

DOI: 10.7868/S086981391807002X

ОЦЕНКА НЕЙРОПРОТЕКТИВНОГО ПОТЕНЦИАЛА ГЛЮКОЗО-РЕГУЛИРУЕМОГО БЕЛКА ТЕПЛООВОГО ШОКА В МОДЕЛИ БОЛЕЗНИ ПАРКИНСОНА У КРЫС

© И. В. Екимова, М. Б. Пази, Д. В. Плаксина

Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова РАН,
Санкт-Петербург, Россия
E-mail: irina-ekimova@mail.ru

Болезнь Паркинсона (БП) — мультисистемное хроническое прогрессирующее нейродегенеративное заболевание, которое до сих пор относится к числу неизлечимых нейродегенеративных заболеваний. Прогресс в лечении связывается с разработкой новых технологий превентивной нейропротективной терапии БП, целью которой является остановить или замедлить дегенерацию нейронов и восстановить функционирование поврежденных отделов мозга. В настоящем исследовании оценен терапевтический потенциал рекомбинантного глюкозо-регулируемого белка Grp78 в модели доклинической стадии БП у крыс, созданной с помощью микроинъекций ингибитора протеасом лактацистина (ЛЦ) в компактную часть черной субстанции (кчЧС). Модель характеризуется отсутствием моторных феноменов, допороговым уровнем нейродегенерации в nigrostriatal system по сравнению с уровнем клинической стадии БП, развитием нейровоспаления. Мы показали, что формирование указанных патоморфологических признаков БП в nigrostriatal system сопряжено с развитием ЛЦ-индуцированного стресса эндоплазматического ретикулума (ЭР), о чем свидетельствует увеличение содержания белка ЭР шаперона Grp78 в нейронах кчЧС. Впервые установлено, что курсовое интраназальное введение рекомбинантного белка Grp78 в модели доклинической стадии БП у крыс ослабляет процесс нейродегенерации в nigrostriatal system и препятствует развитию нейровоспаления. Сделано заключение, что экзогенный белок Grp78 обладает комбинированным терапевтическим действием (нейропротективным и противовоспалительным) при БП-подобной нейродегенерации. Полученные факты представляются перспективными для разработки новых подходов к патогенетически обоснованной превентивной нейропротективной терапии БП.

Ключевые слова: болезнь Паркинсона, лактацистин, шаперон Grp78, нейродегенерация, нейровоспаление, черная субстанция.

Рос. физиол. журн. им. И. М. Сеченова. Т. 104. № 7. С. 757—768. 2018

I. V. Ekimova, M. B. Pazi, D. V. Plaksina. EVALUATION OF THE NEUROPROTECTIVE POTENTIAL OF GLUCOSO-REGULATED HEAT SHOCK PROTEIN IN THE MODEL OF PARKINSON'S DISEASE IN RATS. I. M. Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry of the RAS, St. Petersburg, Russia, e-mail: irina-ekimova@mail.ru.

Parkinson's disease (PD) is a multi-system chronic progressive neurodegenerative disease that still belongs to incurable neurodegenerative disorders. Progress in treatment is associated with the development of new methods of preventive neuroprotective therapy of PD, which

would aim to stop or slow down the degeneration of neurons and restore the functioning of the damaged parts of the brain. The present study evaluates the therapeutic potential of the recombinant glucose-regulated protein Grp78 in a model of the preclinical stage of PD in rats, created by microinjections of the proteasome inhibitor lactacystin (LC) into the substantia nigra pars compacta (SNpc). The model is characterized by the absence of motor phenomena, subthreshold level of neurodegeneration in the nigrostriatal system comparing to the level of the clinical stage of PD, development of neuroinflammation. We show that the formation of these pathological signs of PD in the nigrostriatal system is associated with the development of LC-induced stress of the endoplasmic reticulum (ER), as evidenced by an increase in the protein content of the ER chaperone Grp78 in the SNpc neurons. It is established for the first time that the intranasal administration of the recombinant Grp78 protein in the preclinical PD model in rats weakens the neurodegeneration process in the nigrostriate system and inhibits the development of neuroinflammation. It is concluded that the exogenous Grp78 protein has a combined therapeutic effect (neuroprotective and anti-inflammatory) in PD-like neurodegeneration. The obtained facts seem promising for the development of new approaches to pathogenetically grounded preventive neuroprotective therapy of PD.

Key words: Parkinson's disease, lactacystin, chaperone Grp78, neurodegeneration, neuroinflammation, substantia nigra, rats.

RUSSIAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY. V. 104. N 7. P. 757—768. 2018

Болезнь Паркинсона (БП) — мультисистемное хроническое прогрессирующее нейродегенеративное заболевание, которое характеризуется широким спектром моторных и немоторных симптомов. Около 16 миллионов людей во всем мире страдают от БП, и заболеваемость неуклонно растет с возрастом. Среди лиц 65 лет распространенность БП составляет 1%, а к 85 годам — 5% [9]. Увеличение долгожителей, предсказанное в течение ближайших 20—30 лет, будет сопровождаться 1.5—2-кратным увеличением числа пациентов с БП [10].

Ведущим симптомом БП, по которому заболевание диагностируется, является наличие в клинической стадии типичных моторных нарушений (гипокинезия, мышечная ригидность, тремор покоя), связанных с дегенерацией 60—70% двигательных дофамин (ДА)ергических нейронов в компактной части черной субстанции (кЧС) [25]. Почти полное отсутствие нейронов-мишеней в кЧС для терапии БП ставит это заболевание в ряд неизлечимых. Прогресс в лечении связывается с разработкой новых технологий превентивной нейропротективной терапии БП, целью которой является остановить или замедлить дегенерацию нейронов и восстановить функционирование поврежденных отделов мозга [1, 5]. В последнее десятилетие экспериментальные и клинические испытания прошли несколько десятков препаратов (противовоспалительные средства, трофические факторы, антиоксиданты, антагонисты глутаматных рецепторов и т. д.), однако их эффективность пока не доказана [27]. На сегодняшний день ни одного действительно эффективного нейропротективного препарата для превентивной терапии БП клиницистам не предложено.

Многочисленные данные литературы указывают, что нарушение укладки белка α -синуклеина вследствие ослабления работы протеасом и механизмов конформационного контроля со стороны системы белков теплового шока семейства HSP70 (Hsp70, Hsc70, Grp78), является молекулярной основой развития нейродегенерации при БП [1, 8, 15, 17]. Фолдинг и созревание ряда белков, в том числе и α -синуклеина, происходит в гранулярном эндоплазматическом ретикулуме (ЭР). Нарушение фолдинга белков приводит к накоплению в ЭР белков с неправильной конформацией, что вызывает стресс ЭР, называемый ответом несвернутых белков [unfolded protein response, (UPR)] [17, 24]. Биологическая значимость UPR состоит в облегчении стресс-реакции и восстановле-

нии функции ЭР. Это достигается: а) увеличением экспрессии глюкозо-регулируемого белка (Grp78) и других шаперонов ЭР, участвующих в фолдинге и рефолдинге белков [28], б) подавлением процесса трансляции белков с целью ограничения их поступления и накопления в просвете ЭР [30] и в) активацией механизмов деградации aberrантных белков при участии убиквитин-протеасомной системы [19]. Однако если стресс ЭР является продолжительным или превышающим адаптивные способности клетки, то активируются сигнальные каскады UPR, направленные на апоптоз и развитие воспаления [30].

Среди молекулярных механизмов, ведущих к развитию БП, особое значение придается стрессу ЭР, развитие которого связано с агрегацией и накоплением токсических форм α -синуклеина и других белков в ЭР [12, 13]. Два маркера стресса ЭР — фосфорилированная серин/треониновая киназа (pPERK) и фосфорилированный эукариотический трансляционный иницирующий фактор 2 α (eIF2 α) PERK-сигнального каскада выявлены в ДАергических нейронах кЧС у пациентов со спорадической формой БП [14, 24]. При этом pPERK-иммунореактивные нейроны колокализировались с агрегатами α -синуклеина, что подтверждает ключевую роль aberrантных форм α -синуклеина в UPR активации. Считается, что UPR может являться триггерным звеном патогенеза БП [24, 27]. Ряд данных литературы указывает, что мобилизация шаперонного механизма, основанного на Grp78, представляет первую линию защиты от фатальных последствий продолжительного UPR [12, 21, 24]; нейропротективные свойства Grp78 показаны в животных моделях старческой дегенерации сетчатки глаза, ишемии головного мозга и α -синуклеиновой патологии. Находясь в ЭР, шаперон GRP78 не только препятствует образованию аномальных белков, но и вовлечен в регуляцию сигнальных каскадов UPR [17, 24]. Снижение экспрессии и шаперонной активности GRP78 у пожилых людей рассматривается как фактор, предрасполагающий к развитию БП [18, 22].

В соответствии с современным представлением о молекулярных механизмах нейродегенерации ранее в лаборатории созданы модели пролонгированной (до 21 дня) доклинической и клинической стадий БП у крыс на основе ослабления активности протеасом в nigростриатной системе и оценены защитные эффекты индуцибельного белка Hsp70 [1, 3]. Показано, что увеличение содержания в головном мозге Hsp70 путем его интраназального введения уменьшает в 2 раза потерю ДАергических нейронов в кЧС в модели клинической стадии БП у крыс [2]. Нейропротективный потенциал белка Grp78 в этих моделях БП не изучался.

Задача исследования — выяснить, способно ли интраназальное введение рекомбинантного белка Grp78 ослабить и/или остановить процесс нейродегенерации и нейровоспаления в кЧС в модели доклинической стадии БП у крыс, созданной путем микроинъекций в кЧС ингибитора протеасом лактацистина.

МЕТОДИКА

Животные. Опыты проводились на половозрелых самцах крыс популяции Вистар ($n = 27$) в возрасте 6 месяцев и массой тела 250—270 г. Во время проведения эксперимента животные содержались в виварии ИЭФБ РАН в одиночных клетках при постоянной температуре 23 ± 1 °С; еда и вода давались без ограничений. Манипуляции с животными осуществлялись в соответствии с протоколом, утвержденным комитетом по охране животных ИЭФБ РАН, находящимся в соответствии с национальными и международными требованиями.

Схема эксперимента. Для моделирования доклинической стадии БП использовали специфический ингибитор ферментативной активности протеасом лактацистин (ЛЦ, Enzo, США), который растворяли в апирогенном фосфатном буфере (ФБ; pH 7.4). ЛЦ вводили в дозе 0.4 мкг/1 мкл в кЧС через заранее имплантированные направляющие канюли со скоростью 0.1 мкл/мин дважды с недельным интервалом. Контрольной группе животных вводили растворитель ЛЦ по такой же схеме.

Рекомбинантный глюкозо-регулируемый белок теплового шока Grp78 человека (Sigma, США) вводили через 4 и 28 ч после каждой микроинъекции ЛЦ, а также через 7 дней после последней микроинъекции ЛЦ в дозе 1.6 мкг /8 мкл интраназально в каждую ноздрю крысы с помощью лабораторного дозатора на 10 мкл (JET BIOFIL®, Корея). Контрольная группа животных по аналогичной схеме получала растворитель Grp78. При введении контрольного раствора, ЛЦ, ЛЦ + Grp78 было исследовано по 7 животных в каждой группе. В отдельной серии экспериментов Grp78 вводили ложнооперированным крысам ($n = 6$).

Поведенческие тесты. Тесты на моторное поведение проводили через 21 день после первой микроинъекции ЛЦ. Для выявления нарушений в походке и координации движений проведен модифицированный тест «Суок» [16]. В тесте использовалась планка длиной 150 см и шириной 3.5 см, один конец которой был опущен в домашнюю клетку крысы под углом 30°, на противоположный конец сажали крысу. Каждое экспериментальное животное проходило по планке дважды, при его перемещении оценивались походка и координация движений конечностей. Степень выраженности моторных нарушений оценивалась в баллах с помощью модифицированной шкалы [20]. *Координация:* 0 баллов — нормальная координация; 0.5 балла — соскальзывание одной конечности с планки; 1 балл — соскальзывание с планки с повисанием; 2 балла — полное падение с планки; 3 балла — неспособность передвигаться по планке; *походка:* 0 баллов — нормальная походка; 1 балл — шаткая походка; 2 балла — широко расставленные конечности, неуверенная походка; 3 балла — широко расставленные конечности, асимметричная работа конечностей.

Для выявления сенсомоторного дефицита применен общепринятый тест «Перевернутая решетка». Экспериментальное животное помещали на решетку с расстоянием между параллельными планками 0.5 см, поднятую на высоту 50 см над мягкой подстилкой, после чего экспериментатор переворачивал решетку на 180° и засекал время зависания крысы на решетке с помощью всех четырех конечностей.

Для оценки мелкой моторики передних конечностей, губ и языка применялся тест с семенами подсолнечника [11]. За 48 ч до проведения теста крысам давали семена подсолнечника вместо обычного корма для приучения к новой пище. За сутки до проведения теста крыс не кормили. При проведении теста животным давали семена подсолнечника (20—25 штук). Экспериментатор засекал латентный период взятия в лапки первой семечки, время поедания одной семечки и подсчитывал число семечек, съеденных крысой за 5 мин.

Биотин-стрептавидиновый метод. После проведения моторных тестов крыс декапитировали, головной мозг извлекали из черепной коробки и фиксировали в 4%-ном растворе параформальдегида при температуре 4 °С. Для криопротекции через 5 дней после декапитации мозг переносили в 20%-ный раствор сахарозы при температуре 4 °С. Головной мозг замораживали в 2-метилбутане при -45 °С и хранили при температуре -80 °С. При помощи криостата Leica (Германия) при температуре -22 °С подготавливали серии

фронтальных срезов головного мозга толщиной 10 мкм, содержащие кЧС и стриатум. Локализацию структур осуществляли с помощью стереотаксического атласа [23].

Для исследования количества ДАергических нейронов в кЧС и их аксонов в дорсальном стриатуме, уровня иммунореактивности скорость-лимитирующего фермента синтеза дофамина — тирозингидроксилазы (ТГ), оптической плотности глюкозо-регулируемого белка теплового шока Grp78 в нейронах кЧС и количества микроглиоцитов в кЧС использовали биотин-стрептавидиновый метод. Срезы промывали ФБ, затем проводили термическое демаскирование антигенов в цитратном буфере (рН 6.0) при температуре 96—98 °С. Для гашения активности эндогенной пероксидазы срезы выдерживали в 3%-ном растворе пероксида водорода в течение 20 мин. После промывки в ФБ с добавлением 0.1%-ного раствора Tween-20 (Sigma, США) для повышения проницаемости плазматических мембран срезы преинкубировали в блокирующем растворе [3% сыворотки козы (Sigma, США), 0.01% Tween-20 на ФБ] в течение 1 ч при комнатной температуре и инкубировали в растворе первичных поликлональных антител кролика против ТГ (1:900, Abcam, США), Grp78 (1:700, Abcam, США) или против маркера микроглиоцитов — кальций-связывающего белка Iba-1 (1:350, Abcam, США) в течение 24 ч во влажной камере при комнатной температуре. После трехкратной промывки в ФБ препараты последовательно инкубировали в течение 1 ч во вторичных антителах козы против кролика, конъюгированных с биотином (1:350, VectorLab, США), и комплексе стрептавидин-пероксидаза (1:500, VectorLab, США). Реакцию синхронно визуализировали в 0.05%-ном растворе 3,3'-диаминобензидина на ФБ с 0.015%-ным раствором 30%-ного пероксида водорода. После промывки дистиллированной водой срезы обезвоживали в восходящих спиртах, заключали под покровное стекло с помощью синтетической среды BioMount (Италия) и хранили при комнатной температуре.

Изображения кЧС и дорсального стриатума крыс получали с помощью микроскопа Karl Zeiss (Германия) с встроенной видеокамерой и программного обеспечения для захвата изображения. Подсчет числа иммунопозитивных к ТГ нейронов и Iba-1-иммунопозитивных микроглиоцитов в кЧС проводили с помощью программы PhotoM (Черниговский, <http://t-lambda.chart.ru>). Для подсчета количества ТГ-иммунореактивных аксонов в дорсальном стриатуме использовали программу ImageJ [6]. По каждому животному анализировали 10—12 снимков кЧС и дорсального стриатума.

Оптическая плотность иммунореактивного вещества ТГ и Grp78 оценивалась компьютерной программой PhotoM как интенсивность серого цвета при прохождении волны света длиной 650 нм. Результат оценки оптической плотности представлял собой разницу между интенсивно окрашенными нейронами кЧС, содержащими иммунореактивное вещество, и интенсивностью окраски фона (не содержащего иммунореактивного вещества) на том же срезе. У каждого животного анализировали 10—12 снимков.

Статистическая обработка. Статистическую обработку результатов выполняли с помощью программы Statistica 7.0 с учетом характера распределения данных. Изменения в моторном поведении оценивали с помощью непараметрического Манна—Уитни U-теста. Статистическая обработка иммуногистохимических показателей выполнялась с помощью параметрического дисперсионного анализа ANOVA с последующим применением post-hoc критерия Фишера. Полученные результаты считались статистически значимыми при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование показало, что введение ЛЦ в кЧС приводит через 24 ч к повышению содержания Grp78 на 15% ($p < 0.05$) в нейронах кЧС по сравнению с контролем, что свидетельствует о раннем развитии стресса ЭР в кЧС (рис. 1). Моторные тесты «Суок», «Перевернутая решетка» и тест с семенами подсолнечника, выполненные через 21 день после первой микроинъекции ЛЦ, не выявили значимых изменений в моторном поведении животных. Проведенный в этот же срок морфологический анализ препаратов nigростриатной системы показал уменьшение количества иммунореактивных к ТГ нейронов в кЧС на 23% ($p < 0.01$) и на 19% ($p < 0.01$) их аксонов в дорсальном стри-

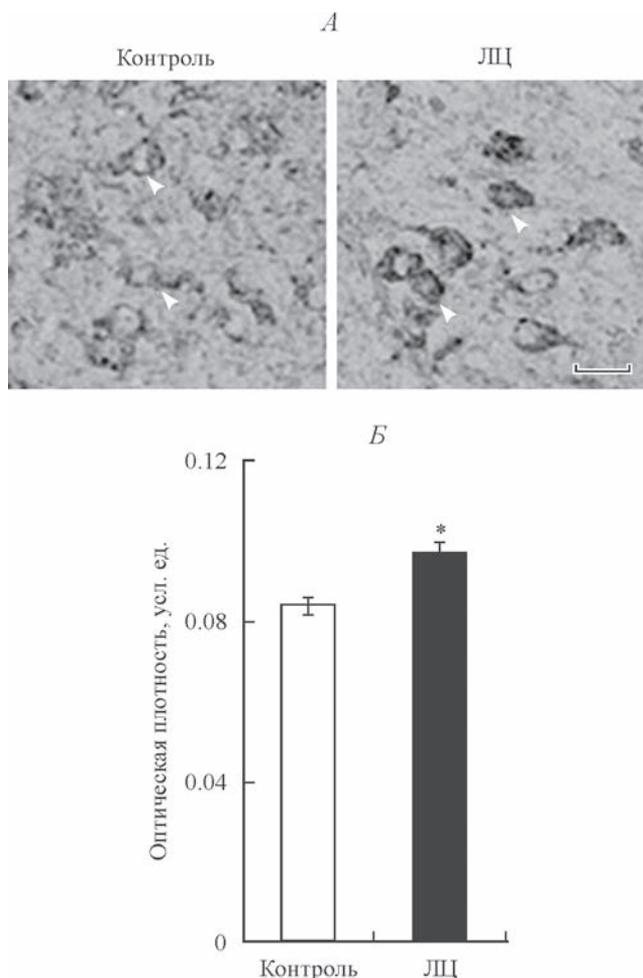


Рис. 1. Изменение содержания глюкозо-регулируемого белка Grp78 в нейронах компактной части черной субстанции (кЧС) через 24 ч после введения лактацистина (ЛЦ) при моделировании доклинической стадии болезни Паркинсона у крыс.

Световая микроскопия (А). Стрелками показаны Grp78-иммунореактивные нейроны в кЧС (масштаб 15 мкм). На графике по оси ординат представлена оптическая плотность иммунореактивного вещества Grp78 в нейронах кЧС (Б). Достоверность различий в опыте относительно контроля: * $p < 0.05$.

туме, что соответствует уровню нейродегенерации в нигростриатной системе, характерному для доклинической стадии БП (рис. 2). Выяснено, что развитие нейродегенерации в нигростриатной системе сопряжено с возрастанием на 42% ($p < 0.01$) количества активированных микроглиоцитов по сравнению с контролем (рис. 3). ЛЦ не влиял на содержание ТГ в выживших нейронах кЧЧС.

Интраназальное введение рекомбинантного белка Grp78 ложнооперированным животным не приводило к изменению моторного поведения и не влияло на количество ДАергических нейронов в кЧЧС и их аксонов в стриатуме, количество микроглиоцитов в кЧЧС и не изменяло содержание ТГ в нейронах кЧЧС по сравнению с контрольной группой крыс, получавших растворитель Grp78 (рис. 2, 3). Впервые показано, что введение Grp78 животным в модели доклинической стадии БП увеличивает количество иммунореактивных к ТГ нейронов в кЧЧС в 1.3 раза ($p < 0.01$) и их аксонов в дорсальном стриатуме в 1.2 раза ($p < 0.05$) и уменьшает в 1.2 раза ($p < 0.05$) количество активированных микроглиоцитов в кЧЧС (рис. 2, 3) по сравнению с контрольной группой модельных животных. Эти данные указывают на нейропротективный потенциал Grp78 в модели доклинической стадии БП у крыс.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Основная цель данного исследования заключалась в оценке нейропротективного потенциала рекомбинантного белка Grp78, введенного интраназально, в модели БП у крыс, созданной путем микроинъекций ингибитора протеасом ЛЦ в кЧЧС. Эта модель воспроизводит ключевые признаки доклинической стадии БП: отсутствие моторных феноменов, допороговый уровень нейродегенерации (в пределах 23—19%) в нигростриатной системе по сравнению с уровнем клинической стадии (60—70% [7]), развитие нейровоспаления, судя по увеличению количества активированных микроглиоцитов на 42%, и образование телец Леви, содержащих агрегаты α -синуклеина [4]. В работе показано, что формирование указанных патоморфологических признаков БП в нигростриатной системе происходило на фоне продолжительного стресса ЭР, о чем свидетельствует раннее (через 24 ч после введения ЛЦ) увеличение содержания GRP78 в нейронах кЧЧС. Этот факт позволяет предположить вовлечение UPR в патогенез нейродегенерации ДАергических нейронов.

В настоящее время накоплено достаточно данных, свидетельствующих, что в животных моделях нейродегенеративной патологии (дегенерации сетчатки глаза, ишемии головного мозга, α -синуклеин-индуцированной патологии, МФТП модели БП) повышение экспрессии Grp78 способствует увеличению выживаемости клеток за счет уменьшения стресса ЭР и блокады апоптоза [12, 21, 24]. В то же время снижение экспрессии Grp78 в нейронах кЧЧС ведет к прогрессии нейродегенерации в модели α -синуклеиновой патологии у крыс [26]. В совокупности представленные результаты выдвигают возможность использования Grp78 для патогенетически обоснованной превентивной фармакотерапии БП. Ранее нами показано, что белок теплового шока Hsp70, введенный интраназально, проникает в мозг, интернализуется ДАергическими нейронами кЧЧС и уменьшает их гибель в модели БП [2]. Эти факты явились основанием применить в настоящем исследовании интраназальный неинвазивный способ введения рекомбинантного белка Grp78. Мы показали, что курсовое интраназальное введение Grp78 животным в модели доклинической

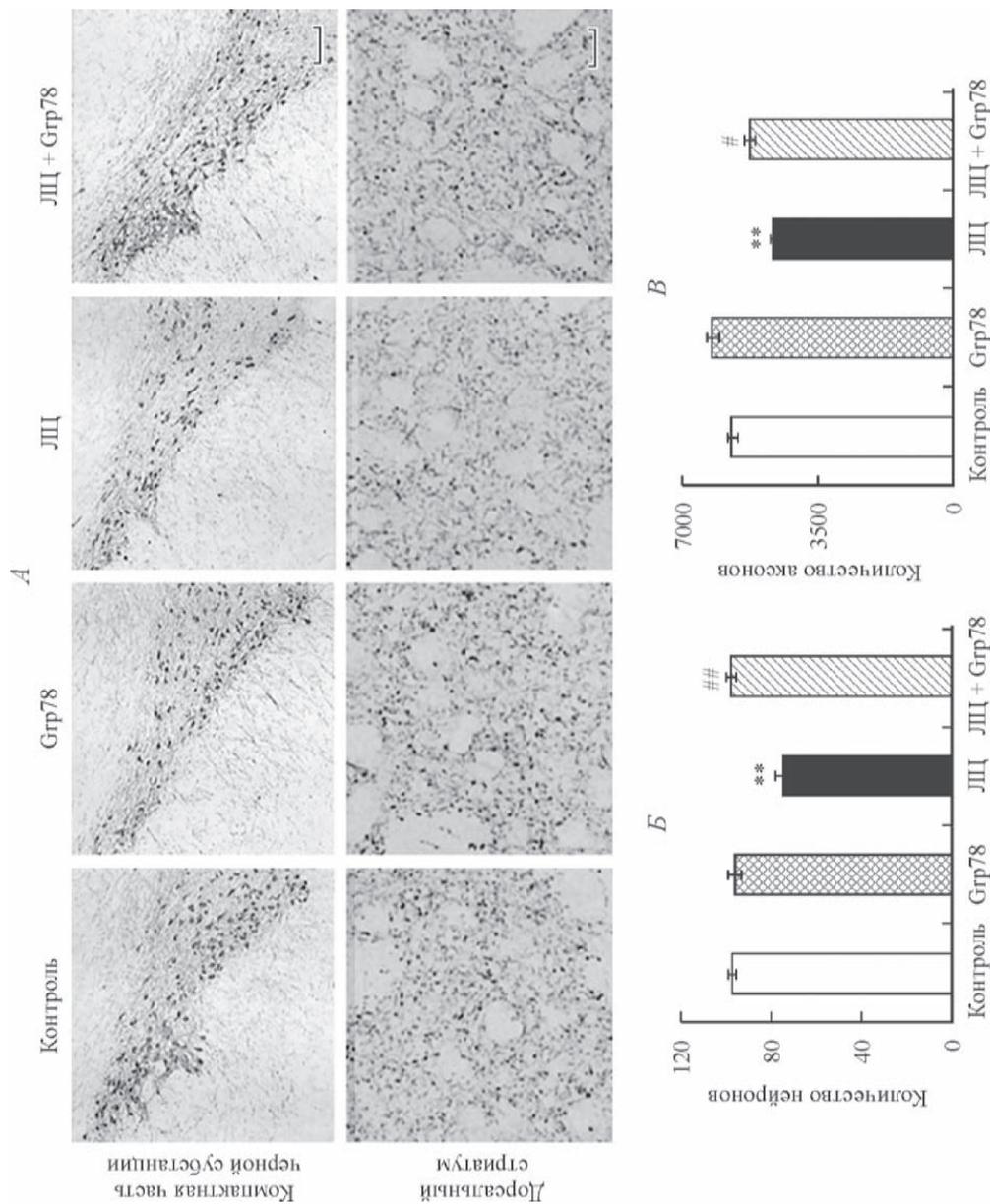


Рис. 2. Изменение количества дофамин (ДА)ергических нейронов в компактной части черной субстанции (кЧС) и ДАергических терминалей аксонов в дорсальном стриатуме при интраназальном введении белка Grp78 в модели доклинической стадии болезни Паркинсона у крыс.

Световая микроскопия (А). Тирозингидроксилаза-иммунореактивные нейроны в кЧС (масштаб 50 мкм) и волокна в дорсальном стриатуме (масштаб 10 мкм). На графиках по оси ординат представлено количество ДАергических нейронов в кЧС (Б) и количество ДАергических волокон в дорсальном стриатуме (В), ЛПС — лактацитин. Здесь и на рис. 3 достоверность различий в опыте относительно контроля: ** $p < 0.01$; достоверность терапевтического эффекта релаксанта Grp78 в модели доклинической стадии БП: # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$.

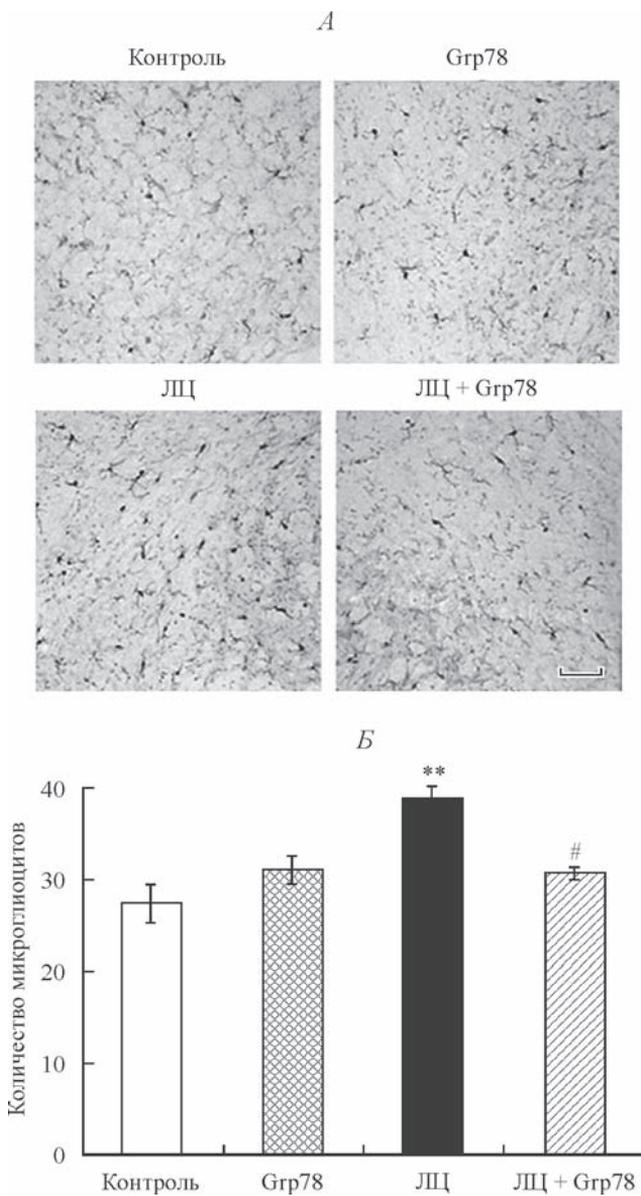


Рис. 3. Изменение количества микроглиоцитов в компактной части черной субстанции (кчЧС) при интраназальном введении белка Grp78 в модели доклинической стадии болезни Паркинсона у крыс.

Световая микроскопия (А). Iba1-иммунореактивные микроглиоциты в кчЧС (масштаб 20 мкм). На графике по оси ординат представлено количество микроглиоцитов в кчЧС (Б).

стадии БП уменьшает на 30% потерю ДАергических нейронов в кЧС и их терминалей в дорсальном стриатуме. Grp78 препятствовал развитию нейровоспаления в кЧС, о чем свидетельствовало восстановление до контрольных значений количества микроглиоцитов. Введение Grp78 ложнооперированным животным не приводило к уменьшению ДАергических нейронов в кЧС, изменению уровня ТГ, развитию нейровоспаления и моторного дефицита. Это указывает, что Grp78 не обладает нейротоксическим действием. Таким образом, получены доказательства того, что введение Grp78 оказывает нейропротективный и противовоспалительный эффекты в модели доклинической стадии БП у крыс, созданной на основе ослабления активности протеасом в кЧС. Уникальный комбинированный терапевтический эффект Grp78 может быть связан со способностью шаперона перепрограммировать стресс ЭР в «больных» нейронах кЧС в сторону выживания и восстановления протеостаза. Известно, что в нестрессовых условиях Grp78 находится в состоянии, связанном с тремя основными сенсорно-сигнальными киназами UPR, локализованными на мембране ЭР: киназами PERK (RNA-dependent protein kinase-like ER kinase) и IRE1 (inositol-requiring enzyme 1), а также с фактором транскрипции ATF6 (activating transcription factor 6) [17, 22, 24]. При развитии стресса ЭР шаперон отщепляется от комплекса с сенсорами, что приводит к их активации и запуску UPR. Данные литературы указывают, что защитный эффект Grp78 достигается способностью шаперона модулировать сигнальные каскады UPR, запускающие апоптоз и воспаление. В модели α -синуклеиновой патологии у крыс показано, что нейропротективный эффект гиперэкспрессии Grp78 в кЧС связан с функциональными изменениями в PERK- и ATF6-зависимых UPR-путях, о чем свидетельствует существенное падение уровня фосфорилированного ATF6, снижение экспрессии ATF4 и проапоптотического транскрипционного фактора CHOP в кЧС [13]. Согласно данным других авторов, снижение экспрессии ATF6 в животной модели рассеянного склероза значительно подавляет микроглиолиз в спинном мозге [29].

Таким образом, мы показали, что интраназально введенный рекомбинантный белок Grp78 демонстрирует комбинированный терапевтический эффект (нейропротективный и противовоспалительный) в модели доклинической стадии БП у крыс. Полученные результаты представляются перспективными для разработки новых подходов к патогенетически обоснованной превентивной нейропротективной терапии БП и других нейродегенеративных заболеваний.

Работа выполнена в рамках государственного задания ФАНО России (тема № АААА-А18-118012290427-7).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- [1] Пастухов Ю. Ф., Екимова И. В., Чеснокова А. В. 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. М. Научный мир. 316—355. 2014.
- [2] Пастухов Ю. Ф., Плаксина Д. В., Лапина К. В., Гужова И. В., Екимова И. В. Экзогенный белок Hsp70 останавливает процесс нейродегенерации в модели клинической стадии болезни Паркинсона у крыс. Докл. АН. 457(1): 225—227. 2014.
- [3] Пастухов Ю. Ф., Чеснокова А. Ю., Якимчук А. А., Екимова И. В., Романова И. В., Худик К. А. Изменения сна при дегенерации нейронов черной субстанции, вызванной ингибитором протеасомы лактацистином. Рос. физиол. журн. им. И. М. Сеченова. 96(12): 1190—1202. 2010.

- [4] Плакшина 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*. 104(6): 709—716. 2018.
- [5] Угрюмов М. В. Трансляционная и профилактическая медицина как основа борьбы с болезнью Паркинсона. Болезнь Паркинсона и расстройства движений. Руководство для врачей. По материалам III Национального конгресса по болезни Паркинсона и расстройством движений. М. 14—16. 2014.
- [6] *Abràmoff M. D., Magalhães P. J., Ram S. J.* Image processing with ImageJ. *Biophotonics International*. 11(7): 36—42. 2004.
- [7] *Bezard E., Dovero S., Prunier C., Ravenscroft P., Chalon S., Guilloteau D.* Relationship between the appearance of symptoms and the level of nigrostriatal degeneration in a progressive 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-lesioned macaque model of Parkinson's disease. *J. Neurosci.* 21: 6853—6861. 2011.
- [8] *Ciechanover A., Kwon Y. T.* Degradation of misfolded proteins in neurodegenerative diseases: therapeutic targets and strategies. *Exp. Mol. Med.* 47(3): e147. 2015.
- [9] *De Lau L. M., Breteler M. M.* Epidemiology of Parkinson's disease. *Lancet Neurol.* 5: 525—535. 2006.
- [10] *Dorsey E. R., Constantinescu R., Thompson J. P., Biglan K. M., Holloway R. G., Kieburtz K.* Projected number of people with Parkinson disease in the most populous nations, 2005 through 2030. *Neurology*. 68: 384—386. 2007.
- [11] *Gonzalez C., Kolb B.* A comparison of different models of stroke on behaviour and brain morphology. *Eur. J. Neurosci.* 18: 1950—1962. 2003.
- [12] *Gorbatyuk M. S., Gorbatyuk O. S.* The molecular chaperone Grp78/BiP as a therapeutic target for neurodegenerative disorders: a mini review. *J. Genet. Syndr. Gene Ther.* 4(2): 128. 2013.
- [13] *Gorbatyuk M. S., Shabashvili A., Chen W., Meyers C., Sullivan L. F., Salganik M., Lin J. H., Lewin A. S., Muzyczka N., Gorbatyuk O. S.* Glucose regulated protein 78 diminishes α -synuclein neurotoxicity in a rat model of Parkinson's disease. *Mol. Ther.* 20(7): 1327—1337. 2012.
- [14] *Hoozemans J. J., Van Haastert E. S., Eikelenboom P., de Vos R. A., Rozemuller J. M., Scheper W.* Activation of the Unfolded Protein Response in Parkinson's Disease. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 354: 707—711. 2007.
- [15] *Jones D. R., Moussaud S., McLean P.* Targeting heat shock proteins to modulate α -synuclein toxicity. *Ther. Ad. Neurol. Disord.* 7(1): 33—51. 2014.
- [16] *Kaluff A. V., Keisala T., Minasyan A., Kumar S. R., LaPorte J. L., Murphy D. L., Tuohimaa P.* The regular and light-dark Suok tests of anxiety and sensorimotor integration: utility for behavioral characterization in laboratory rodents. *Nat. Protoc.* 3(1): 129—136. 2008.
- [17] *Labbadia J., Morimoto R. I.* The biology of proteostasis in aging and disease. *Annu. Rev. Biochem.* 84: 435—464. 2015.
- [18] *Martínez G., Duran-Aniotz C., Cabral-Miranda F., Vivar J. P., Hetz C.* Endoplasmic reticulum proteostasis impairment in aging. *Aging Cell.* 16(4): 615—623. 2017.
- [19] *Meusser B., Hirsch C., Jarosch E., Sommer T.* ERAD: the long road to destruction. *Nat. Cell Biol.* 7: 766—772. 2005.
- [20] *Mittoux V., Ouary S., Monville C., Lisovski F., Poyot T., Condé F., Escartin C., Robichon R., Brouillet E., Peschanski M.* Corticostriatopallidal neuroprotection by adenovirus-mediated ciliary neurotrophic factor gene transfer in a rat model of progressive striatal degeneration. *J. Neurosci.* 22(11): 4478—4486. 2002.
- [21] *Moreno J. A., Tiffany-Castiglioni E.* The chaperone Grp78 in protein folding disorders of the nervous system. *Neurochem. Res.* 40(2): 329—335. 2015.
- [22] *Naidoo N., Brown M.* The endoplasmic reticulum stress response in aging and age-related diseases. *Front. Physiol.* 3: 263. 2012.
- [23] *Paxinos G., Watson C.* The rat brain in stereotaxic coordinates. *SDG. Acad. Press.* 1998.
- [24] *Remondelli P., Renna M.* The endoplasmic reticulum unfolded protein response in neurodegenerative disorders and its potential therapeutic significance. *Front Mol. Neurosci.* 10: 187. 2017.
- [25] *Riederer P., Wuketich St.* Time course of nigrostriatal degeneration in Parkinson's disease. *J. Neural. Transm.* 38(3—4): 277—301. 1976.

- [26] Salganik M., Sergeev V. G., Shinde V., Meyers C. A., Gorbatyuk M. S., Lin J. H., Zolotukhin S., Gorbatyuk O. S. The loss of glucose-regulated protein 78 (GRP78) during normal aging or from siRNA knockdown augments human alpha-synuclein (α -syn) toxicity to rat nigral neurons. *Neurobiol. Aging*. 36(6): 2213—2223. 2015.
- [27] Sarkar S., Raymick J., Imam S. Neuroprotective and therapeutic strategies against Parkinson's disease: recent perspectives. *Int. J. Mol. Sci.* 17(6): 904. 2016.
- [28] Sitia R., Braakman I. Quality control in the endoplasmic reticulum protein factory. *Nature*. 426: 891—894. 2003.
- [29] Ta H. M., Le T. M., Ishii H., Takarada-Iemata M., Hattori T., Hashida K., Yamamoto Y., Mori K., Takahashi R., Kitao Y., Hori O. Atf6a deficiency suppresses microglial activation and ameliorates pathology of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Neurochem.* 139(6): 1124—1137. 2016.
- [30] Zhang K., Kaufman R. J. Protein folding in the endoplasmic reticulum and the unfolded protein response. *Handb. Exp. Pharmacol.* 172: 69—91. 2006.

Поступила 24 IV 2018