Установлено, что после проникновения в организм, лактацистин спонтанно гидролизует до класто-лактацистин-β-лактона. Одна из основных мишеней класто-лактацистин-β-лактона – модифицированная аминокислота треонин, входящая в состав 20S протеасомы. Помимо непосредственного воздействия на 20S субъединицу, производное

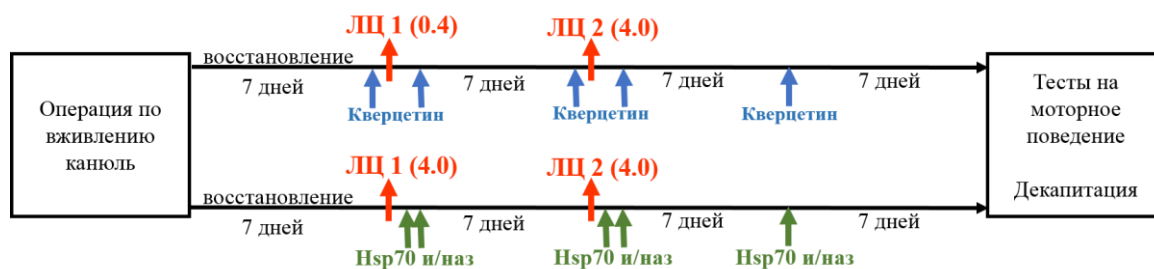
лактацистина угнетает ферментативные активности протеасомы, что ведет к накоплению в телах клеток неправильно сложенных молекул белков, в том числе  $\alpha$ -синуклеина (Fenteany and Schreiber, 1998; Karpenko et al., 2019; Omura and Crump, 2019).

Для проведения экспериментов лактацистин растворяли в апиrogenном 0.1M фосфатном буфере (ФБ; pH 7.4). Стерильность ФБ достигалась его прогонкой через фильтр-насадку на шприц 30мм PVDF 0,22 мкм (JET BIOFIL®, Корея). Микроинъекции лактацистина выполнялись дважды с интервалом 7 дней в дозах 0.4 мкг/мкл (первая микроинъекция) и 4.0 мкг/мкл (вторая микроинъекция) для воспроизведения модели доклинической стадии БП (n = 14), и в дозах 4.0 мкг/мкл (первая и вторая микроинъекции) для воспроизведения модели клинической стадии БП (n = 14) (рис. 2). Пролонгирование уменьшало проявление острых токсических эффектов нейротоксина и дало возможность оценки постадийных изменений, происходящих под действием лактацистина (Пастухов и др., 2010a). Микроинъекции лактацистина в объеме 1 мкл осуществляли наркотизированным животным (Золетил в/м, 70 мг/кг) в каждую канюлю в течение 10 мин (рис. 1 б). Контрольная группа животных получала растворитель лактацистина – ФБ, по схеме, описанной для лактацистина.

II. Для выяснения роли индуцибельного белка Hsp70 в развитии нейродегенеративной патологии nigrostriatной системы, характерной для БП, экспрессия генов индуцибельных белков теплового шока в головном мозге была блокирована с помощью фармакологического препарата кверцетин. Известно, что контроль экспрессии генов белков теплового шока HSPs осуществляется факторами транскрипции, называемыми факторами теплового шока (HSF) (Morimoto, 1998). Кверцетин является ингибитором экспрессии генов индуцибельных белков теплового шока, влияющим на активность факторов транскрипции HSF1 и HSF2 (Awasthi and Wagner, 2005; Hosokawa et al., 1990).

На первом этапе работы перед нами стояла задача выяснить, способен ли кверцетин ингибировать экспрессию и синтез стресс-индуцируемого белка Hsp70 в нейронах ЧСкч, вызванные лактацистином. Для этого кверцетин (ICN, США) в дозе 5 мг/кг растворяли в 20 мкл диметилсульфоксида (ДМСО) и доводили до объема 0.2 мл физиологическим раствором, после чего были выполнены его в/б инъекции крысам в контрольных условиях (n = 3) и за 40 мин до микроинъекции лактацистина (n = 3). Взятие материала головного мозга производили через 24 ч после введения препаратов. В основной серии экспериментов кверцетин в дозе 5 мг/кг вводили в/б крысам (n = 7) за 40 мин до и через 24 ч после каждого введения лактацистина, а также через 7 дней после последней микроинъекции лактацистина в ЧСкч (рис. 2). Контрольным крысам в данной серии опытов (n = 7) по той же схеме делали внутрибрюшинную инъекцию 0.2 мл физиологического раствора с добавлением 20 мкл ДМСО. Для того чтобы исключить эффект кверцетина на изучаемые показатели

нейродегенерации и уровень скорость-лимирующего фермента синтеза ДА тирозингидроксилазы, проведены серии исследований с внутривентральным введением кверцетина ложнопериорированным животным.



**Рисунок 2.** Схемы экспериментов по исследованию эффектов кверцетина в модели доклинической стадии БП и нейропротективного потенциала интраназального введения белка Hsp70 в модели клинической стадии БП у крыс. ЛЦ – лактацистин.

III. Для исследования защитных эффектов Hsp70 в модели клинической стадии БП у крыс использовался рекомбинантный Hsp70 человека, любезно предоставленный зав. лаб. защитных механизмов клетки ИНЦ РАН Гужовой И.В. (Ekimova et al., 2018). Hsp70 растворяли в апирогенном 0.1М ФБ. Крысу (n = 7) плотно укутывали в махровое полотенце таким образом, чтобы голова была неподвижна, затем укладывали на спину. Голова крысы находилась под углом относительно горизонтальной плоскости, что обеспечивало попадание раствора на обонятельный эпителий, а не стекание в носоглотку. Hsp70 общим объемом 10 мкл по каплям объемом 3-4 мкл подносили к каждой ноздре крысы на носике пипетки и ждали, когда крыса его вдохнет. Такой способ интраназального введения исключал возможность повреждения обонятельного эпителия. Hsp70 вводили крысам через 4 часа, 28 часов после первой микроинъекции лактацистина и через 4 часа, 28 часов и 7 дней после второй микроинъекции (рис. 2). Контрольная группа животных по такой же схеме получала растворитель Hsp70 - ФБ. Для исследования способности рекомбинантного Hsp70 проникать в ДА-ергические нейроны ЧСкч при его интраназальном введении была проведена серия опытов с введением крысам (n = 4) белка Hsp70, меченого флуоресцентной меткой Alexa-568. Декапитация животных в этой серии опытов осуществлялась через 4 часа после интраназального введения белка.

### ***Методика проведения тестов на моторное поведение***

Моторные тесты выполняли через 14 дней после последней микроинъекции лактацистина, в утренние часы до кормления животных.

1. Тест с семечками подсолнечника использовали для исследования изменений в мелкой моторике губ, языка и передних конечностей крыс. В различных исследованиях показано, что крыса, для того чтобы извлечь семечку из кожуры, использует передние лапы, губы, зубы и язык (Gonzalez and Kolb, 2003). За двое суток до начала тестирования крысам давали семечки подсолнечника (n=40-42 шт.) вместо стандартного корма, за сутки до теста крыс не кормили. При выполнении теста крысы получали семечки в таком же количестве;

экспериментатор засекал латентный период взятия в лапки первой семечки, подсчитывал время поедания одной семечки и общее количество семечек, съеденных крысой за 5 минут.

2. Модифицированный тест «Суок» применен для оценки изменений походки и координации движений (Kalueff et al., 2008). В тесте использовали наклонную планку длиной 1.5 м, одним концом опущенную в клетку крысы. На другой конец планки помещали животное. Экспериментатор производил подсчет соскальзываний лапок крыс с планки и оценивал скорость прохождения по планке. Моторные нарушения измеряли в баллах с помощью шкалы, разработанной в лаборатории на основе работы (Mittoux et al., 2002) (табл. 1).

Таблица 1. Шкала в баллах для оценки моторных нарушений в тесте «Суок»

| Показатель  | Баллы |
|---|-------|
| <b>Координация движений</b>                               |       |
| Нормальная работа лап                                     | 0     |
| Соскальзывание лапы животного с планки                    | 0.5   |
| Соскальзывание животного с планки с повисанием            | 1     |
| Падение животного с планки                                | 2     |
| <b>Походка</b>  |       |
| Нормальная походка  | 0     |
| Шаткая, неуверенная, медленная походка                    | 1     |
| Неустойчивая походка, растопыренные конечности            | 2     |
| Широкая расстановка конечностей и их ассиметричная работа | 3     |

3. Для оценки сенсомоторного дефицита конечностей использован тест «перевернутая решетка». Крысу помещали на горизонтальную решетку (22 x 13 см, ячейки 0.5 см<sup>2</sup>), расположенную на высоте 50 см над уровнем подстилки. Такая высота решетки исключала травмирование крысы при падении. Экспериментатор переворачивал решетку на 180° и включал секундомер. Регистрировалось время зависания крысы на решетке с помощью всех четырех конечностей. Не допускалось перемещение крысы на одну из боковых сторон решетки, зацепление за решетку с помощью хвоста.

### **Обработка материала**

#### *1. Декапитация*

Через 14 дней после последней микроинъекции лактацестина крыс декапитировали под наркозом (Золетил в/м, 70 мг/кг). Для иммуногистохимического исследования головной мозг извлекали и фиксировали в 4% растворе формалина при +4°C. Для криопротекции мозг промывали в 0.1М растворе ФБ и переносили в 15 % раствор сахарозы при +4°C. Спустя 6



дней мозг замораживали в 2-метилбутане, охлажденном до -45 °С с помощью сухого льда. Хранение мозга для дальнейшего исследования осуществлялось при температуре -80 °С.

## *2. Иммуногистохимическое исследование*

Для иммуногистохимического исследования на криостате (Leica, Германия) при -21-24 °С изготавливали срезы головного мозга толщиной 10 мкм, содержащие стриатум и ЧСкч. Локализация структур осуществлялась с помощью атласа (Paxinos and Watson, 2006). Срезы помещали на предметные стекла, сушили в течение суток при комнатной температуре и хранили в морозильной камере при температуре -20 °С.

Для подсчета количества выживших ДА-ергических нейронов в ЧСкч, исследования иммунореактивности тирозингидроксилазы (ТГ), везикулярного транспортера моноаминов 2 (ВТМА2), шаперона Hsp70 был применен биотин-стрептавидиновый метод. Срезы промывали в 0.1М ФБ, затем в течение 10 минут выполняли термическое демаскирование антигенов в цитратном буфере (99 °С; рН 6.0). Для гашения активности эндогенной пероксидазы срезы выдерживали в 0.3%-ном растворе пероксида водорода на метаноле в течение 20 минут. После трехкратной промывки в 0.1М ФБ срезы на 10 минут помещали в 0.1М ФБ с добавлением 0.1%-ного Tween-20 (Sigma, США) для повышения проницаемости плазматических мембран и затем преинкубировали в блокирующем растворе (3% сыворотки козы (Sigma, США), 0.01% Tween-20 на ФБ) в течение 1 часа при комнатной температуре. После этого срезы инкубировали с первыми поликлональными антителами кролика против ТГ (1:1000) (Abcam, Великобритания), ВТМА2 (1:100) (Sigma, США), с первыми моноклональными антителами мыши против индуцибельного Hsp70 (клон 2Е5, любезно предоставлены сотрудниками лаб. защитных механизмов клетки ИНЦ РАН) в течение 48 часов при температуре +4 °С. После трехкратной промывки в 0.1М ФБ срезы инкубировали в течение 1 часа во вторых антителах козы против IgG кролика (1:400) или мыши (1:350), конъюгированных с биотином (Vector Lab., США), затем в комплексе стрептавидин-пероксидаза (1:400) (Vector Lab., США). Далее срезы промывали в 0.1М ФБ и синхронно визуализировали реакцию с помощью 0.05%-ного раствора диаминобензидина (Sigma, США) с 0.015%-ным пероксидом водорода на 0.1М ФБ в течение 5 минут. Затем срезы промывали дистиллированной водой, проводили по восходящим спиртам и заключали под покровное стекло с помощью среды Витрогель (Россия). Срезы хранили при комнатной температуре.

## *3. Анализ препаратов*

Гистологические препараты изучали с помощью микроскопа Karl Zeiss (Imager A1) со встроенной видеокамерой и фотографировали с помощью программы AxioVision (4.8). Анализ изображений ЧСкч проводили с помощью программы PhotoM ([http://www.t\\_lambda.chat.ru/](http://www.t_lambda.chat.ru/)). Визуальным методом осуществлялся подсчет ТГ-

иммунореактивных нейронов в ЧСкч с видимым ядром. У каждого животного было обработано 10-12 снимков. Результаты представлялись как среднее арифметическое  $\pm m$ . Оптическую плотность иммунореактивного вещества оценивали компьютерной программой как интенсивность серого цвета при прохождении волны света длиной 650 нм. Результат оценки оптической плотности представлял собой разницу между интенсивно окрашенными серым цветом нейронами ЧСкч, содержащими иммунореактивное вещество ТГ, и интенсивностью окраски фона (не содержащего иммунореактивного вещества) на том же срезе. Анализ оптической плотности ВТМА2 и шаперона Hsp70 в нейронах ЧСкч проводили аналогично. Данные по изменению оптической плотности выражали в условных единицах (у. е.).

Для подсчета ТГ-иммунореактивных аксонов в стриатуме использовали программу ImageJ, которая является одной из распространенных программ для анализа изображений. Одной из возможностей данной программы является автоматическое (под контролем экспериментатора) выделение интенсивно окрашенных серым цветом аксонов, иммунореактивных к ТГ, и подсчет их количества на каждом снимке. Результаты представлялись как среднее арифметическое  $\pm m$ .

#### *4. Конфокальная микроскопия*

После предварительной подготовки тканей крыс, получавших интраназально Hsp70, меченый флуорохромом Alexa-568, проводили инкубацию срезов, содержащих ЧСкч, с первыми поликлональными антителами кролика против ТГ (1:2000; Abcam, Великобритания) или индуцибельного Hsp70 человека (клон 2E5) и вторыми антителами против IgG кролика, конъюгированными с Alexa-488 (зеленый сигнал, 1:500; Sigma, США). Анализ препаратов проводили на конфокальном микроскопе (Leica TCS SL). Свечение флуоресцентной метки Alexa-488, связанной с ТГ или Hsp70 человека, вызывали аргоновым лазером при длине волны 488 нм, а флуорохрома Alexa-568, связанного с Hsp70, - при длине волны 543 нм. Регистрацию изображений осуществляли двумя независимыми каналами конфокального микроскопа. Результирующие изображения получали путем наложения двух изображений, зарегистрированных отдельно в области спектра Alexa-488 (зеленый сигнал) для ТГ или Hsp70 и в области спектра Alexa-568 (красный сигнал) для Hsp70. Анализ изображений осуществлялся визуально с помощью программы Leica LAS-AF-Lite.

#### *5. Статистическая обработка результатов*

Анализ всех полученных данных осуществлялся с помощью программы Statistica 7.0. Статистический анализ данных по моторному поведению проводился с помощью непараметрического критерия Краскелла-Уолиса. Статистическая обработка иммуногистохимических показателей выполнялась с помощью дисперсионного анализа ANOVA с последующим *post-hoc* анализом с помощью критерия Тьюки HSD для сравнения

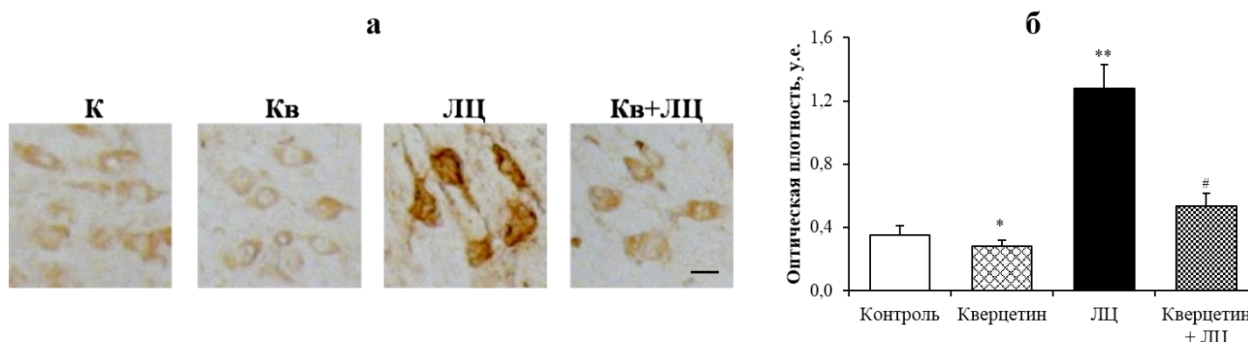
нескольких групп между собой. Полученные результаты считались статистически значимыми при  $p \leq 0.05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

### I. Развитие нейродегенерации и компенсаторных процессов в nigростриатной системе в условиях снижения содержания Hsp70

#### 1.1 Влияние кверцетина на содержание шаперона Hsp70 в нейронах компактной части черной субстанции при моделировании доклинической стадии болезни Паркинсона у крыс

Для того чтобы выяснить роль индуцибельного белка теплового шока Hsp70 в молекулярных механизмах нейропротекции и защиты функций мозга от нейротоксических факторов при развитии БП, на первом этапе работы было важно изучить изменения в морфологических признаках нейродегенерации и в компенсаторных процессах в DA-ергической nigростриатной системе при моделировании доклинической стадии БП у крыс при снижении содержания Hsp70 в нейронах ЧСкч. Известно, что контроль экспрессии генов белков теплового шока HSPs осуществляется факторами транскрипции, называемыми факторами теплового шока (HSF) (Morimoto, 1998). Показано, что при протеотоксическом клеточном стрессе, вызванном ингибитором протеасом, отмечается синергичная активация факторов транскрипции HSF1 и HSF2 (Awasthi and Wagner, 2005). Одним из фармакологических препаратов, нацеленных на ингибирование активности HSF1 и HSF2, является кверцетин (Hosokawa et al., 1990).



**Рисунок 3.** Изменение содержания Hsp70 в нейронах компактной части черной субстанции у крыс через 24 ч после введения контрольного раствора (К), кверцетина (Кв), лактацистина (ЛЦ), кверцетина и лактацистина (Кв + ЛЦ) при моделировании доклинической стадии болезни Паркинсона у крыс среднего возраста. Световая микроскопия (а). Hsp70-иммунореактивные нейроны в компактной части черной субстанции (масштаб 10 мкм). Достоверность различий в опыте относительно: контроля \* -  $p < 0.05$ ; \*\* -  $p < 0.01$ ; # кверцетина + ЛЦ по сравнению с действием ЛЦ -  $p < 0.05$ .

Наши исследования показали, что внутрибрюшинное введение кверцетина крысам приводило через 24 ч к небольшому снижению уровня Hsp70 (на 20 % ( $p < 0.05$ )) в нейронах ЧСкч по сравнению с контрольной группой животных (введение растворителя кверцетина ДМСО). Микроинъекции лактацистина в ЧСкч приводили через 24 ч к мобилизации экспрессии стресс-индуцируемого белка Hsp70, на что указывало возрастание в 3.6 раза ( $p$

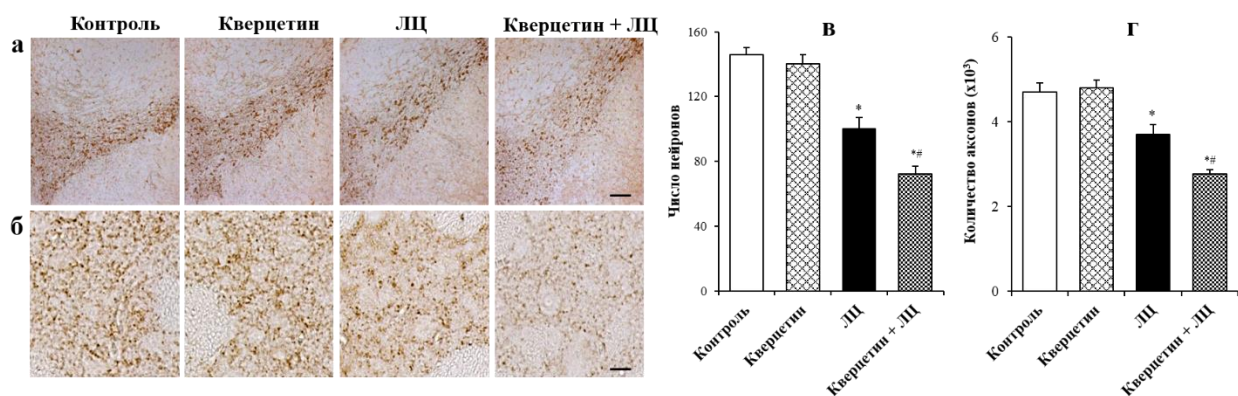
< 0.01) содержания Hsp70 в нейронах ЧСкч по сравнению с контролем. Превентивное введение кверцетина препятствовало лактацистин-индуцированной экспрессии Hsp70 в ЧСкч. Об этом свидетельствовало снижение содержания Hsp70 в нейронах ЧСкч в 2.2 раза ( $p < 0.05$ ) по сравнению с эффектом лактацистина (рис. 3).

### *1.2 Влияние кверцетина на показатели нейродегенерации в нигростриатной системе в модели доклинической стадии БП у крыс*

Для моделирования нейродегенеративной патологии нигростриатной системы, характерной для БП, была воспроизведена ранее разработанная в лаборатории модель БП у крыс среднего возраста на основе лактацистина (Пастухов и др., 2010а; Пастухов и др., 2011), который вводился локально в ЧСкч дважды с интервалом 7 дней (см. рис. 2). Лактацистин является специфическим ингибитором ферментативной активности протеасомы, органоида, отвечающего за своевременную деградацию неправильно сложенных, поврежденных и токсичных белков (Fenteany and Schreiber, 1998; Fenteany et al., 1995). Ингибирование протеасомы в ДА-ергических нейронах ЧСкч ведет к накоплению в телах клеток неправильно сложенных молекул  $\alpha$ -синуклеина, белка, играющего ключевую роль в патогенезе БП (Omura and Crump, 2019). Увеличение количества агрегатов  $\alpha$ -синуклеина в цитоплазме нейронов приводит к дальнейшему блокированию работы протеасом и нарушает нормальное функционирование митохондрий, что способствует развитию окислительного стресса в клетке и накоплению неправильно сложенных белков, в том числе и самого  $\alpha$ -синуклеина. Процесс приобретает лавинообразный характер, приводя к нарушению нормального функционирования ДА-ергических нейронов и их гибели.

Проведенный морфологический анализ нейронов, иммунореактивных к ТГ, выявил уменьшение на 30% ( $p < 0.05$ ) количества ДА-ергических нейронов в ЧСкч и на 20% ( $p < 0.05$ ) – их аксонов в стриатуме через 14 дней после последней микроинъекции лактацистина (рис. 4). Такие изменения в уровне дегенерации в нигростриатной системе характерны для доклинической стадии БП.

Способность кверцетина снижать мобилизацию шаперонного механизма, основанного на Hsp70, в нейронах ЧСкч явилась основанием для проведения дальнейших исследований в модели доклинической стадии БП. Внутривентрикулярное введение кверцетина крысам среднего возраста осуществлялось за 40 мин до и через 24 ч после каждого введения лактацистина, а также через 7 дней после последней микроинъекции лактацистина (см. рис. 2).



**Рисунок 4.** Изменение количества ДА-ергических нейронов в компактной части черной субстанции (а, в) и ДА-ергических аксонов в стриатуме (б, г) у крыс в модели доклинической стадии БП (ЛПС) при введении кверцетина. Световая микроскопия: (а) ТГ-иммунореактивные нейроны в компактной части черной субстанции (масштаб 50 мкм); (б) ТГ-иммунореактивные аксоны в стриатуме (масштаб 10 мкм). Достоверность различий в опыте относительно: контроля \* -  $p < 0.05$ ; кверцетина + ЛПС по сравнению с действием ЛПС # -  $p < 0.05$ .

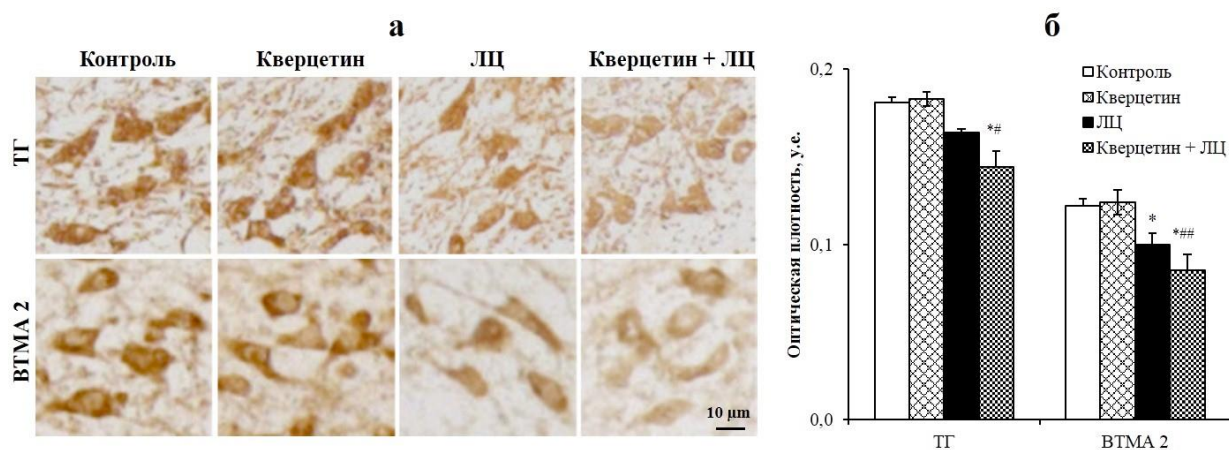
Введение кверцетина ложнооперированным животным не выявило статистически значимых изменений в количестве ДА-ергических нейронов в ЧСкч по сравнению с контрольной группой животных, получавших растворитель кверцетина (рис. 4). В ходе морфологического анализа показано, что снижение содержания Нsp70 в ЧСкч с помощью кверцетина в модели доклинической стадии БП приводит к увеличению в 1.6 раза ( $p < 0.05$ ) гибели ДА-ергических нейронов в ЧСкч и в 2.1 раза ( $p < 0.05$ ) их аксонов в стриатуме по сравнению с моделью доклинической стадии БП при введении растворителя кверцетина, что свидетельствует об усилении процесса нейродегенерации в нигростриатной системе (рис. 4). Такой уровень нейродегенерации в нигростриатной системе сопоставим с клинической стадией БП.

### 1.3 Влияние кверцетина на развитие компенсаторных процессов в нигростриатной системе в модели доклинической стадии БП у крыс

Для того чтобы выяснить, сопровождается ли процесс нейродегенерации в нигростриатной системе в модели доклинической стадии БП у крыс активацией компенсаторных механизмов, направленных на поддержание уровня ДА, мы проанализировали изменение содержания в нейронах ЧСкч скорость-лимитирующего фермента синтеза ДА ТГ и ВТМА2, укладывающего ДА в синаптические везикулы. ТГ и ВТМА2 являются косвенными показателями, отражающими функциональное состояние ДА-ергических нейронов.

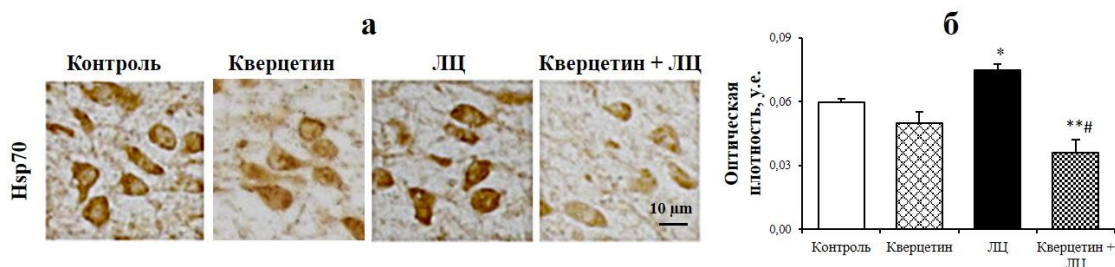
Установлено, что через 14 дней после последней микроинъекции лактацистина оптическая плотность иммунореактивного вещества ТГ практически не изменялась, однако наблюдалось снижение уровня иммунореактивности ВТМА2 на 18% ( $p < 0.05$ ) в нейронах ЧСкч по сравнению с контрольной группой животных (рис. 5). У контрольных животных после введения кверцетина не было выявлено достоверно значимых отличий в содержании

ТГ и ВТМА2, что свидетельствуют об отсутствии влияния кверцетина на изучаемые нейрохимические показатели в nigrostriatal system. Снижение содержания Hsp70 в ЧСкч у модельных животных с помощью кверцетина сопровождалось уменьшением на 20% ( $p < 0.05$ ) уровня ТГ и двукратным ( $p < 0.01$ ) падением уровня ВТМА2 (рис. 5). Эти данные указывают на прогрессирующее ослабление работы компенсаторных механизмов, направленных на поддержание нормального уровня ДА в nigrostriatal system.



**Рисунок 5.** Изменение содержания тирозингидроксилазы (ТГ) и везикулярного транспортера моноаминов 2 (ВТМА2) в ДА-ергических нейронах компактной части черной субстанции у крыс в модели доклинической стадии БП (ЛДЦ) при введении кверцетина. Световая микроскопия: (а) ТГ- и ВТМА2-иммунореактивные нейроны в компактной части черной субстанции (масштаб 10 мкм). Достоверность различий в опыте относительно: контроля \* -  $p < 0.05$ ; кверцетина + ЛДЦ по сравнению с действием ЛДЦ # -  $p < 0.05$ , ## -  $p < 0.01$ .

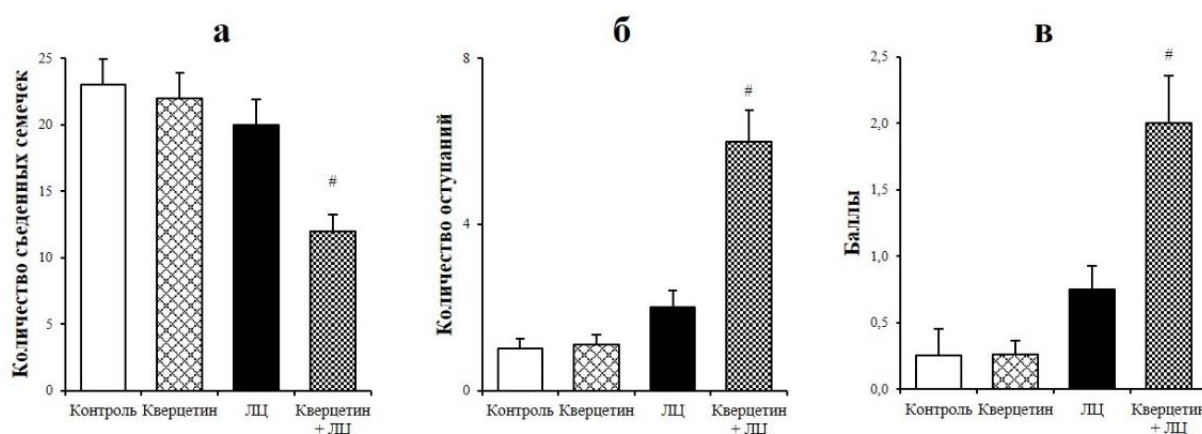
При оценке нейропротективного потенциала выживших ДА-ергических нейронов в модели доклинической стадии БП выяснено, что через 14 дней после последней микроинъекции лактацистина содержание Hsp70 в нейронах увеличивается на 25% ( $p < 0.05$ ). Внутривентрикулярные инъекции кверцетина крысам в контрольных условиях привели к незначительному снижению содержания Hsp70 в нейронах ЧСкч, а в модели доклинической стадии БП кверцетин снизил содержание Hsp70 на 52% ( $p < 0.01$ ) по сравнению с животными, которые получали только микроинъекции лактацистина (рис. 6).



**Рисунок 6.** Изменение содержания белка теплового шока Hsp70 в ДА-ергических нейронах компактной части черной субстанции у крыс в модели доклинической стадии БП (ЛДЦ) при введении кверцетина. Световая микроскопия: (а) Hsp70-иммунореактивные нейроны в компактной части черной субстанции (масштаб 10 мкм). Достоверность различий в опыте относительно: контроля \* -  $p < 0.05$ , \*\* -  $p < 0.01$ ; кверцетина + ЛДЦ по сравнению с действием ЛДЦ # -  $p < 0.05$ .

#### 1.4 Влияние кверцетина на показатели моторного поведения крыс в модели доклинической стадии БП

В ходе следующего этапа работы необходимо было выяснить, какое влияние оказывает снижение содержания шаперона Hsp70, достигнутое с помощью превентивного введения кверцетина, на показатели моторного поведения в модели доклинической стадии БП у крыс. Для этого были выполнены тесты, позволяющие оценить тонкую моторику передних конечностей, рта и языка, нарушения в походке, постуральной устойчивости и координации движений. Проведенные тесты не выявили у крыс через 14 дней после последней микроинъекции лактацистина или введения кверцетина в контрольных условиях явных нарушений изучаемых показателей моторного поведения. Однако, введение кверцетина в модели доклинической стадии БП вызывало уменьшение в 1.5 раза ( $p < 0.05$ ) числа съеденных крысой семечек подсолнечника и увеличение в 3 раза ( $p < 0.05$ ) числа соскальзываний лапок с планки, а также ухудшение согласованности движений конечностей и снижение скорости перемещения животного по планке в тесте Суок (рис. 7).



**Рисунок 7.** Изменение моторного поведения крыс в модели доклинической стадии БП (ЛЦ) при внутрибрюшинном введении кверцетина: а – количество съеденных крысой за 5 минут семян подсолнечника; б – количество соскальзываний лапок крысы с планки в тесте «Суок»; в – общая оценка прохождения крысы по планке в тесте «Суок». Достоверность различий в опыте относительно кверцетина + ЛЦ по сравнению с действием ЛЦ # -  $p < 0.05$ .

Полученные данные указывают на появление у крыс, которым проводились инъекции кверцетина и лактацистина, нарушений в тонкой моторике, координации и походке, характерных для клинической (моторной) стадии БП.

Таким образом, фармакологическое снижение экспрессии индуцибельных шаперонов HSPs, в том числе стресс-индуцируемого Hsp70, в головном мозге в модели доклинической стадии БП у крыс среднего возраста, препятствует лактацистин-индуцированной экспрессии Hsp70 в нейронах ЧСкч и приводит к резкому прогрессированию патоморфологических и нейрохимических признаков, характерных для модели доклинической стадии БП. Об этом свидетельствует гибель более половины ДА-ергических нейронов в ЧСкч, угасание компенсаторных и нейропротективных процессов в

ЧСкч. Это способствует переходу нейропатологических симптомов от доклинической (премоторной) к клинической (моторной) стадии БП, на что указывает появление моторных дисфункций.

Ранее в нашей лаборатории получены результаты, указывающие на то, что в доклинической стадии БП в первую очередь погибают ДА-ергические нейроны ЧСкч, изначально не содержащие индуцибельного Hsp70 (Пастухов и др., 2011), что позволило нам предположить, что именно этот шаперон является ключевым нейропротективным агентом при развитии БП. Поэтому задачей следующего этапа исследования стало определить, способно ли повышение содержания Hsp70 в нейронах ЧСкч замедлить или остановить процесс развития Паркинсон-подобной нейродегенеративной патологии при моделировании клинической стадии БП у крыс.

## **II. Исследование защитных эффектов рекомбинантного Hsp70 в модели клинической стадии БП у крыс**

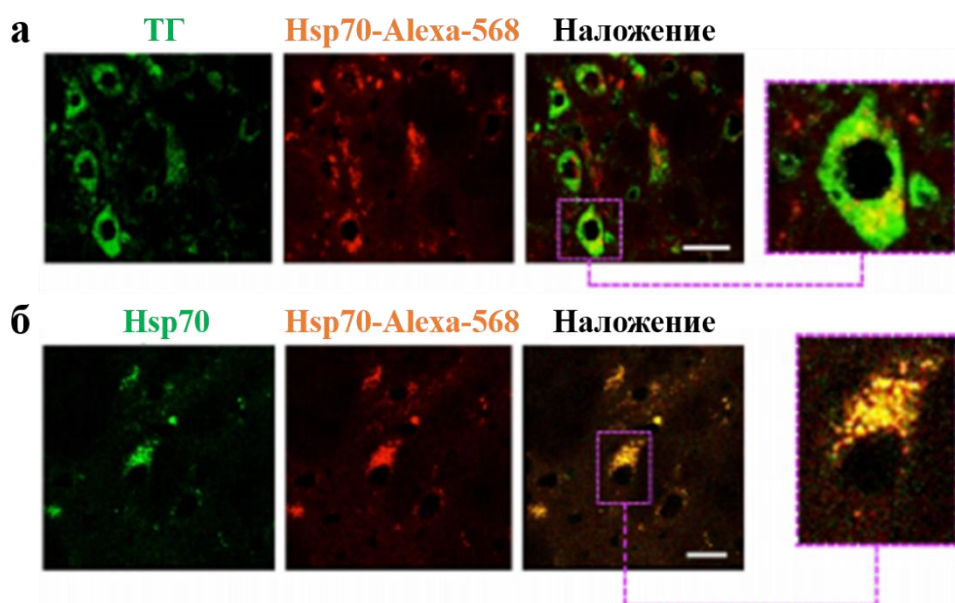
### *2.1 Исследование способности рекомбинантного Hsp70 проникать в дофаминергические нейроны компактной части черной субстанции при интраназальном введении*

На первом этапе работы необходимо было установить, способен ли рекомбинантный белок Hsp70 человека проникать в ДА-ергические нейроны ЧСкч при интраназальном введении. Для этого в работе были использованы меченый флуоресцентным красителем Hsp70 (Hsp70-Alexa-568) и методы конфокальной микроскопии. У контрольных и модельных животных с помощью конфокального микроскопа Leica TCS SL проанализировано наложение сигналов для ТГ и меченого Hsp70 в ДА-ергических нейронах ЧСкч и ДА-ергических аксонах в стриатуме. При анализе результирующего изображения выяснено, что через 4 ч после интраназального введения Hsp70-Alexa-568 активно проникал в ДА-ергические нейроны ЧСкч, обнаруживаясь как в телах, так и в отростках этих нейронов в стриатуме. Проникая в нейроны, меченый Hsp70 локализовался в цитоплазме и не обнаруживался в ядре (рис. 8 а). При наложении сигналов, полученных от Hsp70-Alexa-568 и антител, меченых флуоресцентным красителем и связанных с антителами против белка Hsp70 человека, обнаружена их полная колокализация, что свидетельствует о том, что в нейроны ЧСкч проник именно Hsp70 (рис. 8 б).

Сходные результаты о проникновении экзогенного Hsp70 в нейроны получены в модели болезни Альцгеймера у мышей. Установлено, что через 3 ч после интраназального введения Hsp70 обнаруживается в цитоплазме обонятельных луковиц, неокортекса, гиппокампа и мозжечка контрольных и модельных животных (Bobkova et al., 2014; Evgen'ev et al., 2019; Yurinskaya et al., 2015). Согласно недавним исследованиям, существует несколько способов проникновения экзогенных молекул в головной мозг при интраназальном введении. Так, авторы работы (Dhuria et al., 2010) считают, что одним из



путей доставки белковых молекул в мозг может быть транспорт по периневральным каналам обонятельного нерва (n. olfactorius), образованным шванноподобными клетками (Lochhead and Thorne, 2014). При таком способе доставки, вещества обнаруживаются в обонятельных луковицах уже через 40 минут после их интраназального введения (Frey, 2002). Другим механизмом доставки веществ в мозг при интраназальном введении может быть транспорт по тройничному нерву (n. trigeminus), иннервирующему респираторный и обонятельный эпителии носовой полости. Особенностью этого нерва является то, что он имеет входы как в обонятельные луковицы, так и в область варолиева моста (Clerico et al., 2003). Однако данные о наличии периневрального пространства вокруг тройничного нерва пока отсутствуют в литературе.



**Рисунок 8.** Конфокальная микроскопия: (а) проникновение меченого флуоресцентным красителем Hsp70 (Hsp70-Alexa568; красный сигнал) в дофаминергические нейроны компактной части черной субстанции (ТГ, зеленый сигнал) при интраназальном введении; (б) колокализация флуоресцентных меток, конъюгированных с антителами против Hsp70 человека (зеленый сигнал) и интраназально введенным Hsp70-Alexa568 (красный сигнал). Масштаб 10 мкм.

Нами продемонстрировано, что, достигнув среднего мозга, Hsp70 интернализуется ДА-ергическими нейронами ЧСкч. Проникновение Hsp70 в нейроны мозга может осуществляться путем его эндоцитоза, который может быть опосредован различными рецепторами. Так, установлено, что рецепторы SREC1, CD40 и Lox-1 связывают Hsp70 и способствуют его внутриклеточной интернализации (Calderwood et al., 2007). В другой работе *in vitro* показано, что Hsp70 способен взаимодействовать с фосфолипидными мембранами и формировать поры, через которые возможно его проникновение в клетку (Arispe et al., 2002). Помимо этого, Hsp70 способен связываться с кислыми липидами плазматической мембраны посредством своего АТФ-связывающего домена, таким образом проникая сквозь мембрану (Harada et al., 2007). Одной из конкретных аминокислотных

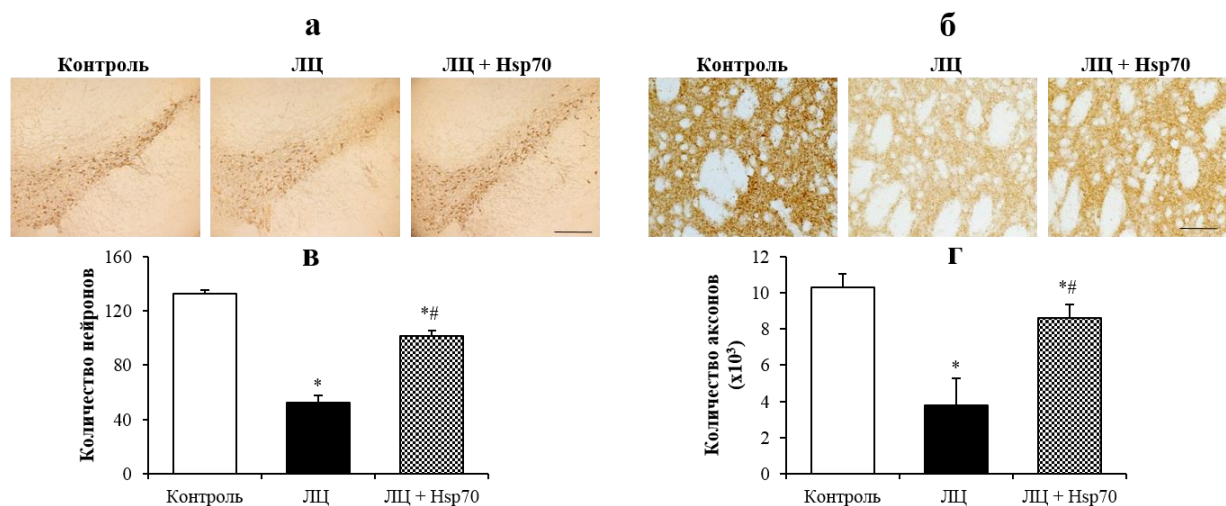
последовательностей на поверхности Hsp70, ответственных за интернализацию этого белка нейронами, может быть положительно заряженный KST-домен, способный к переносу внутрь клетки белков, в 30 раз превышающих его собственный размер (Komarova et al., 2015). Следовательно, рекомбинантный Hsp70, введенный интраназально, способен проникать в мозг, мигрировать в область ЧСкч и интернализироваться ДА-ергическими нейронами у крыс при моделировании нейродегенеративной патологии нигростриатной системы, характерной для БП.

## *2.2 Влияние интраназального введения Hsp70 на показатели нейродегенерации в нигростриатной системе в модели клинической стадии БП у крыс*

На данном этапе работы, для воспроизведения модели БП на основе глубокого угнетения функции протеасом головного мозга, крысы получали микроинъекции лактацистина в высоких дозах. Для исследования целостности популяции ДА-ергических нейронов в ЧСкч и их терминалей в стриатуме использовался маркер ДА-ергических нейронов, скорость-лимитирующий фермент синтеза ДА ТГ и иммуногистохимические методы. Проведенный морфологический анализ подсчета нейронов, иммунореактивных к ТГ, выявил уменьшение на 62% ( $p < 0.01$ ) числа ДА-ергических нейронов в ЧСкч и на 68% ( $p < 0.05$ ) – их аксонов в стриатуме через 14 дней после последней микроинъекции лактацистина (рис. 9), что свидетельствует о развитии у крыс обширной нейродегенерации нигростриатной системы, характерной для клинической стадии БП.

Для того чтобы оценить нейропротективный потенциал экзогенного Hsp70, мы провели сравнительный анализ числа выживших нейронов в ЧСкч и их аксонов в стриатуме у модельных животных, получавших интраназально Hsp70, и модельных животных, получавших растворитель Hsp70 (контроль). Результаты проведенного анализа показали, что введение Hsp70 модельным животным увеличивало в 2 раза ( $p < 0.01$ ) число выживших ДА-ергических нейронов в ЧСкч по сравнению с контрольной группой. При подсчете числа ДА-ергических аксонов в стриатуме в этих опытах также обнаружено увеличение в 2.4 раза ( $p < 0.05$ ) их количества по сравнению с действием лактацистина (рис. 9).

Полученные данные указывают, что интраназальное введение рекомбинантного Hsp70 в модели клинической стадии БП у крыс существенно ослабляет развитие нейродегенеративного процесса в нигростриатной системе.



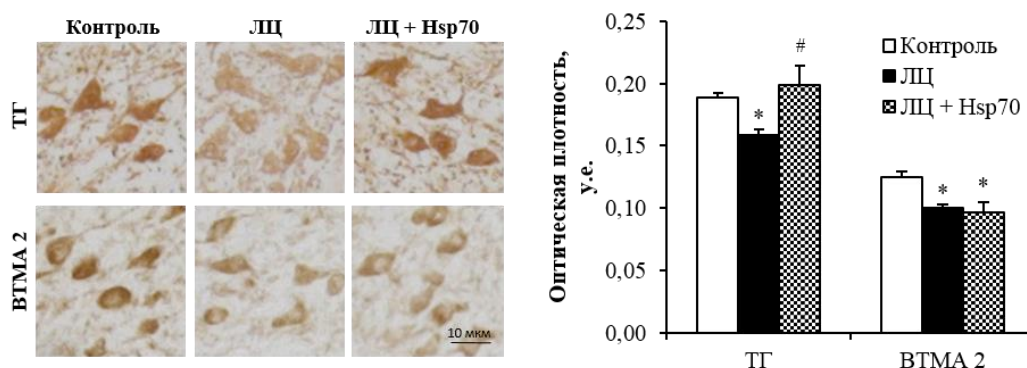
**Рисунок 9.** Изменение количества ДА-ергических нейронов в компактной части черной субстанции (а, в) и ДА-ергических аксонов в дорсальном стриатуме (б, г) у крыс в модели клинической стадии БП при интраназальном введении Hsp70. Световая микроскопия: (а) ТГ-иммунореактивные нейроны в компактной части черной субстанции (масштаб 50 мкм); (б) ТГ-иммунореактивные аксоны в стриатуме (масштаб 10 мкм). Достоверность различий в опыте относительно: контроля \* -  $p < 0.05$ ; ЛЦ + Hsp70 по сравнению с действием ЛЦ # -  $p < 0.05$ .

### 2.3 Влияние интраназального введения Hsp70 на развитие компенсаторных процессов в нигростриатной системе в модели клинической стадии БП у крыс

Для того чтобы выяснить, сопровождается ли процесс дегенерации в нигростриатной системе при введении лактацистина активацией компенсаторных механизмов, направленных на поддержание уровня ДА, мы проанализировали изменение содержания в нейронах ЧСкч ТГ и ВТМА2. Установлено, что через 14 дней после последней микроинъекции лактацистина происходило снижение оптической плотности иммунореактивного вещества ТГ на 20.3% ( $p < 0.05$ ) в телах ДА-ергических нейронов ЧСкч. Двукратные микроинъекции лактацистина крысам приводили также к снижению уровня иммунореактивности ВТМА2 на 23% ( $p < 0.05$ ) в нейронах ЧСкч по сравнению с контрольной группой животных (рис. 10). Следовательно, развитие процесса дегенерации в нигростриатной системе при введении лактацистина в ЧСкч сопровождается снижением компенсаторных резервов ДА в нейронах ЧСкч. Таким образом, модель глубокого угнетения функции протеасом в нигростриатной системе характеризуется гибелью более половины ДА-ергических нейронов в ЧСкч и их отростков в стриатуме, снижением уровней ТГ и ВТМА2 в нейронах ЧСкч. В совокупности такие изменения характерны для клинической стадии БП (Ugrumov et al., 2011; Пастухов и др., 2014).

Для того чтобы оценить способность рекомбинантного Hsp70 сохранять естественный уровень компенсаторных резервов ДА в нигростриатной системе, мы сопоставили изменение содержания ТГ и везикулярного транспортера моноаминов у модельных животных, получавших интраназально Hsp70, и модельных животных, получавших растворитель Hsp70 (контроль). Проведенный анализ показал, что

рекомбинантный Hsp70, введенный интраназально, увеличивал до контрольных значений уровень ТГ в нейронах ЧСкч ( $p < 0.05$ ), однако не оказывал значительного влияния на уровень ВТМА2 в нейронах ЧСкч по сравнению с моделью клинической стадии БП (рис. 10).



**Рисунок 10.** Изменение содержания тирозингидроксилазы (ТГ) и везикулярного транспортера моноаминов 2 (ВТМА2) в ДА-ергических нейронах компактной части черной субстанции у крыс в модели клинической стадии БП при интраназальном введении Hsp70. Световая микроскопия (слева): ТГ- и ВТМА2-иммунореактивные нейроны в компактной части черной субстанции (масштаб 10 мкм). Достоверность различий в опыте относительно: контроля \* -  $p < 0.05$ ; ЛЦ + Hsp70 по сравнению с действием ЛЦ # -  $p < 0.05$ .

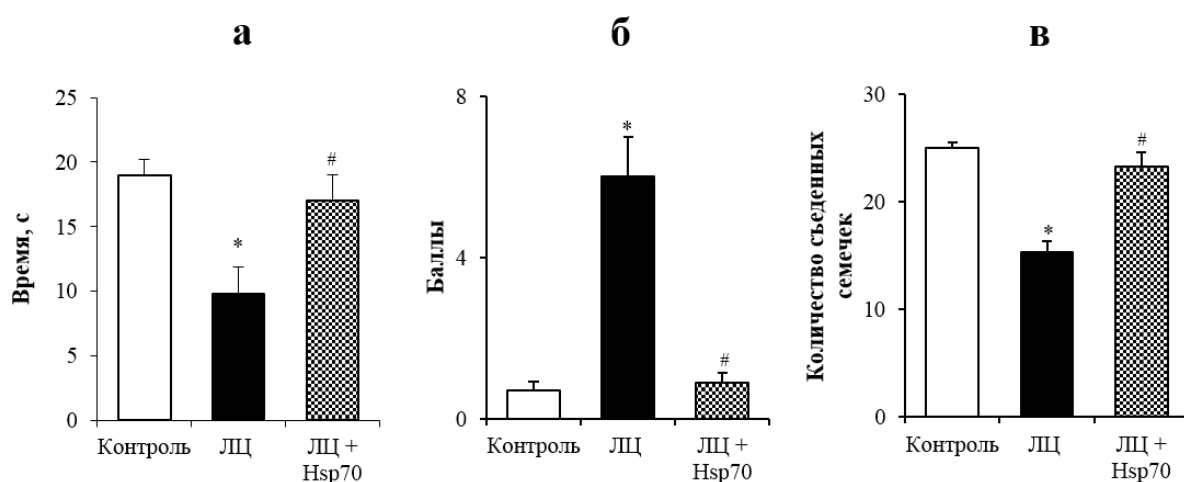
Таким образом, интраназальное введение рекомбинантного Hsp70 в модели клинической стадии БП у крыс ослабляет процесс дегенерации в nigrostriatal system, а также способствует частичной активации механизмов, направленных на компенсацию функциональной недостаточности ДА в нейронах ЧСкч.

#### 2.4 Влияние интраназального введения Hsp70 на показатели моторного поведения крыс в модели клинической стадии БП

Снижение способности управлять движениями тела - важнейший признак БП. Это неврологическое нарушение проявляется у людей снижением общей двигательной активности, замедленностью движений (брадикинезией), дрожанием рук, изменением походки, повышением мышечного тонуса и постуральной неустойчивостью (Jankovic, 2008). Для того чтобы выяснить, изменяются ли показатели моторного поведения у крыс при введении лактацистина в ЧСкч мы провели тесты, позволяющие оценить тонкую моторику передних конечностей, рта и языка, скорость развития сенсомоторного дефицита конечностей, нарушения в походке и координации движений.

Через 14 дней после последней микроинъекции лактацистина в ЧСкч продолжительность зависания на решетке у крыс сократилась в 2 раза ( $p < 0.05$ ) по сравнению с контролем (рис. 11 а). Выявлены также нарушения в координации движений и походке при тестировании крыс в тесте «Суок». Об этом свидетельствовало возрастание в 5 раз ( $p < 0.05$ ) числа соскальзываний лапок крысы с планки, снижение скорости прохождения по планке и изменение положения задних конечностей относительно тела при

прохождении планки по сравнению с контрольной группой животных. В среднем, по разработанной неврологической шкале, тяжесть моторных нарушений у крыс, получавших лактацистин, оказалась в 6.1 раз ( $p < 0.05$ ) выше, чем в контроле (рис. 11 б). Применение теста с семенами подсолнечника показало уменьшение в 1.7 раза ( $p < 0.01$ ) числа раскрытых и съеденных семечек в течение пяти минут (рис. 11 в). Таким образом, билатеральные микроинъекции лактацистина в ЧСкч вызывают изменения моторного поведения крыс, проявляющиеся в более быстром развитии сенсомоторного дефицита конечностей, нарушении координации движений и походке, ухудшении мелкой моторики передних конечностей, рта и языка.



**Рисунок 11.** Изменение моторного поведения в модели клинической стадии БП у крыс при интраназальном введении Hsp70: а – время зависания крыс на решетке; б – оценка качества прохождения крыс по планке в тесте «Суок»; в – количество съеденных крысой за 5 минут семян подсолнечника. Достоверность различий в опыте относительно: контроля \* -  $p < 0.05$ ; ЛЦ + Hsp70 по сравнению с действием ЛЦ # -  $p < 0.05$ .

Выяснено, что у крыс в клинической стадии БП, получавших интраназально рекомбинантный Hsp70, увеличивалось в 2 раза ( $p < 0.05$ ) время зависания на решетке по сравнению с контрольной группой (введение растворителя Hsp70 модельным животным) (рис. 11 а). Рекомбинантный белок Hsp70 уменьшал в 3 раза ( $p < 0.05$ ) число соскальзываний лапок крыс с планки в тесте «Суок», увеличивал скорость прохождения по планке. Согласно примененной нами неврологической шкале, Hsp70 ослаблял в 5.5 раз ( $p < 0.05$ ) общий уровень моторных нарушений при прохождении по планке (рис. 11 б). Кроме того, интраназальное введение рекомбинантного Hsp70 увеличивало в 1.5 раза ( $p < 0.05$ ) число съеденных крысой за 5 минут семечек (рис. 11 в). Следовательно, рекомбинантный Hsp70, введенный интраназально, снижает скорость утомления мышц при зависании на решетке, улучшает координацию движений, походку, мелкую моторику рта, языка и передних конечностей. Эти данные указывают о способности Hsp70 ослаблять изменения моторного поведения, вызванные лактацистином.

Таким образом, локальные микроинъекции специфического ингибитора протеасом лактацистина в высоких дозах воспроизводят у крыс симптомы, характерные для модели клинической стадии БП: нарушения моторного поведения, гибель более половины ДА-ергических нейронов в ЧСкч и их отростков в стриатуме, снижение уровней ТГ и ВТМА2 в нейронах ЧСкч. Увеличение содержания Hsp70 в нейронах ЧСкч ослабляет процесс дегенерации нигростриатной системы, препятствует проявлению симптомов моторных дисфункций и способствует частичной активации механизмов, направленных на компенсацию функциональной недостаточности ДА-ергических нейронов ЧСкч. Следовательно, введенный интраназально рекомбинантный Hsp70 оказывает защитные эффекты в модели БП у крыс.

Сходные результаты о защитных эффектах Hsp70 были получены и другими авторами. Установлено, что системное введение Hsp70, связанного с Tat-пептидом, способным повышать эффективность проникновения Hsp70 в нейроны мозга, препятствует развитию нейродегенерации в нигростриатной системе и повышает уровень ДА и его метаболитов в стриатуме в нейротоксических моделях БП *in vitro* и *in vivo* (Nagel et al., 2008). В одном из исследований, где, для большей биодоступности и более продолжительного эффекта, доставка Tat-Hsp70 осуществлялась в гидрогеле, подтвержден защитный потенциал Hsp70 в 6-гидроксидофаминовой модели БП у мышей (Tunesi et al., 2019). При этом, в исследовании также отмечено улучшение моторного поведения у модельных мышей, в частности, восстановление походки в тесте «сужающаяся дорожка».

Защитный эффект Hsp70 в модели протеасомной дисфункции может быть связан с его влиянием на ключевой механизм развития нейродегенерации в нигростриатной системе, вызванной лактацистином. Данные литературы свидетельствуют, что в лактацистин-индуцированных моделях БП снижение активности УПС в нейронах приводит к накоплению в них белковых включений, позитивных к  $\alpha$ -синуклеину *in vitro* и *in vivo* (Fornai et al., 2003; McNaught et al., 2002). В генетической модели  $\alpha$ -синуклеиновой токсичности на мушке рода *Drosophila sp.* установлено, что индуцибельный Hsp70 принимает активное участие в процессах, ослабляющих токсичность олигомеров  $\alpha$ -синуклеина (Auluck et al., 2002, 2005). Установлено, что Hsp70 способен ингибировать образование фибрилл  $\alpha$ -синуклеина за счет избирательного связывания с префибриллами, что приводит к ослаблению токсических свойств агрегатов  $\alpha$ -синуклеина (Dedmon et al., 2005). Шаперон Hsp70 участвует как в поддержании нормальной конфигурации  $\alpha$ -синуклеина, так и в деградации агрегатов  $\alpha$ -синуклеина, которые представлены в мозге у больных БП в составе телец Леви (Klucken et al., 2004). Помимо взаимодействия с  $\alpha$ -синуклеином, шаперон Hsp70 способен вмешиваться в процесс развития апоптоза, влиять на формирование нейровоспаления в тканях мозга (Margulis et al., 2020; Yenari et al., 2005;

Zheng et al., 2008), что также может вносить вклад в замедление процесса нейродегенерации nigростриатной системы.

Результаты проведенного исследования свидетельствуют, что шаперон Hsp70 является ключевой молекулой, сдерживающей развитие нейродегенеративной патологии в ЧСкч, характерной для БП. Снижение экспрессии Hsp70 в нейронах ЧСкч в модели доклинической стадии БП у крыс способствует прогрессии нейродегенерации и переходу нейропатологических симптомов от доклинической к клинической стадии БП, для которой характерно развитие обширной нейродегенерации nigростриатной системы и появление моторных феноменов. С другой стороны, увеличение содержания белка Hsp70 в нейронах с помощью его интраназального введения останавливает процесс развития нейродегенерации на доклинической стадии БП и препятствует его переходу в тяжелую, клиническую, форму. В совокупности представленные результаты выдвигают на первый план возможность использования Hsp70 для задержки развития процесса дегенерации DA-ергических нейронов в ЧСкч, сохранения компенсаторных резервов DA в nigростриатной системе и возможности их активации при БП. Проведенное исследование может явиться научным обоснованием разработки новой молекулярной технологии ранней терапии БП, основанной на препаратах или индукторах Hsp70 с целью поддержания высокого нейропротективного потенциала шаперонов в головном мозге.

## **ВЫВОДЫ**

1. Системное превентивное введение ингибитора экспрессии белков теплового шока кверцетина крысам при моделировании доклинической стадии болезни Паркинсона с помощью микроинъекций ингибитора протеасом лактацистина в компактную часть черной субстанции препятствует лактацистин-индуцированному повышению содержания Hsp70 в нейронах компактной части черной субстанции.
2. Снижение содержания стресс-индуцируемого белка Hsp70 в дофаминергических нейронах компактной части черной субстанции при моделировании доклинической стадии болезни Паркинсона у крыс приводит к усилению нейродегенерации в nigростриатной системе, ослаблению компенсаторных процессов, направленных на поддержание нормального уровня дофамина, и развитию моторной дисфункции, характерной для клинической стадии болезни Паркинсона. Полученные данные свидетельствуют о вовлечении шаперона Hsp70 в молекулярные механизмы нейропротекции и поддержания функции сохранившихся дофаминергических нейронов при развитии Паркинсон-подобной патологии.
3. Меченый флуоресцентным красителем Hsp70, введенный интраназально, проникает в головной мозг и интернализуется дофаминергическими нейронами компактной части черной субстанции в модели клинической стадии болезни Паркинсона у крыс.

4. Интраназальное введение Hsp70 увеличивает количество выживших дофаминергических нейронов и аксонов в nigростриатной системе, препятствует ослаблению компенсаторных процессов в nigростриатной системе и развитию моторных нарушений в модели клинической стадии болезни Паркинсона у крыс. Это свидетельствует о том, что Hsp70 предотвращает переход патологических признаков болезни Паркинсона от доклинической к клинической стадии.

## СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ РАБОТЫ

### Статьи:

1. Пастухов Ю.Ф., **Плаксина (Белан) Д.В.**, Лапшина К. В., Гужова И. В., Екимова И. В. Экзогенный белок Hsp70 останавливает процесс нейродегенерации в условиях экспериментальной модели болезни Паркинсона у крыс // Доклады Академии Наук. 2014. Т. 457, № 6. С. 724–727.
2. Екимова И.В., **Плаксина (Белан) Д.В.** Влияние кверцетина на нейродегенеративные и компенсаторные процессы в nigростриатной системе в модели преклинической стадии болезни Паркинсона у крыс // Рос. Физиол. Журн. им. И. М. Сеченова. 2016. Т. 102. № 6. С. 647-658.
3. Ekimova I.V., **Plaksina (Belan) D.V.**, Pastukhov Yu. F, Lapshina K.V. et al. New HSF1 inducer as a therapeutic agent in a rodent model of Parkinson's disease // Exp. Neurol. 2018. Vol. 306. P. 199–208.

### Тезисы:

1. **Плаксина (Белан) Д.В.**, Екимова И.В. Эффекты интраназального введения рекомбинантного Hsp70 на временные характеристики сна и бодрствования у крыс / 7-ая Российская (с международным участием) молодежная школа-конференция «Сон - окно в мир бодрствования». 2013. С. 66.
2. **Plaksina (Belan) D.V.**, Lapshina K.V., Ekimova I.V. Effects of intranasal injections of Hsp70 on motor behavior in an experimental model of Parkinson's disease in rats/ Proceedings of the 19th Multidisciplinary International Neuroscience and Biological Psychiatry Conference «Stress and behavior». St.-Petersburg. 2013. P. 27.
3. **Plaksina (Belan) D.**, Pastukhov Y., Lapshina K., Meshalkina D., Guzhova I., Ekimova I. Assessment of the neurotherapeutic activity of the recombinant heat shock protein Hsp70 in the rat model of Parkinson's disease. Abstr. of the 2nd World Congress on Neurotherapeutics: Dilemmas, Debates, Discussions. Prague. 2015. P. 46.
4. **Плаксина (Белан) Д.В.**, Екимова И.В. Изменение мышечного тонуса и спектральных характеристик ЭЭГ во время медленного и быстрого сна при интраназальном введении белка теплового шока Hsp70 / 8-ая Российская



молодежная школа-конференция с международным участием «Сон - окно в мир бодрствования». С. 86. 2015.

5. **Plaksina (Belan) D.V., Guzhova I.V., Ekimova I.V.** Reduction of HSP70 expression increases nigrostriatal pathology in a rat model of proteasome inhibition. / 23rd Multidisciplinary International Neuroscience and Biological Psychiatry Conference «Stress and behavior». P. 22. 2016.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Alvarez-Erviti, L., Rodriguez-Oroz, M.C., Cooper, J.M., Caballero, C., Ferrer, I., Obeso, J.A., and Schapira, A.H.V. (2010). Chaperone-mediated autophagy markers in Parkinson disease brains. *Arch. Neurol.* 67, 1464–1472.
2. Arispe, N., Doh, M., and Maio, A. De (2002). Lipid interaction differentiates the constitutive and stress-induced heat shock proteins Hsc70 and Hsp70. *Cell Stress Chaperones* 7, 330.
3. Auluck, P.K., Chan, H.Y.E., Trojanowski, J.Q., Lee, V.M.Y., and Bonini, N.M. (2002). Chaperone suppression of  $\alpha$ -synuclein toxicity in a Drosophila model for Parkinson's disease. *Science* 295, 865–868.
4. Auluck, P.K., Meulener, M.C., and Bonini, N.M. (2005). Mechanisms of suppression of  $\alpha$ -synuclein neurotoxicity by geldanamycin in Drosophila. *J. Biol. Chem.* 280, 2873–2878.
5. Awasthi, N., and Wagner, B.J. (2005). Upregulation of heat shock protein expression by proteasome inhibition: An antiapoptotic mechanism in the lens. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 46, 2082–2091.
6. Bobkova, N. V., Garbuz, D.G., Nesterova, I., Medvinskaya, N., Samokhin, A., Alexandrova, I., Yashin, V., Karpov, V., Kukharsky, M.S., Ninkina, N.N., et al. (2014). Therapeutic effect of exogenous Hsp70 in mouse models of Alzheimer's disease. *J. Alzheimer's Dis.* 38, 425–435.
7. Calderwood, S.K., Mambula, S.S., Gray, P.J., and Theriault, J.R. (2007). Extracellular heat shock proteins in cell signaling. *FEBS Lett.* 581, 3689–3694.
8. Ciechanover, A., Laszlo, A., Bercovich, B., Stancovski, I., Alkalay, I., Ben-Neriah, Y., and Orian, A. (1995). The ubiquitin-mediated proteolytic system: Involvement of molecular chaperones, degradation of oncoproteins, and activation of transcriptional regulators. In *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press), pp. 491–501.
9. Clerico, D.M., To, W.C., and Lanza, D.C. (2003). Anatomy of the human nasal passages. *Neurol. Dis. Ther.* 57, 1–16.
10. Dedmon, M.M., Christodoulou, J., Wilson, M.R., and Dobson, C.M. (2005). Heat shock protein 70 inhibits  $\alpha$ -synuclein fibril formation via preferential binding to prefibrillar species. *J. Biol. Chem.* 280, 14733–14740.
11. Dhuria, S. V., Hanson, L.R., and Frey II, W.H. (2010). Intranasal delivery to the central nervous system: mechanisms and experimental considerations. *J. Pharm. Sci.* 99, 1654–1673.
12. Dong, Z., Wolfer, D.P., Lipp, H.P., and Büeler, H. (2005). Hsp70 gene transfer by adeno-associated virus inhibits MPTP-induced nigrostriatal degeneration in the mouse model of Parkinson disease. *Mol. Ther.* 11, 80–88.
13. Ekimova, I. V., Nitsinskaya, L.E., Romanova, I. V., Pastukhov, Y.F., Margulis, B.A., and Guzhova, I. V. (2010). Exogenous protein Hsp70/Hsc70 can penetrate into brain structures and attenuate the severity of chemically-induced seizures. *J. Neurochem.* 115, 1035–1044.
14. Ekimova, I.V., Plaksina, D.V., Pastukhov, Y.F., Lapshina, K.V., Lazarev, V.F., Mikhaylova, E.R., Polonik, S.G., Pani, B., Margulis, B.A., Guzhova, I.V., et al. (2018). New HSF1

- inducer as a therapeutic agent in a rodent model of Parkinson's disease. *Exp. Neurol.* 306, 199–208.
15. Evgen'ev, M., Bobkova, N., Krasnov, G., Garbuz, D., Funikov, S., Kudryavtseva, A., Kulikov, A., Samokhin, A., Maltsev, A., and Nesterova, I. (2019). The effect of human Hsp70 administration on a mouse model of Alzheimer's disease strongly depends on transgenicity and age. *J. Alzheimer's Dis.* 67, 1391–1404.
  16. Fenteany, G., and Schreiber, S.L. (1998). Lactacystin, proteasome function, and cell fate. *J. Biol. Chem.* 273, 8545–8548.
  17. Fenteany, G., Standaert, R.F., Lane, W.S., Choi, S., Corey, E.J., and Schreiber, S.L. (1995). Inhibition of proteasome activities and subunit-specific amino-terminal threonine modification by lactacystin. *Science* 268, 726–731.
  18. Fornai, F., Lenzi, P., Gesi, M., Ferrucci, M., Lazzeri, G., Busceti, C.L., Ruffoli, R., Soldani, P., Ruggieri, S., Alessandrì, M.G., et al. (2003). Fine structure and biochemical mechanisms underlying nigrostriatal inclusions and cell death after proteasome inhibition. *J. Neurosci.* 23, 8955–8966.
  19. Frey, W.H. (2002). Intranasal delivery: Bypassing the blood-brain barrier to deliver therapeutic agents to the brain and spinal cord. *Drug Deliv Technol* 2, 46–49.
  20. Gonzalez, C.L.R., and Kolb, B. (2003). A comparison of different models of stroke on behaviour and brain morphology. *Eur. J. Neurosci.* 18, 1950–1962.
  21. Harada, Y., Sato, C., and Kitajima, K. (2007). Complex formation of 70-kDa heat shock protein with acidic glycolipids and phospholipids. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 353, 655–660.
  22. Hartl, F.U. (1996). Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature* 381, 571–580.
  23. Hinault, M.P., Cuendet, A.F.H., Mattoo, R.U.H., Mensi, M., Dietler, G., Lashuel, H.A., and Goloubinoff, P. (2010). Stable  $\alpha$ -synuclein oligomers strongly inhibit chaperone activity of the Hsp70 system by weak interactions with J-domain co-chaperones. *J. Biol. Chem.* 285, 38173–38182.
  24. Hosokawa, N., Hirayoshi, K., Nakai, A., Hosokawa, Y., Marui, N., Yoshida, M., Sakai, T., Nishino, H., Aoike, A., Kawai, K., et al. (1990). Flavonoids inhibit the expression of heat shock proteins. *Cell Struct. Funct.* 15, 393–401.
  25. Jankovic, J. (2008). Parkinson's disease: Clinical features and diagnosis. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 79, 368–376.
  26. Jones, D.R., Moussaud, S., and Mclean, P. (2014). Targeting heat shock proteins to modulate  $\alpha$ -synuclein toxicity. *Ther. Adv. Neurol. Disord.* 7, 33–51.
  27. Kalueff, A. V., Keisala, T., Minasyan, A., Kumar, S.R., LaPorte, J.L., Murphy, D.L., and Tuohimaa, P. (2008). The regular and light-dark Suok tests of anxiety and sensorimotor integration: Utility for behavioral characterization in laboratory rodents. *Nat. Protoc.* 3, 129–136.
  28. Karpenko, M.N., Muruzheva, Z.M., Pestereva, N.S., and Ekimova, I. V. (2019). An Infection Hypothesis of Parkinson's Disease. *Neurosci. Behav. Physiol.* 49, 555–561.
  29. Kim, Y.E., Hipp, M.S., Bracher, A., Hayer-Hartl, M., and Ulrich Hartl, F. (2013). Molecular Chaperone Functions in Protein Folding and Proteostasis. *Annu. Rev. Biochem.* 82, 323–355.
  30. Klucken, J., Shin, Y., Hyman, B.T., and McLean, P.J. (2004). A single amino acid substitution differentiates Hsp70-dependent effects on  $\alpha$ -synuclein degradation and toxicity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 325, 367–373.
  31. Komarova, E.Y., Meshalkina, D.A., Aksenov, N.D., Pchelin, I.M., Martynova, E., Margulis, B.A., and Guzhova, I. V. (2015). The discovery of Hsp70 domain with cell-penetrating activity. *Cell Stress Chaperones* 20, 343–354.
  32. Kustanova, G.A., Murashev, A.N., Guzhova, I. V, Margulis, B.A., Prokhorenko, I.R., Grachev, S. V, and Evgen'ev, M.B. (2006). Protective effect of exogenous 70-kDa heat shock protein during endotoxic shock (sepsis). In *Doklady Biological Sciences*, (Springer), pp. 504–507.
  33. Lapshina, K. V., and Ekimova, I. V. (2010). Study of protective effects of exogenous heat

- shock protein 70 kDa in model of sleep deprivation in pigeon *Columba livia*. *J. Evol. Biochem. Physiol.* *46*, 461–470.
34. Lapshina, K. V, and Ekimova, I. V (2019). Exogenous Heat Shock Protein 70 kDa Facilitates the Restoration of Sleep and Thermoregulatory Characteristics in Rat Endotoxemia Model. *Sleep* *42*, A28.
35. Lochhead, J.J., and Thorne, R.G. (2014). Intranasal drug delivery to the brain. In *Drug Delivery to the Brain*, (Springer), pp. 401–431.
36. Mandel, S., Grunblatt, E., Riederer, P., Amariglio, N., Hirsch, J.J., Rechavi, G., and Youdim, M.B.H. (2005). Gene expression profiling of sporadic Parkinson's disease substantia nigra pars compacta reveals impairment of ubiquitin-proteasome subunits, SKP1A, aldehyde dehydrogenase, and chaperone HSC-70. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *1053*, 356–375.
37. Margulis, B., Tsimokha, A., Zubova, S., and Guzhova, I. (2020). Molecular Chaperones and Proteolytic Machineries Regulate Protein Homeostasis In Aging Cells. *Cells* *9*, 1308.
38. McNaught, K.S.P., Mytilineou, C., JnoBaptiste, R., Yabut, J., Shashidharan, P., Jenner, P., and Olanow, C.W. (2002). Impairment of the ubiquitin-proteasome system causes dopaminergic cell death and inclusion body formation in ventral mesencephalic cultures. *J. Neurochem.* *81*, 301–306.
39. Mittoux, V., Ouary, S., Monville, C., Lisovoski, F., Poyot, T., Condé, F., Escartin, C., Robichon, R., Brouillet, E., Peschanski, M., et al. (2002). Corticostriatopallidal Neuroprotection by Adenovirus-Mediated Ciliary Neurotrophic Factor Gene Transfer in a Rat Model of Progressive Striatal Degeneration. *J. Neurosci.* *22*, 4478–4486.
40. Morimoto, R.I. (1998). Regulation of the heat shock transcriptional response: Cross talk between a family of heat shock factors, molecular chaperones, and negative regulators. *Genes Dev.* *12*, 3788–3796.
41. Nagel, F., Falkenburger, B.H., Tönges, L., Kowsky, S., Pöppelmeyer, C., Schulz, J.B., Bähr, M., and Dietz, G.P.H. (2008). Tat-Hsp70 protects dopaminergic neurons in midbrain cultures and in the substantia nigra in models of Parkinson's disease. *J. Neurochem.* *105*, 853–864.
42. Omura, S., and Crump, A. (2019). Lactacystin: first-in-class proteasome inhibitor still excelling and an exemplar for future antibiotic research. *J. Antibiot.* *72*, 189–201.
43. Paxinos, G., and Watson, C. (2006). *The rat brain in stereotaxic coordinates: hard cover edition* (Elsevier).
44. Tunesi, M., Raimondi, I., Russo, T., Colombo, L., Micotti, E., Brandi, E., Cappelletti, P., Cigada, A., Negro, A., Ambrosio, L., et al. (2019). Hydrogel-based delivery of Tat-fused protein Hsp70 protects dopaminergic cells in vitro and in a mouse model of Parkinson's disease. *NPG Asia Mater.* *11*, 1–15.
45. Ugrumov, M.V., Khaindrava, V.G., Kozina, E.A., Kucheryanu, V.G., Bocharov, E.V., Kryzhanovsky, G.N., Kudrin, V.S., Narkevich, V.B., Klodt, P.M., Rayevsky, K.S., et al. (2011). Modeling of presymptomatic and symptomatic stages of parkinsonism in mice. *Neuroscience* *181*, 175–188.
46. Yenari, M.A., Liu, J., Zheng, Z., Vexler, Z.S., Lee, J.E., and Giffard, R.G. (2005). Antiapoptotic and Anti-inflammatory Mechanisms of Heat-Shock Protein Protection. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *1053*, 74–83.
47. Yurinskaya, M., G. Zatssepina, O., G. Vinokurov, M., V. Bobkova, N., G. Garbuz, D., V. Morozov, A., A. Kulikova, D., A. Mitkevich, V., A. Makarov, A., Yu. Funikov, S., et al. (2015). The Fate of Exogenous Human HSP70 Introduced into Animal Cells by Different Means. *Curr. Drug Deliv.* *12*, 1=10.
48. Zheng, Z., Kim, J.Y., Ma, H., Lee, J.E., and Yenari, M.A. (2008). Anti-inflammatory effects of the 70 kDa heat shock protein in experimental stroke. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* *28*, 53–63.
49. Пастухов, Ю. (2013). Изменения характеристик парадоксального сна - ранний признак болезни Паркинсона. *Журнал Высшей Нервной Деятельности Им. ИП Павлова* *63*,

75–84.

50. Пастухов, Ю., Екимова, И., и Чеснокова, А. (2014). Молекулярные механизмы патогенеза болезни Паркинсона и перспективы превентивной терапии. *Нейродегенеративные Заболевания – От Генома До Целостного Организма: Часть I: Моторная Функция и Ее Регуляция в Норме и При Патологии*. Москва: Научный мир. с. 316–355.

51. Пастухов, Ю.Ф., Чеснокова, А.Ю., Якимчук, А.А., Екимова, И.В., Романова, И.В., и Худик, К.А. (2010а). Изменения сна при дегенерации нейронов черной субстанции, вызванной ингибитором протеасомы лактацистином. *Российский Физиологический Журнал Им. И. М. Сеченова* 96, 1190–1195.

52. Пастухов, Ю.Ф., Худик, К.А., и Екимова, И.В. (2010б). Шапероны в регуляции и восстановлении физиологических функций. *Российский Физиологический Журнал Им. И.М. Сеченова* 96, 708–725.

53. Пастухов Ю.Ф., Екимова И.В., Гужова И.В., Романова И.В., и Артюхина З.Е (2011). Содержание шаперона Hsp70 в дофаминергических нейронах черной субстанции возрастает при протеасомной дисфункции. *Российский Физиологический Журнал Им. И.М. Сеченова* 97, 649–660.

54. Угрюмов, М.В. (2014). Трансляционная, персонализированная и профилактическая медицина как основа для борьбы с нейродегенеративными заболеваниями. *Нейродегенеративные Заболевания: От Генома До Целостного Организма*. Москва: Научный мир. с. 22–24.