

БЕЛАН

Дарья Владимировна

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

03.03.01 – Физиология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Санкт-Петербург

2020

Работа выполнена в лаборатории сравнительной термофизиологии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова Российской академии наук (ИЭФБ РАН).

Научный руководитель: кандидат биологических наук, доцент
Екимова Ирина Васильевна, зав. лабораторией сравнительной термофизиологии ИЭФБ РАН

Официальные оппоненты: **Шабанов Пётр Дмитриевич**
доктор медицинских наук, профессор,
зав. отделом нейрофармакологии им. С.В. Аничкова
ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины»

Пчелина Софья Николаевна
доктор биологических наук,
зав. лаб. молекулярной генетики человека отделения
молекулярной и радиационной биофизики ФГБУ «Пе-
тербургский институт ядерной физики им. Б. П. Кон-
стантинова национального исследовательского центра
«Курчатовский институт»

Ведущая организация: ФГБУН Институт биологии развития
им. Н.К. Кольцова РАН, г. Москва

Защита состоится «13» октября 2020 года в 13 часов на заседании диссертационного совета Д 002.127.01 по защите докторских и кандидатских диссертаций при ФГБУН ИЭФБ РАН

Адрес: 194223, Санкт-Петербург, пр. Тореза, д. 44


Тел.: (812)552-79-01

Электронная почта: office@iephb.ru, сайт <http://www.iephb.ru>

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке ИЭФБ РАН (Санкт-Петербург, пр.Тореза, 44), с авторефератом – на сайте ВАК РФ, с авторефератом и диссертацией – на сайте ИЭФБ РАН: <http://www.iephb.ru/sovnet.htm>

Автореферат разослан « ___ » _____ 2020 года

Ученый секретарь
диссертационного совета Д 002.127.01,
доктор биологических наук



Р. Г. Парнова

СПИСОК ОСНОВНЫХ СОКРАЩЕНИЙ

БП – болезнь Паркинсона

ВТМА 2 – везикулярный транспортер моноаминов 2 типа

ДА – дофамин

кчЧС – компактная часть черной субстанции среднего мозга

ЛЦ – лактацистин

ТГ – тирозингидроксилаза

УПС – убиквитин-протеасомная система

Hsp70 – стресс-индуцируемый белок теплового шока массой 70 кДа

ЛВК-shHsp70 – лентивектор, несущий ген шпилечной РНК к мРНК Hsp70

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность и степень разработанности проблемы

Болезнь Паркинсона (**БП**) – мультисистемное медленно прогрессирующее нейродегенеративное заболевание с широким спектром моторных и немоторных симптомов. Ведущий симптом БП – наличие в клинической стадии типичных моторных нарушений (гипокинезии, мышечной ригидности, тремора покоя), связанных с дегенерацией 60-70% двигательных дофамин (**ДА**)-ергических нейронов в компактной части черной субстанции (**кчЧС**) и со снижением уровня ДА в стриатуме на 70-80% (Bernheimer et al., 1973). Сегодня БП – это второе по распространенности нейродегенеративное заболевание, которое до сих пор остается неизлечимым. Причины неизлечимости известны: поздняя постановка диагноза, когда основная часть нейронов в кчЧС уже погибла, и применение симптоматической терапии, не влияющей на механизмы развития нейродегенерации при БП (Угрюмов, 2014). Поэтому одной из глобальных проблем фундаментальной биомедицины является разработка новых технологий ранней диагностики БП и терапевтических препаратов, нацеленных на предупреждение или замедление дегенерации нейронов головного мозга, а не на элиминацию внешних проявлений БП (Угрюмов, 2014; Mingazov et al., 2018).

Молекулярной основой развития нейродегенерации при БП является нарушение укладки белка α -синуклеина, приводящее к накоплению в нейронах его токсичных олигомеров (Rocha et al., 2018; Verma et al., 2020), которые нарушают работу всего белоксинтезирующего аппарата клетки и приводят к развитию нейродегенеративного и нейровоспалительного процессов в головном мозге. Наличие aberrantных форм α -синуклеина в нейронах кчЧС характерно как для наследственной, так и для спорадической формы БП (Пчелина, Емельянов, 2014).

Основными механизмами защиты нейронов от агрегации белковых молекул являются системы деградации белков (убиквитин-протеасомная (**УПС**) и аутофагии) и система молекулярных шаперонов – белков теплового шока HSP70. Важнейшей функцией УПС является протеолиз мутантных, неверно свернутых

и агрегированных белков, направленных шаперонами на деградацию (Ciechanover et al., 1995). Ослабление активности УПС характерно для БП и является ключевым механизмом гибели нейронов (McNaught, Jenner, 2001). На основе этого механизма созданы модели БП у животных, имитирующие доклиническую и клиническую стадии БП (Пастухов и др., 2010, 2014; Bentea et al., 2017; Ekimova et al., 2018). Шапероны семейства HSP70, в частности стресс-индуцируемый Hsp70, препятствуют неправильному фолдингу белков, контролируя процесс укладки и рефолдинга белков на всех этапах, а также помогают транспортировать аномальные белки в протеасому и лизосому для деградации (Guzhova, Margulis, 2006; Hartl et al., 2011).

Первые сведения о вовлечении шаперонов в патогенез БП были получены в работах, в которых определили HSP70 как компоненты телец Леви, локализованные с агрегатами α -синуклеина (Auluck et al., 2002; Gao et al., 2015). За последние 10 лет накопились данные о защитном действии стресс-индуцируемого шаперона Hsp70 в моделях эпилепсии, нарушений сна и эндотоксемии (Kustanova et al., 2006; Ekimova et al., 2010; Пастухов и др., 2010; Lapshina, Ekimova, 2010, 2019). Кроме того, защитный эффект экзогенного Hsp70 отмечен в некоторых моделях БП у трансгенных животных со сверхэкспрессией α -синуклеина (Auluck et al., 2002; Dong et al., 2005). Показано, что в модели БП у крыс, созданной на основе угнетения работы протеасом в кЧС, 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 экспрессии генов, кодирующих Hsp70, с выживаемостью нейронов в кЧС, являющейся значимой для БП структурой головного мозга.

Спорадическая форма БП обычно развивается в пожилом возрасте, для которого характерно снижение активности работы УПС и АТФ-зависимой шаперонной системы (Labbadia et al., 2015; Roewe et al., 2017). Показано, что при БП экспрессия некоторых шаперонов снижена в кЧС, что отражает ослабление механизмов конформационного контроля и клеточной защиты (Chu et al., 2009). Однако в литературе до сих пор отсутствуют экспериментальные данные, подтверждающие сопряженность между связанным со старением снижением содержания Hsp70 и устойчивостью ДА-ергических нейронов в кЧС к патологии, характерной для БП. Пока остается неясным, можно ли с помощью шаперонной терапии ослабить процесс нейродегенерации в головном мозге при БП.

Цель работы

Выяснить 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

1) Изучить изменения патоморфологических признаков нейродегенерации и компенсаторных процессов в DA-ергической nigrostriatной системе в модели доклинической стадии БП у крыс среднего возраста в условиях снижения содержания Hsp70 в нейронах кЧС.

2) Выяснить, сопряжены ли возрастные изменения в нейродегенеративных и компенсаторных процессах в nigrostriatной системе с содержанием Hsp70 в кЧС при моделировании доклинической стадии БП у крыс.

3) Изучить влияние курсового интраназального введения рекомбинантного белка Hsp70 человека на нейродегенеративный и компенсаторный процессы в nigrostriatной системе при моделировании клинической стадии БП у крыс среднего возраста.

4) Оценить защитный потенциал индуктора шаперонов хиноидного соединения U133 в моделях доклинической и клинической стадий БП у крыс среднего и пожилого возраста.

5) Изучить влияние соединения U133 на альфа-синуклеиновую патологию и реактивный микроглиоз в головном мозге при моделировании БП у крыс.

Положения, выносимые на защиту

1) Стресс-индуцируемый белок теплового шока Hsp70 составляет важнейшую систему защиты DA-ергических нейронов nigrostriatной системы от нейротоксических факторов при развитии Паркинсон-подобной патологии; уменьшение содержания Hsp70 в DA-ергических нейронах кЧС приводит к прогрессии нейродегенерации в nigrostriatной системе, а увеличение – препятствует развитию нейродегенерации и усиливает nigrostriatную функцию при моделировании БП у животных.

2) Hsp70-индуцирующий эффект соединения U133 лежит в основе его нейропротективного действия в моделях доклинической и клинической стадий БП. Молекулярными мишенями Hsp70 являются агрегаты α -синуклеина, фосфорилированная по Ser129 форма α -синуклеина и активированная микроглия.

Научная новизна работы

В моделях БП у крыс среднего и пожилого возраста впервые показано, что снижение содержания Hsp70 в DA-ергических нейронах кЧС способствует прогрессированию нейродегенерации и ускоряет переход патофизиологических

признаков БП из доклинической в клиническую стадию БП, а увеличение – напротив, замедляет развитие нейродегенерации и способствует активации ДА-ергических компенсаторных процессов в nigrostriатной системе. Полученные данные указывают на важную роль Hsp70 в механизмах нейропротекции и пластичности мозга при развитии Паркинсон-подобной патологии. Впервые в моделях БП у животных установлены нейропротективные и противовоспалительные эффекты терапии с индуктором шаперонов, малой молекулой U133. Впервые выяснено, что защитное действие шаперона Hsp70 связано с его способностью разбирать белковые агрегаты α -синуклеина, снижать содержание фосфорилированной по Ser129 формы α -синуклеина и уменьшать реактивный микроглиоз.

Теоретическая и практическая значимость работы

Результаты настоящего исследования имеют значение для фундаментальной нейрофизиологии, фармакологии и биомедицины. Теоретическое значение диссертационной работы состоит в доказательстве защитного действия стресс-индуцируемого шаперона Hsp70 при развитии Паркинсон-подобной патологии. Полученные в работе данные о терапевтическом потенциале рекомбинантного белка Hsp70 человека и отечественного индуктора шаперонов соединения U133 в моделях БП у животных могут найти применение в клинических исследованиях при разработке технологии превентивной фармакотерапии БП и других нейродегенеративных заболеваний. Полученные результаты могут быть использованы в курсах лекций по физиологии и неврологии для студентов биологических и медицинских специальностей университетов и медицинских институтов.

Апробация работы

Результаты исследования представлены в виде устных и стендовых докладов на всероссийских и международных конференциях: 2nd World Congress on Neurotherapeutics (Прага, Чехия, 2015), 21st, 23rd и 26th Multidisciplinary International Neuroscience and Biological Psychiatry Conference «Stress and Behavior» (Санкт-Петербург, Россия, 2014, 2016, 2019), XV Всероссийское совещание с международным участием и VIII Школа по эволюционной физиологии (Санкт-Петербург, 2016), 13th International Conference on Alzheimer's and Parkinson's Diseases (Вена, Австрия, 2017), Первая Всероссийская конференция и школа с международным участием «Оптогенетика и Оптофармакология» (Санкт-Петербург, Россия, 2018), 2nd Brainstorming Research Assembly for Young Neuroscientists (Милан, Италия, 2019), II Всероссийская научная конференция с международным участием «Оптогенетика+ 2020» (Санкт-Петербург, Россия, 2020).

Публикации по теме диссертации

По теме диссертации опубликованы 9 статей в рецензируемых научных журналах, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией РФ для размещения материалов диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, и 9 тезисов докладов всероссийских и международных конференций.

Личный вклад автора

Все экспериментальные процедуры – подготовка и проведение хирургических операций, введение препаратов, моторные тесты, сбор образцов тканей головного мозга, биохимические и гистохимические исследования, статистическая обработка полученных результатов – выполнены автором лично. Автор участвовала в подготовке публикаций по материалам работы совместно с научным руководителем и с соавторами, представляла результаты исследований на всероссийских и международных конференциях.

Финансовая поддержка работы

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке программы № 5 Президиума РАН “Фундаментальные науки – медицине” (2014 г.), грантов РФФИ № 14-04-00478 (2014-2016 г.) и РФФИ № 16-15-00278 (2016-2018 г.). Морфологические исследования выполнены на базе ЦКП ИЭФБ РАН.

Объем и структура диссертации

Диссертация изложена на 138 страницах машинописного текста и состоит из введения, содержащего цель и задачи исследования, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов, обсуждения, заключения и выводов. Список литературы включает 58 публикаций отечественных авторов и 343 зарубежных источника. Работа иллюстрирована 36 рисунками и 1 таблицей.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Объект исследования. В работе использованы половозрелые самцы крыс популяции Вистар: молодые (6 нед., 170-190 г., $n = 19$), среднего возраста (6 мес., 250-300 г., $n = 85$) и пожилые (20 мес., 400-450 г., $n = 61$). На протяжении всего исследования животных, которым осуществляли операции по вживлению проводящих канюль, содержали в виварии ИЭФБ РАН ($t = 21-23$ °C; световой режим 12:12 ч) в одиночных клетках, а крыс, которым выполняли интраназальное введение лактастина – в клетках по 5 крыс. Животные имели свободный доступ к воде и пище. Манипуляции с животными осуществляли в соответствии с принципами Базельской декларации и протоколом, утвержденным этическим комитетом ИЭФБ РАН, находящимся в соответствии с национальными и международными требованиями.

Хирургические операции по вживлению проводящих канюль выполняли под общей анестезией (Zoletil; внутримышечно, 75 мг/кг) с использованием стереотаксической техники. Канюли размещали над кЧС согласно атласу (Paxinos, Watson, 2007) по координатам относительно брегмы (Р 5.0 мм; L 2.0 мм; Н 5.0 мм).

Моделирование болезни Паркинсона. Для решения задач работы использованы валидные модели БП у крыс, разработанные ранее в лаборатории (Пастухов и др., 2010, 2011, 2014; Екимова и др., 2018) на основе локального (в кЧС) или интраназального введения специфического ингибитора ферментативной активности протеасом лактацистина (ЛЦ; Enzo). Микроинъекции ЛЦ в кЧС крыс выполняли дважды с интервалом 7 дней в различных дозах: для моделирования доклинической стадии БП (n = 36) – 0.4 мкг/мкл и 0.4 или 4.0 мкг/мкл; для моделирования клинической стадии БП (n = 21): 2 x 4.0 мкг/мкл. В отдельной серии экспериментов для моделирования доклинической стадии БП у крыс пожилого возраста ЛЦ в дозе 100 мкг/ 10 мкл вводили интраназально в каждую ноздрю животного дважды с интервалом 7 дней (n = 27).

Нокдаун Hsp70. Для снижения содержания Hsp70 в нейронах кЧС у крыс среднего возраста (n = 7) использован метод запуска РНК-интерференции с помощью лентивирусного вектора, несущего ген шпилечной РНК к мРНК Hsp70 (**ЛВК-shHsp70**). Исследование содержания белка Hsp70 в кЧС проводили методом Вестерн-блот через 14 дней после микроинъекции ЛВК-shHsp70. Для оценки эффективности трансфекции ДА-ергических нейронов кЧС (n = 3) использован лентивектор ЛВК-LVTНМ, содержащий только ген зеленого флуоресцентного белка GFP. Спустя 14 дней после трансфекции ЛВК-shHsp70 в кЧС выполняли микроинъекции ЛЦ. Лентивирусные векторы любезно предоставлены д.б.н. Гужовой И.В. (ИНЦ РАН).

Интраназальное введение рекомбинантного белка Hsp70 человека (5 мг/10 мкл) выполняли крысам среднего возраста (n = 7) в динамике развития патологических признаков клинической стадии БП, т.е. в тот период, когда нейроны уже вступили на путь апоптоза вследствие дисфункции протеасом. Hsp70 вводили через 4 ч и 28 ч после каждой микроинъекции ЛЦ и 7 дней после второй микроинъекции ЛЦ. Из-за высокой консервативности (> 96 % (Günther et al., 1994)) аминокислотных последовательностей ортологов белка Hsp70 у человека и крысы в экспериментах использован белок Hsp70 человека. Для исследования проникновения интраназально введенного Hsp70, конъюгированного с флуорохромом Alexa555, в головной мозг и в ДА-ергические нейроны кЧС крыс (n = 4) декапитировали через 4 ч после введения Hsp70-Alexa555. Рекомбинантный Hsp70 и Hsp70-Alexa555 человека получены из лаб. защитных механизмов клетки ИНЦ РАН (зав. лаб. Гужова И.В.).

Индуктор белков теплового шока соединение U133 вводили внутривентрикулярно крысам среднего возраста ($n = 7$) в дозе 5 мг/кг через 4 ч и 24 ч после каждого введения ЛЦ, а также через 7 дней после последней микроинъекции ЛЦ в модели клинической стадии БП; крысам пожилого возраста ($n = 8$) – в дозе 5 мг/кг через 24 ч после каждого интраназального введения ЛЦ, а также через 7 дней после последнего введения ЛЦ в модели доклинической стадии БП. Соединение U133 любезно предоставлено с.н.с. лаб. органического синтеза природных соединений ТИБОХ ДВО РАН Полоником С.Г. (Полоник и др., 1994).

Тесты на моторное поведение проводили через 2 недели после последнего введения ЛЦ, в 11 ч утра, до кормления животных. Для оценки мелкой моторики губ, языка и передних конечностей применен тест с семенами подсолнечника (Gonzalez and Kolb, 2003), а для исследования нарушений в походке и координации движений – модифицированный тест «Суок» (Kalueff et al., 2008).

Декапитацию животных проводили через две недели после последнего введения ЛЦ. Для иммуногистохимического исследования головной мозг фиксировали в 4% растворе параформальдегида, переносили в 20% раствор сахарозы и замораживали в 2-метилбутане при -45°C . Для проведения Вестерн-блота из головного мозга выделяли дорсальный стриатум и кЧС по координатам атласа (Paxinos, Watson, 2007).

Вестерн-блот. Белки разделяли с помощью электрофореза в 11% полиакриламидном геле по Лэммли. Иммуномечение проводили с использованием первых моноклональных антител мыши к индуцибельному Hsp70 (клон 3C5 (Lasunskaia et al., 2010), любезно предоставлен г.н.с. лаб. защитных механизмов клетки ИИЦ РАН Б.А. Маргулисом) или GAPDH (1:1000; Abcam), поликлональных антител кролика к общему α -синуклеину или α -синуклеину (Ser129) (все 1:500; Abcam). В работе использованы вторые антитела осла к IgG мыши или козы к IgG кролика, конъюгированные с пероксидазой хрена (1:10000; Abcam). Пероксидазную реакцию выявляли методом усиленной хемилюминесценции с помощью раствора ECL (Invitrogen). Денситометрический анализ количества белка осуществляли с помощью программы ImageJ.

Для иммуногистохимического исследования на криостате Leica изготавливали срезы толщиной 10 мкм, содержащие стриатум и кЧС. Для подсчета количества выживших ДА-ергических нейронов в кЧС, аксонов в стриатуме, исследования содержания в нейронах кЧС скорость-лимитирующего фермента синтеза ДА тирозингидроксилазы (ТГ), везикулярного транспортера моноаминов 2 (ВТМА 2) и шаперона Hsp70, а также оценки количества активированных микроглиоцитов в кЧС применяли биотин-стрептавидиновый метод с использованием первых антител кролика против ТГ (1:1000; Abcam), ВТМА 2 (1:100; Sigma) или Iba-1 (маркер активированной микроглии; 1:500, Sigma), антител мыши против индуцибельного

Hsp70 (клон 3C5), вторых антител козы против IgG кролика или мыши, конъюгированных с биотином (1:400; Vector Lab.), и комплекса стрептавидин-пероксидаза (1:400; Vector Lab.). Реакцию визуализировали с помощью 0.05% раствора диаминобензидина (Sigma). Гистологические препараты изучали с помощью микроскопа Karl Zeiss (Imager A1). Изображения кЧС анализировали с помощью программы PhotoM, стриатума – с помощью программы ImageJ.

Конфокальная микроскопия. Срезы кЧС крыс, получавших микроинъекции ЛВК-LVTNM, инкубировали с первыми антителами кролика против ТГ и вторыми антителами козы против IgG кролика, конъюгированными с Alexa-568 (1:500; Sigma). Срезы кЧС крыс, получавших Hsp70-Alexa555, инкубировали с первыми антителами кролика против ТГ и вторыми антителами козы против IgG кролика, конъюгированными с Alexa-488 (1:500; Sigma). Для исследования влияния U133 на α -синуклеиновую патологию срезы кЧС инкубировали с первыми антителами кролика против общего или фосфорилированного по Ser129 α -синуклеина (все 1:500; Abcam) и вторыми антителами козы против IgG кролика, конъюгированными с Alexa-568 (1:500; Sigma), затем с первыми антителами мыши против ТГ (1:2000; Sigma) и вторыми антителами осла против IgG мыши, конъюгированными с Alexa-488 (1:500; Sigma). Анализ препаратов проводили на конфокальном микроскопе Leica TCS SL.

Метод ловушки на фильтре использовали для оценки количества агрегатов α -синуклеина в ткани кЧС. Исследование проводили совместно с сотрудниками лаб. защитных механизмов клетки (рук. д.б.н. Гужова И.В.) на базе ИНЦ РАН. Лизаты кЧС вносили в лунки аппарата для дот-блоттинга (BioRad) с дном из ацетатцеллюлозной мембраны (диаметр пор 0.22 мкм), соединенные с вакуумным насосом. При фильтрации растворимые клеточные белки проходят через поры мембраны, а нерастворимые белковые агрегаты в ней задерживаются. Иммуномечение мембраны проводили с использованием первых антител кролика к общему α -синуклеину (1:500; Abcam) и вторых антител козы к IgG кролика, конъюгированных с пероксидазой хрена (1:10000; Abcam).

Статистическую обработку результатов исследования выполняли в программе Statistica 7.0. Нормальность распределения проверяли с помощью теста Колмогорова-Смирнова. Анализ данных, имеющих распределение, отличное от нормального, проводили с помощью непараметрического критерия Краскела-Уоллиса; в качестве *post-hoc* критерия применен ранговый критерий Ньюмана-Кейлса. Статистическую обработку данных, распределенных нормально, выполняли с помощью дисперсионного анализа ANOVA с последующим *post-hoc* анализом с помощью критерия Тьюки HSD. Полученные результаты считались статистически значимыми при $p < 0.05$.

Результаты исследования и их обсуждение

1. Влияние нокдауна Hsp70 (*HSPA1*) в DA-ергических нейронах кЧС на показатели нейродегенерации и компенсаторные процессы в nigrostriатной системе в модели доклинической стадии БП у крыс среднего возраста

На первом этапе работы необходимо было выяснить, происходит ли при нокдауне стресс-индуцируемого Hsp70 в кЧС изменение патоморфологических и нейрохимических признаков, характерных для модели доклинической стадии БП.

Оценка эффективности работы лентивирусной конструкции ЛВК-shHsp70

На микрофотографиях кЧС (рис. 1 а), выполненных с помощью конфокального микроскопа, видно, что лентивирусный вектор, несущий ген зеленого флуоресцентного белка (ЛВК-LVTНМ), проникает в DA-ергические нейроны и интенсивно экспрессируется в них (зеленый сигнал), что указывает на высокую степень трансфекции нейронов лентивирусом при его введении в кЧС. Установлено, что трансфекция ЛВК-shHsp70 DA-ергических нейронов кЧС приводит через 14 дней к снижению на 64.8 % ($p < 0.05$) содержания Hsp70 в кЧС по сравнению с контролем (рис. 1 б).

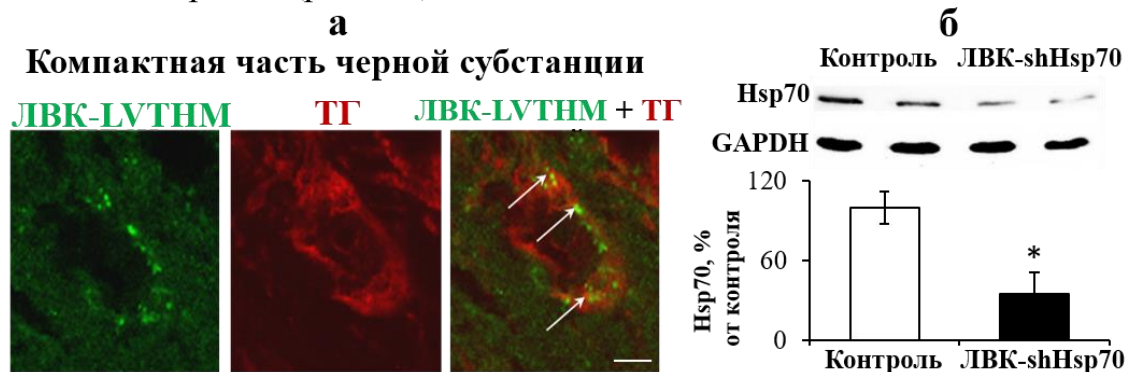


Рисунок 1. Трансфицированные ЛВК- LVTНМ DA-ергические нейроны кЧС (а; масштаб 5 мкм) и изменение содержания Hsp70 в кЧС через 14 дней после введения ЛВК-shHsp70 (б). Достоверность различий по сравнению с контролем * – $p < 0.05$.

Изменение показателей нейродегенерации, компенсаторных процессов в nigrostriатной системе и моторного поведения крыс в модели доклинической стадии БП в условиях нокдауна Hsp70

Для моделирования нейродегенеративной патологии nigrostriатной системы, характерной для БП, воспроизведена ранее разработанная в нашей лаборатории модель доклинической стадий БП у крыс среднего возраста, созданная с помощью микроинъекций в кЧС ингибитора протеасомной активности ЛЦ (Пастухов и др., 2010, 2011). Данная модель характеризуется развитием допорогового (по сравнению с клинической стадией) уровня нейродегенерации в nigrostriатной системе, о чем свидетельствует уменьшение на 30% ($p < 0.05$) количества DA-

ергических нейронов в кЧС, на 20% ($p < 0.05$) – их аксонов в дорсальном стриатуме и снижение на 18% ($p < 0.05$) содержания ВТМА 2 в нейронах кЧС (рис. 2). Изменений в моторном поведении у животных в этой модели БП не выявлено, что может быть следствием активации компенсаторных механизмов, способствующих поддержанию нормального уровня ДА в стриатуме и маскированию характерной для БП моторной симптоматики (Blesa et al., 2017).

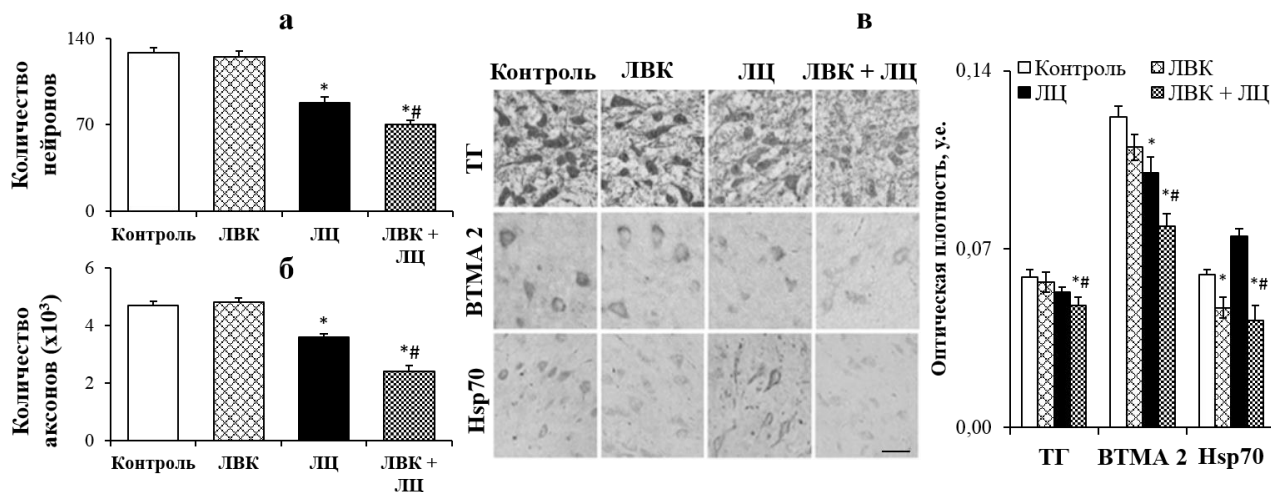


Рисунок 2. Изменение количества ДА-ергических нейронов в кЧС (а), ДА-ергических аксонов в стриатуме (б), содержания ТГ, ВТМА 2 и Нсп70 в нейронах кЧС (в) у крыс в модели доклинической стадии БП при микроинъекциях в кЧС ЛВК-Нсп70 (ЛВК). Масштаб 10 мкм. Достоверность различий в опыте относительно: контроля * – $p < 0.05$; ЛВК + ЛЦ # – $p < 0.05$.

Установлено, что введение ЛВК-shHsp70 в контрольных условиях не влияет на показатели нейродегенерации и содержание ТГ и ВТМА 2, что свидетельствует в пользу низкой токсичности лентивектора. В модели доклинической стадии БП снижение содержания Нсп70 в кЧС с помощью ЛВК-shHsp70 приводит к прогрессированию нейродегенерации в нигростриатной системе. Об этом свидетельствует возрастание числа погибших ДА-ергических нейронов в кЧС и их аксонов в стриатуме до 50% ($p < 0.05$). При этом отмечается снижение содержания ТГ, ВТМА 2 и шаперона Нсп70 в нейронах кЧС, что свидетельствует об ослаблении компенсаторных и нейропротективных процессов (рис. 2). Эти изменения сопряжены с появлением у крыс симптомов моторной дисфункции, на что указывает сокращение в 1.3 раза ($p < 0.05$) количества съеденных крысой семечек подсолнечника и увеличение в 2 раза ($p < 0.05$) количества соскальзываний лапок с планки в тесте “Суок” по сравнению животными, получавшими только ЛЦ. В совокупности такие изменения характерны для клинической стадии БП. Прогрессирование патологического фенотипа вследствие наличия мутаций в АТФ-связывающем домене Нсп70 отмечено и другими авторами в модели α -синуклеиновой патологии у *Drosophila sp.* (Auluck et al., 2002).

Таким образом, снижение содержания индуцибельного Нсп70 в нейронах кЧС с помощью РНК-интерференции в модели доклинической стадии БП у крыс

ускоряет переход нейрпатологического процесса на следующую, клиническую стадию БП, для которой характерно развитие обширной дегенерации нигростриатной системы и ослабление компенсаторных механизмов мозга, что приводит к появлению моторных нарушений.

2. Исследование возрастных особенностей в проявлении нейродегенерации и развитии компенсаторных процессов в нигростриатной системе в модели доклинической стадии БП у крыс

Следующей моделью, которая могла бы дополнительно подтвердить важную роль Hsp70 в механизмах нейропротекции и пластичности мозга, является старение. У людей и животных старение ассоциировано со снижением экспрессии и содержания в нервных клетках Hsp70 и других шаперонов (Morimoto, 2008; Hindle, 2010). Поэтому мы поставили перед собой цель выяснить, сопряжены ли возрастные изменения в нейродегенеративных и компенсаторных процессах в DA-ергической нигростриатной системе с содержанием Hsp70 в нейронах кЧС при моделировании доклинической стадии БП у крыс.

Изменение содержания Hsp70 в нейронах кЧС у крыс разных возрастных групп при моделировании доклинической стадии БП

Выяснено, что в контрольных условиях содержание Hsp70 в нейронах кЧС у крыс пожилого возраста снижено на 14% ($p < 0.05$) по сравнению с животными молодого и среднего возрастов (рис. 3 а). Сходные результаты показаны у других грызунов, приматов, а также людей преклонного возраста (Hindle, 2010). При моделировании доклинической стадии БП содержание Hsp70 в кЧС у крыс молодого и среднего возрастов возрастает в среднем на 40% ($p < 0.05$), а у пожилых крыс наблюдается незначительный прирост уровня Hsp70 в пределах 15% по сравнению с контролем того же возраста (рис. 3 а), что указывает на ослабление мобилизации Hsp70-зависимого шаперонного механизма при старении. Причиной уменьшения синтеза индуцибельного Hsp70 может быть возрастное снижение активности транскрипционного фактора теплового шока HSF1, запускающего транскрипцию гена Hsp70 в ответ на повреждение белков клетки при действии цитотоксических факторов (Chesnokova et al., 2019).

Изменение показателей нейродегенерации, DA-ергических компенсаторных процессов в нигростриатной системе и моторного поведения у крыс разных возрастных групп при моделировании доклинической стадии БП

В контрольных условиях количество DA-ергических нейронов в кЧС и аксонов в стриатуме у пожилых крыс на 17% ($p < 0.05$) (рис. 3 б) и 16% ($p < 0.05$) меньше по сравнению с крысами молодого возраста. Следовательно, по мере старения крыс DA-ергические нейроны и аксоны подвергаются нейродегенерации, что

согласуется с данными, полученными при исследовании образцов ткани кЧС *post-mortem* у обезьян (Emborg et al., 1998) и людей (Cabello et al., 2002).

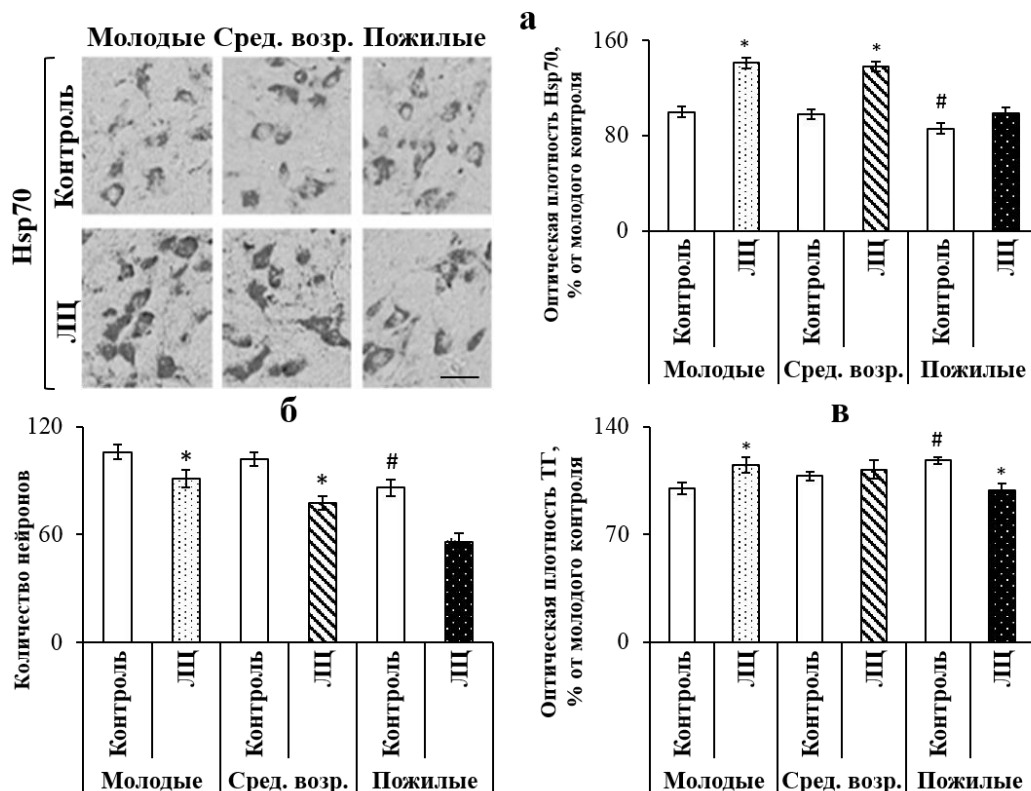


Рисунок 3. Изменение содержания Hsp70 в нейронах кЧС (а), количества DA-ергических нейронов в кЧС (б) и содержания в них ТГ (в) в модели доклинической стадии БП у крыс молодого, среднего и пожилого возрастов. Масштаб 10 мкм. Достоверность различий в опыте относительно: соответствующего возрастного контроля * – $p < 0.05$; пожилого контроля по сравнению молодым # – $p < 0.05$.

После введения ЛЦ количество выживших нейронов в кЧС уменьшается на 14% ($p < 0.05$) у молодых, на 24% ($p < 0.05$) в среднем возрасте и на 35% ($p < 0.05$) у пожилых крыс (рис. 3 б), а количество аксонов в стриатуме – на 14% ($p < 0.05$) у крыс среднего возраста и на 21% ($p < 0.05$) у пожилых крыс по сравнению с соответствующими по возрасту контролями, что указывает на ослабление резистентности nigrostriatной системы к токсическому действию ЛЦ при старении. Кроме того, в отличие от крыс молодого и среднего возрастов, у которых в кЧС наблюдается компенсаторное возрастание ТГ и ВТМА 2 в ответ на ЛЦ-индуцированную нейродегенерацию, у пожилых крыс после введения ЛЦ уровни ТГ (рис. 3 в) и ВТМА 2 оказались ниже контрольных значений. Это может указывать на ослабление компенсаторных реакций у пожилых крыс при моделировании доклинической стадии БП, из-за чего происходит развитие дефицита ДА в nigrostriatной системе и появление у пожилых крыс нарушений в тонкой моторике передних конечностей, рта и языка в ответ на действие ЛЦ, чего не наблюдается у модельных животных молодого и среднего возрастов. Сходные данные о прогрессировании ЛЦ-опосредованной нейродегенеративной патологии с возрастом показаны в исследовании, выполненном на мышах разных возрастов (Savolainen et al., 2017).

Возрастные особенности проявления α -синуклеиновой патологии в ДА-ергических нейронах кЧС у крыс в модели доклинической стадии БП

Одной из причин прогрессии нейродегенерации при БП в пожилом возрасте может являться усиление процесса агрегации белка α -синуклеина. Действительно, нами установлено, что при старении у крыс в модели БП ускоряется патологическое агрегирование α -синуклеина, о чем свидетельствует наличие многочисленных телец Леви, содержащих более крупные агрегаты белка α -синуклеина, по сравнению с агрегатами у крыс среднего возраста (рис. 4). У пожилых пациентов с БП *postmortem* в нейронах кЧС также обнаруживаются агрегаты α -синуклеина больших размеров (Hindle, 2010). Усиление агрегирования α -синуклеина может происходить вследствие возрастного снижения экспрессии шаперонов и ослабления активности УПС (Klaips et al., 2018).

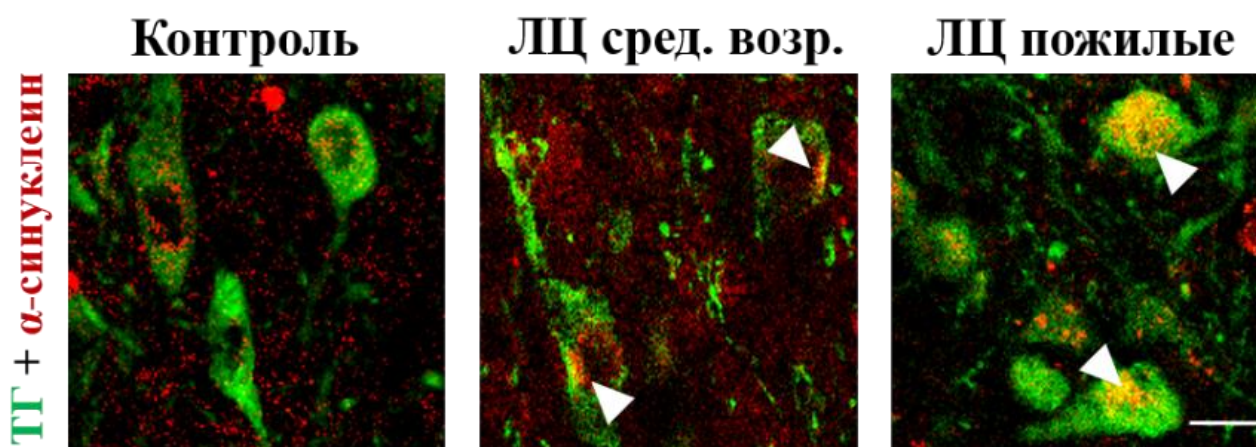


Рисунок 4. Конфокальная микроскопия препаратов кЧС при моделировании доклинической стадии БП у крыс среднего (сред.возр.) и пожилого возраста. TH – зеленый сигнал; α -синуклеин – красный сигнал. Стрелками показаны агрегаты α -синуклеина. Масштаб 10 мкм.

Таким образом, возрастное снижение содержания индуцибельного Hsp70 в нейронах кЧС в модели доклинической стадии БП у пожилых крыс способствует формированию более крупных агрегатов α -синуклеина в нейронах кЧС, прогрессии нейродегенерации и ослаблению компенсаторных механизмов в нигростриатной системе, что приводит к появлению нарушений в тонкой моторике. В совокупности результаты первых двух этапов работы указывают на то, что шаперон Hsp70 является ключевой молекулой, сдерживающей развитие характерной для БП нейродегенеративной патологии в кЧС. Снижение содержания Hsp70 в нейронах является одной из причин прогрессии нейродегенерации и патологических признаков, характерных для модели БП у крыс. Следовательно, для выживания ДА-ергических нейронов при развитии Паркинсон-подобной патологии требуется увеличение внутриклеточного содержания Hsp70.

3. Исследование защитных эффектов белка теплового шока Hsp70 при его интраназальном введении в модели клинической стадии болезни Паркинсона у крыс среднего возраста

Полученные в предыдущих разделах работы результаты явились фундаментальным обоснованием для изучения нейропротективных свойств шаперона Hsp70 в модели БП. Поэтому задачей следующего этапа исследования стало выяснить, способно ли повышение содержания Hsp70 в головном мозге ослабить процесс нейродегенерации и уменьшить проявления моторной дисфункции в модели клинической стадии БП у крыс среднего возраста.

Исследование способности рекомбинантного Hsp70, введенного интраназально, проникать в DA-ергические нейроны кЧС в модели клинической стадии БП

Через 4 ч после интраназального введения меченый флуоресцентной меткой Hsp70 обнаруживается в DA-ергических нейронах кЧС (рис. 5 а) и нейронах сенсомоторной коры при моделировании клинической стадии БП у крыс. Проникновение интраназально введенного Hsp70 в нейроны обонятельных луковиц, неокортекса и гиппокампа отмечено и другими авторами в модели болезни Альцгеймера у мышей (Bobkova et al., 2014). Известно, что Hsp70 может связываться с кислыми липидами плазматической мембраны (Arispe et al., 2002) или мембранными рецепторами (Lox-1, CD40, SREC1) (Calderwood et al., 2007), что способствуют его внутриклеточной интернализации. KST-домен, расположенный на поверхности Hsp70, может отвечать за проникновение этого белка в клетки, т.к. он способен взаимодействовать с отрицательно-заряженными участками билипидного слоя и переносить Hsp70 сквозь мембрану (Komarova et al., 2015).

Влияние интраназального введения Hsp70 на показатели нейродегенерации, компенсаторные процессы в нигростриатной системе и моторное поведение крыс среднего возраста в модели клинической стадии БП

На данном этапе работы воспроизведена модель клинической стадии БП у крыс среднего возраста (Пастухов и др., 2014), для которой характерно уменьшение на 62% ($p < 0.05$) количества DA-ергических нейронов в кЧС и на 68% ($p < 0.05$) – аксонов в стриатуме, снижение содержания ТГ на 20% ($p < 0.05$) и ВТМА 2 на 23% ($p < 0.05$) в нейронах кЧС по сравнению с контрольной группой животных (рис. 5 б, в, г). Деструктивные и нейрохимические изменения в нигростриатной системе сопряжены с развитием сенсомоторного дефицита конечностей и с нарушениями в координации движений и в мелкой моторике передних конечностей, рта и языка.

Курсовое интраназальное введение Hsp70 модельным животным существенно ослабляет развитие нейродегенеративного процесса в nigростриатной системе до уровня доклинической стадии БП, о чем свидетельствует возрастание в 2 раза ($p < 0.05$) количества выживших ДА-ергических нейронов в кЧС и в 2.4 раза ($p < 0.05$) – аксонов в стриатуме по сравнению с действием ЛЦ (рис. 5 б, в). При этом в выживших нейронах кЧС экзогенный Hsp70 восстанавливает до контрольных значений уровень ТГ (рис. 5 г), что указывает на повышение их функциональной активности. Эти изменения сопряжены с нормализацией моторного поведения.

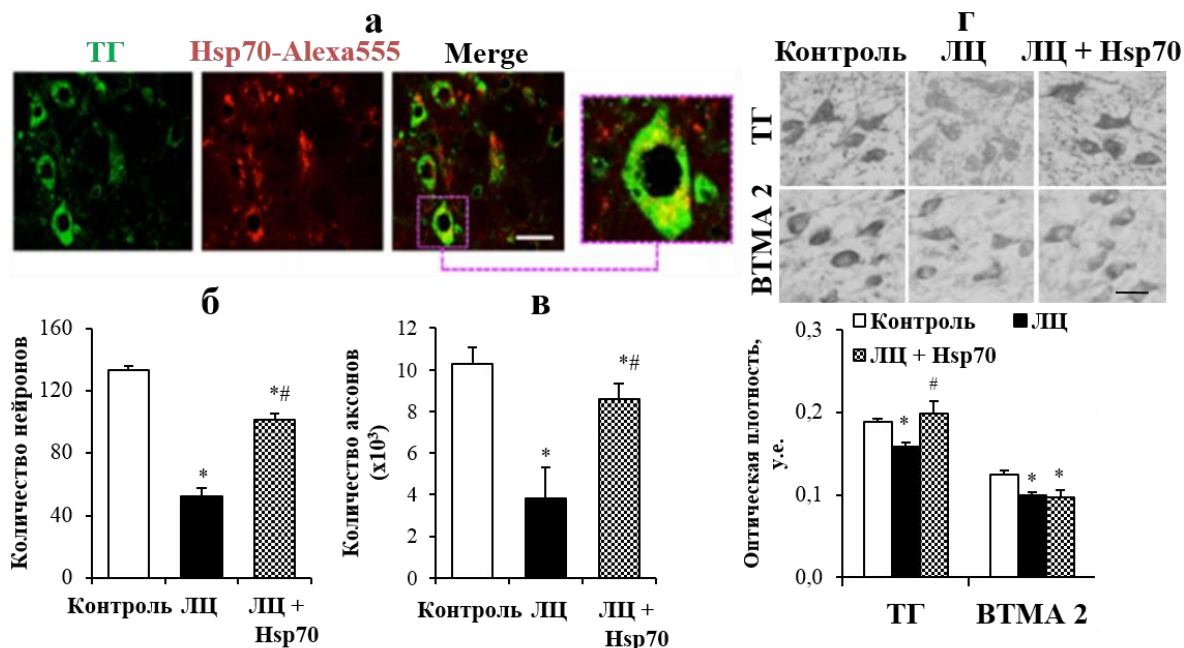


Рисунок 5. Проникновение меченого флуоресцентным красителем Hsp70 (Hsp70-Alexa555; красный сигнал) в ДА-ергические нейроны кЧС (ТГ, зеленый сигнал) при интраназальном введении (а), изменение количества ДА-ергических нейронов в кЧС (б), ДА-ергических аксонов в стриатуме (в), содержания ТГ, и ВТМА 2 в нейронах кЧС (г) у крыс в модели клинической стадии БП при интраназальном введении Hsp70. Масштаб 10 мкм. Достоверность различий в опыте относительно: контроля * – $p < 0.05$; ЛЦ + Hsp70 по сравнению с действием ЛЦ # – $p < 0.05$.

Полученные нами результаты согласуются с данными литературы, где показано, что повышение экспрессии Hsp70 с помощью аденовектора предотвращает развитие нейродегенерации в nigростриатной системе и ассоциированное с ней снижение ДА в стриатуме в МФТП-модели БП у мышей (Dong et al., 2005). Таким образом, увеличение содержания Hsp70 в кЧС с помощью его интраназального введения ослабляет процесс нейродегенерации в nigростриатной системе до уровня доклинической стадии БП и способствует частичной активации механизмов, направленных на компенсацию функциональной недостаточности ДА-ергических нейронов, а также препятствует проявлению симптомов моторной дисфункции в модели клинической стадии БП у крыс среднего возраста. Полученные факты указывают на нейропротективную значимость повышения уровня белка Hsp70 в кЧС при развитии Паркинсон-подобной патологии.

4. Исследование нейропротективного потенциала индуктора шаперонов U133 в моделях доклинической и клинической стадий БП у крыс

Повышения содержания Hsp70 в ЦНС можно достичь с помощью фармако-терапии, нацеленной на индукцию его синтеза. В связи с этим следующей задачей исследования стала оценка терапевтического потенциала малой молекулы, индуктора индуцибельных форм шаперонов соединения U133. U133 является производным эхинохрома, основного пигмента морских ежей. Протективный эффект U133 продемонстрирован в экспериментах с клеточными линиями человека, подверженными окислительному стрессу (Lazarev et al., 2016), однако исследования его нейропротективных свойств в модели БП ранее не проводилось.

Влияние U133 на показатели нейродегенерации, компенсаторные процессы в ДА-ергической nigростриатной системе и моторное поведение в модели клинической стадии БП у крыс среднего возраста

Через 24 ч после введения U133 крысам среднего возраста содержание Hsp70 возрастает в 4 раза в кчЧС ($p < 0.01$), и в 3.1 раза – в стриатуме ($p < 0.01$). U133 не вызывает деструктивных изменений в кчЧС и не влияет на уровень ТГ и ВТМА 2. Терапия с U133 в модели клинической стадии БП у крыс среднего возраста приводит к возрастанию в 2.3 раза ($p < 0.05$) количества выживших ДА-ергических нейронов в кчЧС, восстанавливает до контрольного уровня ($p < 0.05$) количество ТГ-позитивных аксонов в стриатуме и предотвращает снижение уровней ТГ, ВТМА2 и Hsp70, характерное для клинической стадии БП (рис. 6), что сопровождается нормализацией моторного поведения крыс.

Полученные данные свидетельствуют о нейропротективных свойствах соединения U133 и о способности U133 усиливать компенсаторные процессы в nigростриатной системе при моделировании клинической стадии БП у крыс среднего возраста.

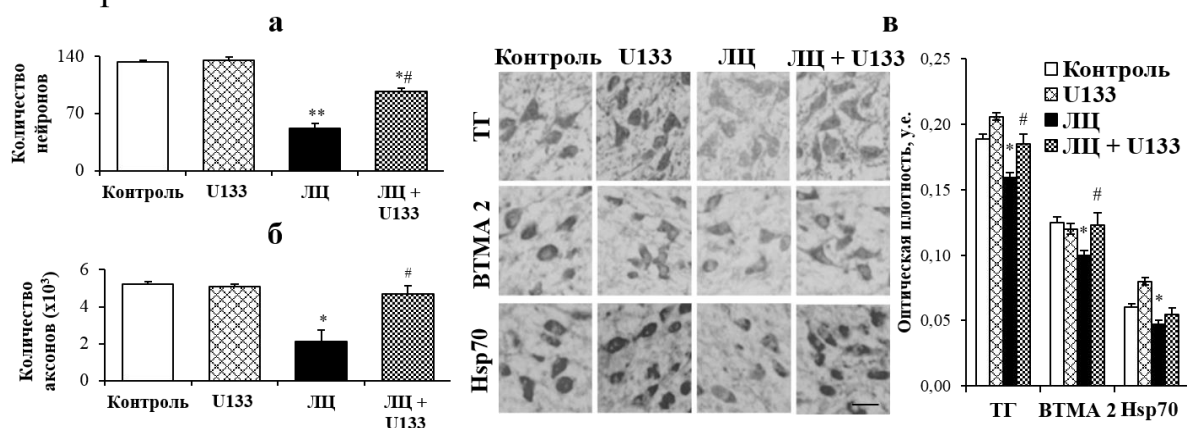


Рисунок 6. Изменение количества ДА-ергических нейронов в кчЧС (а), ДА-ергических аксонов в стриатуме (б), содержания ТГ, ВТМА 2 и Hsp70 в нейронах кчЧС (в) у крыс среднего возраста в модели клинической стадии БП при терапии с U133. Масштаб 10 мкм. Достоверность различий в опыте относительно: контроля * – $p < 0.05$; ЛЦ + U133 по сравнению с действием ЛЦ # – $p < 0.05$.

*Влияние U133 на морфологические показатели нейродегенерации
в nigростриатной системе в модели доклинической стадии БП
у крыс пожилого возраста*

При старении у человека и животных снижается экспрессия и синтез Hsp70 и других шаперонов, обладающих нейропротективными свойствами (Morimoto, 2008; Kim et al., 2013; Chesnokova et al., 2019), поэтому важно оценить эффективность терапии с препаратом U133 при моделировании БП у пожилых животных. Установлено, что, в отличие от животных среднего возраста, у пожилых крыс возрастание содержания Hsp70 в кчЧС и стриатуме происходит лишь на 7 сутки после однократного введения U133 (рис. 7 а), что может быть связано с возрастным снижением активности транскрипционного фактора HSF1 и скорости экспрессии генов Hsp70 (Chesnokova et al., 2019).

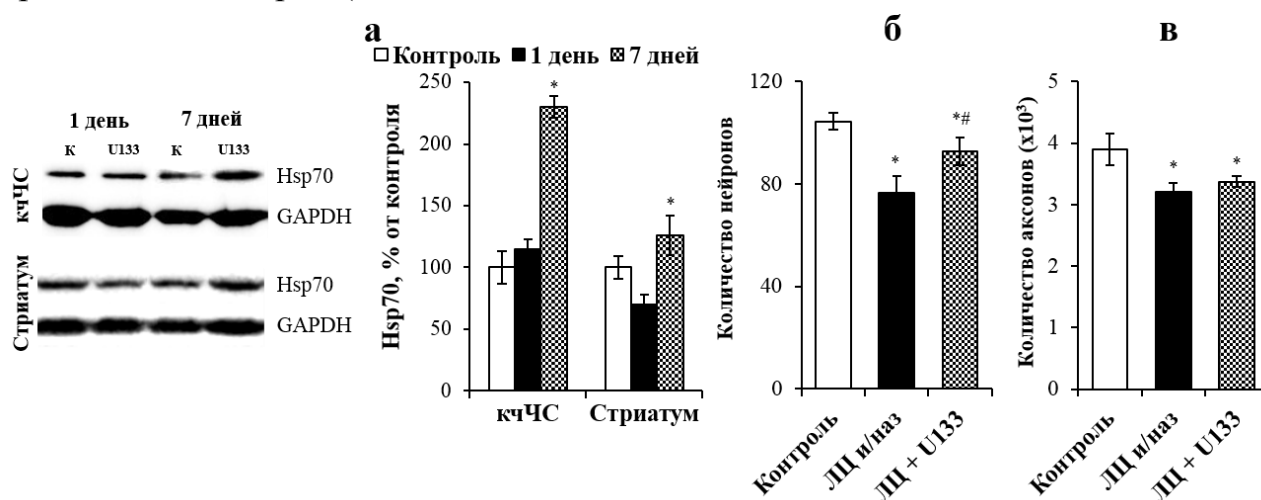


Рисунок 7. Изменение содержания Hsp70 в кчЧС и стриатуме у пожилых крыс через 1 и 7 дней после внутрибрюшинного введения контрольного раствора или U133 в дозе 5 мг/кг (а), изменение количества ДА-ергических нейронов в кчЧС (б) и аксонов в стриатуме (в) у пожилых крыс в модели доклинической стадии БП при терапии с U133. Достоверность различий в опыте относительно: контроля * – $p < 0.05$; ЛЦ + U133 по сравнению с действием ЛЦ # – $p < 0.05$.

Модель доклинической стадии БП у пожилых крыс, основанная на интраназальном введении ЛЦ, характеризуется уменьшением на 27% ($p < 0.05$) количества ТГ-позитивных нейронов в кчЧС и на 18% ($p < 0.05$) – их аксонов в стриатуме по сравнению с контролем (рис. 7 б, в). Терапия с помощью U133 приводит к ослаблению нейродегенерации в ДА-ергической nigростриатной системе, на что указывает увеличение в 2.4 раза количества выживших ДА-ергических нейронов в кчЧС (рис. 7 б). Таким образом, несмотря на возрастное ослабление молекулярных механизмов мобилизации шаперона Hsp70 в головном мозге, фармакологическая активация синтеза Hsp70 с помощью U133 в модели доклинической стадии БП у пожилых крыс оказывает нейропротективный эффект в nigростриатной системе, которая наиболее подвержена деструктивным изменениям при БП.

5. Влияние препарата U133 на α -синуклеиновую патологию и микроглиоз в кЧС крыс при моделировании БП

Основным морфологическим признаком БП является формирование в нервных клетках токсичных агрегатов белка α -синуклеина, вызывающих гибель нейронов головного мозга (Пчелина, Емельянов, 2014). Одной из основных патологических модификаций α -синуклеина является его фосфорилирование по Ser129, которое может влиять на растворимость этого белка и способствовать его патогенной агрегации (Rocha et al., 2018). Другим характерным признаком БП является развитие хронического нейровоспалительного процесса в кЧС и других областях головного мозга (Béraud et al., 2013). Поэтому на следующем этапе исследования мы изучили влияние индуктора Hsp70 малой молекулы U133 на α -синуклеиновую патологию и нейровоспалительный процесс в кЧС у крыс в модели БП.

Влияние U133 на α -синуклеиновую патологию в кЧС при моделировании БП у крыс

В модели БП у крыс содержание общей водорастворимой формы α -синуклеина возрастает в 1.4 раза ($p < 0.01$), а фракция фосфорилированного α -синуклеина (Ser129) увеличивается в 2.9 раза ($p < 0.01$) по сравнению с контролем (рис. 8 а). Это сопровождается формированием в нейронах кЧС патологических белковых агрегатов, иммунореактивных как к общей, так и к фосфорилированной по Ser129 формам α -синуклеина (рис. 8 в), что свидетельствует о переходе α -синуклеина в патологическую форму и его агрегации в модели БП у крыс.

При терапии с U133 количество общего растворимого α -синуклеина в кЧС имеет тенденцию к возрастанию, однако фосфорилированная форма α -синуклеина (Ser129) снижается до контрольных значений. С помощью конфокальной микроскопии показано, что терапия с U133 приводит к сокращению количества агрегатов α -синуклеина в ДА-ергических нейронах кЧС, что может указывать на способность Hsp70 разбирать сформировавшиеся агрегаты α -синуклеина (рис. 8 а, в). Важным доказательством дезагрегационной активности Hsp70 также являются результаты количественного биохимического анализа (метод ловушки на фильтре), в которых подтверждено, что терапия с U133 приводит к снижению количества агрегатов белка α -синуклеина в кЧС крыс в модели БП через 21 день после первого введения ЛЦ (рис. 8 б).

Сходные данные о способности Hsp70 взаимодействовать с уже сформировавшимися агрегатами α -синуклеина были получены на клеточной культуре человека (McLean et al., 2004). Установлено, что комплекс, состоящий из Hsp70, ко-шаперона Hsp40 и фактора обмена нуклеотидов HSP110, способен к быстрому (в течение нескольких минут) АТФ-зависимому разрушению агрегатов α -синуклеина до нетоксичных мономеров (Gao et al., 2015).

Таким образом, фармакологическая активация синтеза Hsp70 с помощью U133 снижает содержание фосфорилированной формы α -синуклеина и количество агрегатов α -синуклеина в нейронах кЧС в модели БП у крыс.

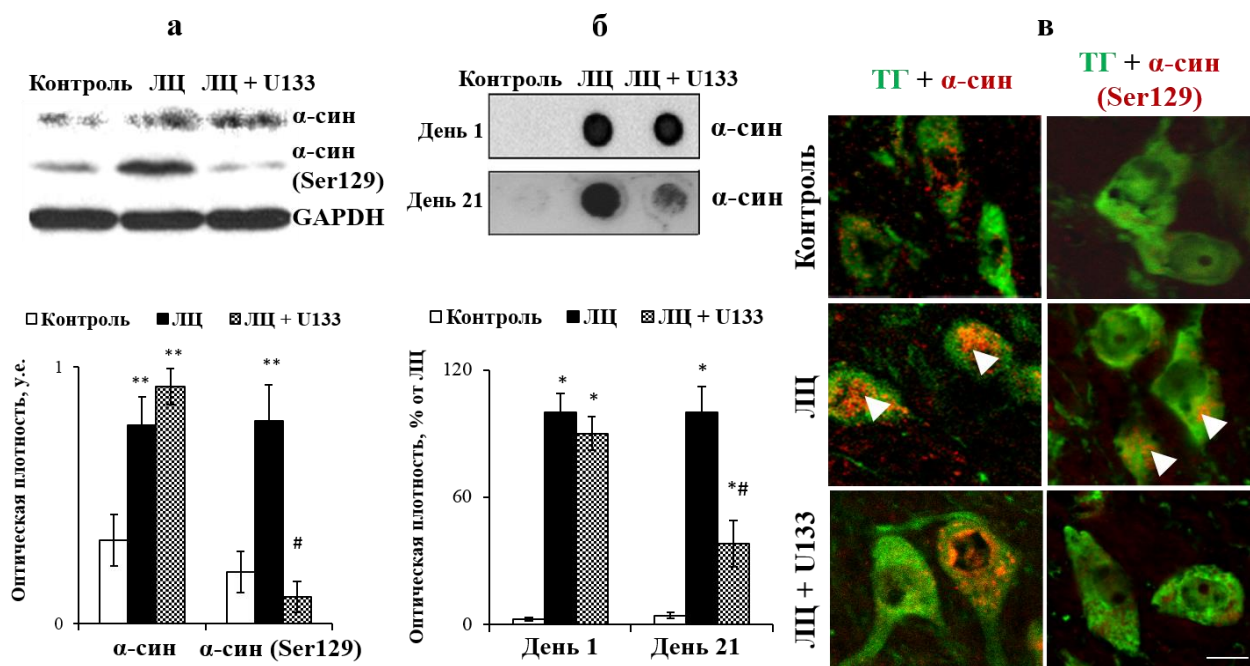


Рисунок 8. Содержание общего α -синуклеина (α -син) и его фосфорилированной по Ser129 фракции (α -син (Ser129)) в кЧС (а), изменение количества агрегатов α -синуклеина в кЧС (б) и конфокальная микроскопия α -син и α -син (Ser129) в DA-ергических нейронах кЧС (в) в модели БП у крыс при терапии с U133. Справа: ТГ – зеленый сигнал, α -син или α -син (Ser129) – красный сигнал; масштаб 5 мкм. Стрелками показаны агрегаты α -син или α -син (Ser129). Достоверность различий в опыте относительно: контроля * – $p < 0.05$, ** – $p < 0.01$; ЛЦ + U133 по сравнению с действием ЛЦ # – $p < 0.05$.

Влияние U133 на микроглиоз в модели БП у крыс

Хроническое нейровоспаление в nigrostriatalной системе – патогенетический признак БП (Végaud et al., 2013). Оно способствует развитию и поддержанию процесса нейродегенерации и проявляется возрастанием количества активированных микроглиоцитов. Установлено, что в модели доклинической стадии БП у крыс происходит развитие нейровоспалительного процесса в nigrostriatalной системе. На это указывает повышение количества активированных микроглиоцитов в кЧС на 47% ($p < 0.01$) по сравнению с контролем. Терапия с U133 уменьшает в 2.2 раза реактивный микроглиоз в кЧС, что свидетельствует о противовоспалительном действии U133. Противовоспалительный эффект Hsp70 связывают с его негативным влиянием на экспрессию транскрипционного фактора STAT3, активирующего транскрипцию провоспалительных цитокинов, и ингибированием JNK- и NF- κ B-опосредованного сигналинга (Guzhova et al., 1997; Yu et al., 2018). Кроме этого, Hsp70 может выступать в роли цитокина, модулируя функциональную активность макрофагов, в том числе микроглиоцитов, при взаимодействии с рецепторами на их поверхности (CD14, CD91, Lox-1 и др.) (Asea et al., 2000; Calderwood et al., 2007).

Полученные результаты подтверждают терапевтическую значимость индукции Hsp70 для замедления БП-подобной нейродегенерации и восстановления функции выживших нейронов. Отечественный препарат U133 имеет реальную перспективу для апробации в профилактической и превентивной терапии БП как в среднем возрасте, так и при старении.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Основные итоги выполненной работы

В работе экспериментально доказано, что снижение содержания стресс-индуцируемого шаперона Hsp70 в ДА-ергических нейронах кЧС в модели доклинической стадии БП у крыс среднего возраста способствует прогрессии нейродегенерации и переходу нейropатологических симптомов от доклинической стадии БП к клинической, для которой характерно развитие обширной нейродегенерации в нигростриатной системе и появление моторных нарушений. Сходные данные о прогрессивном характере гибели ДА-ергических нейронов получены при моделировании доклинической стадии БП у крыс при старении. Продемонстрированная возрастная утрата компенсаторных механизмов, основанных на нейропротективных свойствах Hsp70, может являться одной из причин быстрой прогрессии БП у лиц пожилого возраста. Таким образом, результаты, полученные в первой части работы, свидетельствуют, что шаперон Hsp70 является ключевой молекулой, сдерживающей развитие БП-подобной нейродегенеративной патологии в кЧС. Полученные данные стали фундаментальным обоснованием для изучения нейропротективных свойств шаперона Hsp70 в моделях БП.

Показано, что повышение содержания Hsp70 в нейронах кЧС при развитии клинической стадии БП путем его интраназального введения или с помощью соединения U133 замедляет переход процесса нейродегенерации от доклинической стадии, в которой сохраняются компенсаторные и нейропротективные резервы нигростриатной системы, к клинической стадии БП, для которой характерно истощение этих резервов. Временная отсрочка проявления симптомов клинической стадии признается перспективной целью современной фармакологической стратегии лечения БП (Угрюмов, 2014). Сопоставление с ранее полученными данными (Пастухов и др., 2011) позволяет предположить, что гибель ДА-ергических нейронов замедляется благодаря увеличению содержания Hsp70 в тех нейронах, в которых оно было частично или полностью утрачено. Полученные результаты могут стать научным обоснованием разработки новой молекулярной технологии терапии БП, основанной на препаратах или индукторах Hsp70 и направленной на поддержание высокого нейропротективного потенциала шаперонов в головном мозге.

В работе установлено, что фармакологическая активация транскрипционного фактора HSF1 с помощью малой молекулы U133 способна вызывать Hsp70-индуцирующий ответ в основных регионах головного мозга, вовлеченных в патогенез

БП, как у крыс среднего возраста, так и у пожилых животных, несмотря на возрастное ослабление молекулярных механизмов мобилизации шаперонов в стареющем мозге. В результате увеличения содержания Hsp70 замедляется прогрессирование нейродегенерации в nigростриатной системе и улучшается функциональная активность выживших нейронов в моделях БП у крыс среднего и пожилого возраста. Нейропротективный эффект U133, обусловленный повышением Hsp70, связан со способностью шаперона разбирать агрегаты α -синуклеина, снижать содержание фосфорилированной формы α -синуклеина и ослаблять нейровоспаление в кЧС. В совокупности полученные факты свидетельствуют о терапевтическом потенциале соединения U133 при развитии Паркинсон-подобной патологии.

Рекомендации и перспективы дальнейшей разработки темы

Во всем мире отмечается рост числа хронических нейродегенеративных заболеваний, к которым, помимо БП, относятся болезнь Альцгеймера, хорей Гентингтона, амиотрофический латеральный склероз и др. В нашем исследовании и в работах других авторов установлено, что стресс-индуцируемый Hsp70 является ключевым «защитником» нервных клеток от нейротоксических факторов при развитии болезней этого типа (Sun et al., 2018; Gupta et al., 2020). Нами показано, что нейропротективный потенциал Hsp70 обусловлен его дезагрегационной и противовоспалительной активностями. Тем не менее, при моделировании БП повышенный уровень водорастворимой неагрегированной формы α -синуклеина в кЧС крыс сохраняется. Это указывает на то, что для полноценной терапии α -синуклеиновой патологии при БП нужен комплексный подход, нацеленный как на молекулярные механизмы, противодействующие образованию конформационно дефектных белков (активация шаперонной системы белков теплового шока), так и на механизмы их утилизации (использование активаторов протеасом и шаперон-опосредованной аутофагии). Известно, что шаперон Hsp70 проявляет антиапоптозную активность, поддерживает нормальную работу УПС и лизосом (Ghosh et al., 2011; Kim et al., 2013), поэтому интересным также представляется изучение вклада этих функций Hsp70 в реализацию его нейропротективных эффектов в моделях БП у крыс.

В настоящее время активно изучаются нейропротективные свойства различных природных молекул (селастрол, гелданамицин и т.д.), вызывающих повышение содержания в нервных клетках стресс-индуцируемого Hsp70 и других белков теплового шока. Однако практически все изученные индукторы обладают нежелательными побочными эффектами (например, гепатотоксичностью). Это ограничивает их применение в клинической практике, поэтому поиск безопасных индукторов шаперонов для лечения нейродегенеративных заболеваний активно продолжается. В связи с этим перспективным представляется дальнейшее изучение нейропротективных свойств малой молекулы U133 на других моделях БП, в которых нарушение функции убиквитин-протеасомной системы не является первичным.

ВЫВОДЫ

1. Снижение содержания стресс-индуцируемого белка Hsp70 в дофамин (ДА)-ергических нейронах компактной части черной субстанции (кЧС) при моделировании доклинической стадии БП у крыс среднего возраста вызывает усиление нейродегенерации в нигростриатной системе, ослабление компенсаторных процессов, направленных на поддержание нормального уровня ДА, и развитие моторной дисфункции, характерной для клинической стадии БП. Полученные данные свидетельствуют о вовлечении шаперона Hsp70 в молекулярные механизмы нейропротекции и поддержания функции сохранившихся ДА-ергических нейронов при развитии Паркинсон-подобной патологии.
2. Возрастное снижение уровня Hsp70 в нейронах кЧС в модели доклинической стадии БП у пожилых крыс сопряжено с более высокой подверженностью нигростриатной системы к нейродегенерации, с более выраженным снижением активности нейрохимических процессов, направленных на компенсацию функциональной недостаточности ДА-ергической системы, и с появлением признаков моторного дефицита по сравнению с животными молодого и среднего возраста в модели БП. Эти данные указывают на то, что возрастное ослабление синтеза Hsp70 является одним из молекулярных механизмов прогрессирования Паркинсон-подобной патологии в стареющем мозге.
3. Повышение содержания Hsp70 в ДА-ергических нейронах кЧС путем его интраназальной доставки в мозг увеличивает количество выживших ДА-ергических нейронов в кЧС и их аксонов в дорсальном стриатуме, способствует активации компенсаторных процессов в нигростриатной системе и препятствует развитию моторных феноменов при моделировании клинической стадии БП у крыс среднего возраста. По совокупности показателей Hsp70 предотвращает переход патологических признаков БП от доклинической к клинической стадии.
4. Проведение терапии препаратом U133, индуцирующим экспрессию белка теплового шока Hsp70 в головном мозге, в моделях доклинической и клинической стадий БП у крыс среднего и пожилого возраста ослабляет развитие нейродегенеративного процесса в ДА-ергической нигростриатной системе, усиливает функцию сохранившихся нейронов и продлевает период доклинической стадии БП. Полученные данные подтверждают нейропротективную значимость фармакологической индукции синтеза шаперонов в головном мозге при Паркинсон-подобной патологии.
5. Защитный эффект соединения U133 в моделях БП у крыс реализуется через повышение содержания Hsp70 в нигростриатной системе, что приводит к уменьшению количества агрегатов α -синуклеина, содержания фосфорилированной по Ser129 формы белка α -синуклеина и реактивного микроглиоза в кЧС.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в рецензируемых журналах

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 // Докл. Акад. Наук. 2014. 457 (6): 724–727.
2. Екимова И.В., **Плаксина (Белан) Д.В.**, Гужова И.В., Мешалкина Д.А. Роль индуцибельного белка Hsp70 в развитии нейродегенеративной патологии nigrostriатной системы, характерной для болезни Паркинсона // Журн. Эвол. Биохим. Физиол. 2016. 52 (1): 73-75.
3. Екимова И.В., **Плаксина (Белан) Д.В.** Влияние кверцетина на нейродегенеративные и компенсаторные процессы в nigrostriатной системе в модели преклинической стадии болезни Паркинсона у крыс // Рос. Физиол. Журн. им. И. М. Сеченова. 2016. 102 (6): 647-658.
4. Екимова И.В., **Плаксина (Белан) Д.В.**, Никотина А.Д., Пази М.Б. Индуктор шаперонов U133 в стратегии нейропротективной терапии при болезни Паркинсона: экспериментальное исследование // Ассиметрия. 2018.12 (4): 192–203.
5. **Плаксина (Белан) Д.В.**, Екимова И.В. Возрастные особенности альфа-синуклеиновой патологии в головном мозге при моделировании доклинической стадии болезни Паркинсона у крыс // Рос. Физиол. Журн. им. И. М. Сеченова. 2018. 104 (6): 709–716.
6. **Плаксина (Белан) Д.В.**, Екимова И.В. Исследование возрастных изменений в компенсаторных процессах на модели нейродегенерации nigrostriатной системы у крыс // Усп. Геронтол. 2018. 31(2): 170-177.
7. Екимова И.В., **Плаксина (Белан) Д.В.**, Калинин Р.С. Возрастные особенности резистентности nigrostriатной системы при протеасомной дисфункции у крыс // Ж. Эвол. Биохим. Физиол. 2018. 54(6): 443-446.
8. 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. 306: 199–208.
9. **Белан Д.В.**, Екимова И.В. Белки теплового шока при конформационных болезнях мозга // Рос. Физиол. Журн. им. И. М. Сеченова. 2019. 105 (12): 1465–1485.

1. **Plaksina (Belan) D.V.**, Meshalkina D.A., Guzhova I.V., Ekimova I.V. The role of molecular chaperone Hsp70 in the protection of dopaminergic neurons in proteasome dysfunction of the nigrostriatal system / 21st Multidisciplinary International Neuroscience and Biological Psychiatry Conference «Stress and behavior». P. 31. 2014.
2. **Plaksina (Belan) D.V.**, Pastukhov Y.F., Lapshina K.V., Meshalkina D.A., Guzhova I.V., Ekimova I.V. Assessment of the neurotherapeutic activity of the recombinant heat shock protein Hsp70 in the rat model of Parkinson's disease / 2nd World Congress on Neurotherapeutics: Dilemmas, Debates, Discussions. P. 46. 2015.
3. **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.
4. Калинин Р.С., **Плаксина (Белан) Д.В.**, Екимова И.В. Возрастные особенности резистентности нигростриатной системы к действию нейротоксина у крыс / XV Всероссийское Собрание с Международным Участием и VIII Школа по Эволюционной Физиологии. С. 102. 2016.
5. **Plaksina (Belan) D.V.**, Chernyshev M.V., Karpenko M.N., Gazizova A.R., Pazi M.B., Ekimova I.V. Experimental modeling of a preclinical Parkinson's disease stage in rats by intranasal lactacystin administration. / 13th International Conference on Alzheimer's and Parkinson's Diseases. Neurodegenerative Diseases. Suppl. 1 (17). P. 1655. 2017.
6. **Плаксина (Belan) Д.В.**, Екимова И.В. Конфокальная микроскопия альфа-синуклеиновой патологии в дофаминергических структурах головного мозга в модели доклинической стадии болезни Паркинсона у крыс среднего возраста / Первая Всероссийская конференция и школа с международным участием «Оптогенетика и Оптофармакология». С. 97-102. 2018.
7. **Belan D.V.**, Ekimova I.V. Hsp70 inducer U133 prevents the development of motor disturbances, neurodegeneration and neuroinflammation in nigrostriatal system in the model of Parkinson's disease in rats / 26th Multidisciplinary International Neuroscience and Biological Psychiatry Conference «Stress and behavior». P. 25. 2019.
8. **Belan D.V.**, Ekimova I.V. Assessment of the neuroprotective potential of the new HSP70 inducer in the aging brain of rats in the model of Parkinson's disease / 2nd Brainstorming Research Assembly for Young Neuroscientists (BRAYN). P. 115. 2019.
9. **Белан Д.В.**, Полоник С.Г., Екимова И.В. Индуктор шаперонов U133 противодействует развитию альфа-синуклеиновой патологии в черной субстанции в модели болезни Паркинсона у крыс пожилого возраста / II Всероссийская научная конференция с международным участием «Оптогенетика + 2020». С. 71-73. 2020.