

ՀԱՅԱՍՏԱՆԻ ՀԱՆՐԱՊԵՏՈՒԹՅԱՆ ԳԻՏՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԻ ԱԶԳԱՅԻՆ ԱԿԱԴԵՄԻԱ  
ՄՈԼԵԿՆԻԿԱՅԻՆ ԿԵՆՍԱԲԱՆՈՒԹՅԱՆ ԻՆՍՏԻՏՈՒՏ

ՔՆԱՐՅԱՆ ՎԱՐԴՈՒՀԻ ՀԱՐՈՒԹՅՈՒՆԻ

ՆԵՅՐՈՂԵԳԵՆԵՐԱՑԻԱՅԻ ԵՎ ՆԵՅՐՈՊՐՈՏԵԿՑԻԱՅԻ ՄԵԽԱՆԻԶՄՆԵՐԸ  
ՈՂՆՈՒՂԵՂՈՒՄ ՓՈՐՁԱՐԱՐԱԿԱՆ ՊԱՐԿԻՆՍՈՆԻ  
ՀԻՎԱՆԴՈՒԹՅԱՆ ԺԱՄԱՆԱԿ

Գ.00.04 – «Կենսաքիմիա» մասնագիտությամբ  
կենսաբանական գիտությունների դոկտորի գիտական աստիճանի  
հայցման ատենախոսության

ՍԵՂՄԱԳԻՐ

ԵՐԵՎԱՆ – 2020

---

---

НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ НАУК РЕСПУБЛИКИ АРМЕНИЯ  
ИНСТИТУТ МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОЛОГИИ

КНАРЯН ВАРДУИ АРУТЮНОВНА

МЕХАНИЗМЫ НЕЙРОДЕГЕНЕРАЦИИ И НЕЙРОПРОТЕКЦИИ  
В СПИННОМ МОЗГЕ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ  
БОЛЕЗНИ ПАРКИНСОНА

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени  
доктора биологических наук по специальности  
03.00.04 – «Биохимия»

ЕРЕВАН – 2020

Ատենախոսության թեման հաստատվել է ՀՀ ԳԱԱ Հ. Բունիայանի անվան կենսաքիմիայի ինստիտուտի գիտական խորհրդում

Պաշտոնական ընդդիմախոսներ՝ կենս. գիտ. դոկտոր, պրոֆ. Կ.Բ. Ենկոյան  
բժշկ. գիտ. դոկտոր, պրոֆ. Ե.Ա. Կատունինա  
կենս. գիտ. դոկտոր Վ.Ա. Չավուշյան-Պապյան

Առաջատար կազմակերպություն՝ Մ. Հերացու անվան Երևանի պետական  
բժշկական համալսարան

Ատենախոսության պաշտպանությունը տեղի կունենա 2020 թ. հոկտեմբերի 9-ին, ժամը 14<sup>00</sup>-ին ՀՀ ԳԱԱ Մոլեկուլային կենսաբանության ինստիտուտում, 042 մասնագիտական խորհրդի նիստում (ՀՀ, Երևան 0014, Հասրաթյան 7):

Ատենախոսությանը կարելի է ծանոթանալ ՀՀ ԳԱԱ Մոլեկուլային կենսաբանության ինստիտուտի գրադարանում և <http://molbiol.sci.am> կայքում:

Սեղմագիրն առաքվել է 2020 թ. օգոստոսի 25-ին:

042 մասնագիտական խորհրդի գիտական քարտուղար  
կենս. գիտ. թեկնածու



Գ.Մ. Մկրտչյան

---

Тема диссертации утверждена на заседании ученого совета Института биохимии имени Г. Бунятына НАН РА

Официальные оппоненты: доктор биол. наук, проф. Енкоян К.Б.  
доктор мед. наук, проф. Катунина Е.А.  
доктор биол. наук Чавушян-Папаян В.А.

Ведущая организация: Ереванский государственный медицинский университет имени М. Гераци

Защита диссертации состоится 09 октября 2020 г. в 14<sup>00</sup> часов на заседании специализированного совета 042, в Институте молекулярной биологии НАН РА (РА, 0014, г. Ереван, ул. Асратяна 7).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института молекулярной биологии НАН РА и на сайте <http://molbiol.sci.am>.

Автореферат разослан 25 августа 2020 г.

Ученый секретарь специализированного совета 042  
кандидат биол. наук



Մկրտչյան Գ.Մ.

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность темы.** В настоящее время не вызывает сомнения тот факт, что развивающиеся в спинном мозге нейродегенеративные и нейровоспалительные процессы составляют часть патогенеза болезни Паркинсона (БП). Нейропатологические изменения в спинном мозге существенно осложняют течение болезни, его симптоматику и терапию. Актуальность данного исследования заключается в изучении механизмов нейродегенерации в спинном мозге при БП и выявлении молекул, которые играют ключевую роль в этих процессах. Знание этих механизмов создает предпосылки для целенаправленной разработки терапевтических средств с целью предотвращения и/или замедления процессов нейродегенерации в спинном мозге.

БП – хроническое прогрессирующее нейродегенеративное заболевание, при котором избирательно поражаются и гибнут определенные группы нейронов центральной нервной системы (ЦНС). Паркинсонический синдром диагностирован у 0,3% населения земного шара с преобладающей частотой среди людей старше 50 лет [Rizek et al., 2016]. В ряду нейродегенеративных заболеваний БП занимает второе место после болезни Альцгеймера (БА). Основные двигательные расстройства БП клинически проявляются в виде тремора частей тела в состоянии покоя, повышения тонуса и уменьшения гибкости мышц, замедленности движений, нарушения поддержания равновесия тела. Моторные симптомы развиваются, главным образом, вследствие вырождения дофаминергических нейронов черной субстанции головного мозга, снижения уровня нейротрансмиттера дофамина и редукции дофаминергической трансмиссии в хвостатом ядре полосатого тела [Hornykiewicz, 2008]. Гистопатологическими маркерами повреждения дофаминергических нейронов являются тельца и нейриты Леви, состоящие, в основном, из агрегатов фибриллярного белка  $\alpha$ -синуклеина [Goedert et al., 2013; Spillantini et al., 1997].

Результаты многолетних исследований изменили классические представления о БП и создали предпосылки для формирования современной концепции, которая пролила свет на сложные патогенетические механизмы возникновения, развития и симптоматики БП. В настоящее время БП рассматривают как комплексное заболевание, в патогенез которого избирательно вовлекаются множественные структуры нервной системы. Существенный вклад в современные представления о БП внесла разработанная доктором Браакм стадийная теория, согласно которой, разнородные и порой смешанные симптомы отражают отдельные стадии развития болезни [Braak et al., 1995; 2003; Braak & Del Tredici, 2009; 2017]. Согласно теории Браака, структурные и функциональные изменения вне нигростриатной дофаминергической системы становятся причиной нарушений немоторного характера, которые наблюдаются на ранней продромальной стадии патогенеза БП.

Клинические наблюдения подтверждают, что патофизиология БП не ограничивается двигательными расстройствами. Моторные дисфункции, как правило, формируются в течение десятилетий, клинически проявляются в пожилом возрасте и на поздних стадиях болезни, тогда как характерные для БП функциональные отклонения немоторного характера – автономные, вегетативные, нейропсихиатрические и сенсорные, отмечаются уже на ранних стадиях развития болезни и могут проявляться на всем протяжении заболевания [Obeso et al., 2017; Dujardin & Sgambato, 2020]. Причина комплексной многокомпонентной патологии заключается в распространении патологических процессов за пределы нигростриатной системы, охватывая экстраингральные отделы ЦНС, нейроны недофаминергической природы (серотонинергические, холинергические), а также периферическую нервную систему. По мере прогрессирования болезни вырождаются и гибнут проекционные нигральные и экстраингральные нейроны, а также определенные нейрональные ядра, расположенные в различных зонах головного мозга. Нейродегенеративные изменения в дискретных отделах центральной и периферической нервной системы вызывают последовательное развитие премоторных, а затем моторных симптомов заболевания.

Спинальный мозг является наиболее отдаленным от головного мозга экстраинтратентальным отделом ЦНС, и его нейробиологическая роль в патологии БП относительно мало изучена. Исследование патологических процессов в спинном мозге долгое время выпадало из поля зрения ученых, а дискретные данные не позволяли выстроить цельную картину биохимических и морфологических изменений, ведущих к нейродегенерации. Основная причина заключается в том, что разработанные экспериментальные модели БП изначально были предназначены для изучения nigrostriatalной системы, что не исключало возможность параллельного исследования экстраинтратентальных областей головного мозга. Однако используемые в научных экспериментах животные и клеточные модели БП не были валидированы для изучения спинного мозга с учетом его нейрофизиологических и морфологических особенностей.

Накопленный научный материал по результатам патологоанатомических и лабораторных исследований убедительно свидетельствует о вовлечении спинного мозга в патологические процессы и его непосредственном участии в симптоматике БП. Наряду с нейрональными структурами мозга, поврежденные нейроны и вентральные мотонейроны спинного мозга формируют дополнительное уязвимое звено нейродегенерации. С физиологической точки зрения, множественные нейроны спинного мозга составляют часть рефлекторной дуги, которая осуществляет передачу нервного импульса от мотонейронов высших отделов ЦНС к группам мышц. Таким образом, нейроны спинного мозга участвуют в процессах координации и контроля мышечной деятельности. Повреждения в звеньях этой высокоорганизованной цепи и функциональные расстройства в системе согласованной физиологической активности головного и спинного мозга могут привести к нарушению передачи моторных импульсов на группы мышц, отражаясь как на двигательных, так и других жизненно важных функциях организма [Stifani, 2014]. Клинические показатели указывают на участие спинного мозга в формировании как моторных, так и немоторных нарушений при БП. Наблюдаемые у больных нарушения автономных функций, таких как замедленность и затрудненность инициации шага, соматические боли, половая дисфункция, ортостатическая гипотензия, вызваны поражением и дисфункцией систем спинного мозга [Dickson et al., 2009; Lim et al., 2009]. Зависимость автономных нарушений от морфофункциональных изменений в спинном мозге установлена и на животных моделях [Martin et al., 2006]. Есть данные о патологической аккумуляции маркерных телец Леви, Леви-подобных включений,  $\alpha$ -синуклеинопатии [Braak et al., 2007; Sasaki et al., 2008; Kalaitzakis et al., 2008], отмирании мотонейронов в спинном мозге [Vivacqua et al., 2011, 2012; 2020].

$\alpha$ -Синуклеиновая патология индуцирует нейровоспалительный ответ в спинном мозге в виде астроглиоза и микроглиоза [Gu et al., 2010; Mendrizki et al., 2010], ведет к прогрессирующей потере локомоторной функции [Neumann et al., 2002], становится причиной разрушения мотонейронов спинного мозга [Sorrentino et al., 2018]. Считается, что  $\alpha$ -синуклеинопатия в кортикоспинальном (пирамидальном) тракте больных БП может влиять на нормальное течение спинномозговых физиологических процессов и провоцировать формирование как немоторных, так и моторных симптомов [Nardone et al., 2019]. Показано, что электростимулирующие процедуры спинного мозга оказывают положительный эффект на двигательные симптомы и параметры походки [Yadav & Nicoletis, 2017; de Souza et al., 2018; de Lima-Pardini et al., 2018; Fonoff et al., 2019], снижают боль и улучшают психоэмоциональное состояние [Kobayashi et al., 2018] при БП. В свете современных представлений, возникающие и распространяющиеся в спинном мозге нейродегенеративные и нейровоспалительные процессы могут существенно усугублять и осложнять течение заболевания, отражаясь, в первую очередь, на тех симптомах, которые связаны с нейрофизиологической активностью спинного мозга. Исходя из вышеизложенного, изучение механизмов развития патологических процессов в спинном мозге представляется одной из актуальных задач современной биомедицины,

нейробиологии и фундаментальной нейрехимии. Понимание этих механизмов и выявление ключевых таргетных молекул поможет в разработке комплексных терапевтических средств и подходов с целью предотвращения и/или замедления процессов нейродегенерации и подавления развития нейровоспалительных процессов в спинном мозге при БП.

**Цель и задачи исследования.** Цель работы заключается в изучении биохимических и молекулярных механизмов нейродегенерации спинного мозга и выявлении в его структурах патологических изменений, характерных для БП, с использованием *in vivo* и *in vitro* нейротоксических экспериментальных моделей БП и аутопсийного материала спинного мозга больных БП (*postmortem*). Основываясь на классическом представлении об активации митохондриального пути апоптоза как основного механизма нейродегенерации при БП, ключевое значение придается определению изменений уровня внутриклеточного кальция ( $\text{вк}[\text{Ca}^{2+}]$ ) и выяснению роли  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимой протеазы кальпаина в развитии процессов нейродегенерации, аксональной дегенерации и активации медиаторов нейровоспалительных процессов в спинном мозге. Конечная цель направлена на установление механизмов нейропротекции спинного мозга путем воздействия на ключевую таргетную молекулу – кальпаин – его экзогенными синтетическими ингибиторами.

**Задачи, направленные на достижение поставленной цели.**

1. Экспериментальное *in vivo* моделирование БП у мышей линии C57BL/6N с использованием митохондриального нейротоксина 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридина (МФТП); доказательная оценка МФТП-индуцированной нейродегенерации в нигростриатуме.
2. Доказательство прямого нейротоксического воздействия МФТП на спинной мозг путем:
  - а) количественного определения активного метаболита МФТП – 1-метил-4-фенилпиридина (МФП<sup>+</sup>) в условиях *in vivo* и *in vitro*;
  - б) определения активности и экспрессии моноаминоксидазы типа Б (МАО-Б), экспрессии транспортера дофамина (ДАТ) и высокоаффинного захвата МФП<sup>+</sup> в спинном мозге;
  - в) идентификации поврежденных TUNEL<sup>+</sup> нейронов и МФТП-индуцированной нейродегенерации в спинном мозге C57BL/6N мышей;
  - г) определения ключевых молекул, участвующих в нейроапоптозе.
3. Экспериментальное моделирование БП у линейных Lewis крыс (*in vivo*) с использованием ротенона и исследование спинного мозга крыс для выявления нейродегенерации, астроглиоза и микроглиоза, экспрессии и активации кальпаина и каспазы-3 и их нейрональной локализации.
4. Сравнительное исследование аутопсийных образцов спинного мозга больных БП и неврологически здоровых лиц для выявления нейродегенерации, аксональной дегенерации, активации медиаторов воспаления, активации кальпаина, изменений уровня продуктов распада белка цитоскелета – спектрина.
5. Моделирование БП *in vitro* в культуре дифференцированных VSC 4.1 мотонейронов с использованием МФП<sup>+</sup> и ротенона и изучение кальпаинового пути апоптоза под действием нейротоксинов по следующим показателям:
  - а) жизнеспособность и морфологическая оценка VSC 4.1 мотонейронов;
  - б) динамика роста внутриклеточного  $\text{Ca}^{2+}$  ( $\text{вк}[\text{Ca}^{2+}]$ );
  - в) экспрессия и активация кальпаина и каспазы-3, образование специфических продуктов распада спектрина;
  - г) цитопротекторный эффект синтетического ингибитора кальпаина – кальпептина.
6. Моделирование БП *in vitro* с использованием МФП<sup>+</sup> и ротенона в культуре SH-SY5Y клеток нейробластомы дифференцированных в фенотипические дофаминергические (SH-SY5Y-DA) и холинергические (SH-SY5Y-ChAT) клетки. Изучение кальпаинового пути апоптоза SH-SY5Y-DA и SH-SY5Y-ChAT клеток под действием нейротоксинов

по указанным выше (5 а, б, в) показателям, а также определение а) реактивных форм кислорода (АФК); б) медиаторов воспаления; в) изучение цитопротекторного эффекта синтетического ингибитора кальпаина – SNJ-1945.

7. Оценка нейροпротекторного эффекта кальпептина в головном и спинном мозге C57BL/6N мышей в МФТП-индуцированной модели БП (*in vivo*) по следующим показателям:
  - а) выживаемость дофаминергических нейронов нигростриатума по уровню иммунореактивности на тирозингидроксилазу (ТТ);
  - б) выживаемость нейронов и мотонейронов спинного мозга;
  - в) регуляция уровня активного кальпаина и образования кальпаин-специфических продуктов распада спектрина в головном и спинном мозге;
  - г) модуляция нейровоспалительного ответа в спинном мозге;
  - д) коррекция параметров шага мышей (DigiGait анализ).

**Научная новизна.** Диссертационная работа является фундаментальным исследованием в области современной медицинской нейробиологии и нейрохимии, посвященная изучению механизмов дегенерации нейронов и аксонов спинного мозга в экспериментальных условиях (*in vivo*, *in vitro*, *postmortem*). Раскрыты биохимические и молекулярные механизмы нейродегенерации в спинном мозге, подтверждающие его участие в характерных для БП патогенетических процессах. Указаны возможные пути нейропротекции в спинном мозге в экспериментальных условиях.

1. Представленное доказательство метаболического превращения МФТП в активный токсин МФП<sup>+</sup> в спинном мозге C57BL/6N мышей является узловым. Это стало научной основой изучения механизмов нейродегенерации в спинном мозге в МФТП-индуцируемой модели БП как в этой работе, так и в дальнейших исследованиях в данной области.
2. Показано, что паркинсонические токсины МФТП и ротенон, известные избирательным повреждающим действием на дофаминергические нейроны черной субстанции и полосатого тела, губительно действуют на нейроны, мотонейроны и аксоны спинного мозга.
3. Установлена ключевая роль Ca<sup>2+</sup>-зависимой протеазы кальпаина и активации кальпаин-опосредованного механизма в нейродегенерации спинного мозга путем протеолитического разрушения структурных белков (спектрин, нейрофиламентный легкий белок), нейроапоптоза и активации нейровоспалительного ответа.
4. Активация нейровоспалительного ответа в спинном мозге C57BL/6N мышей (МФТП) и Lewis крыс (ротенон) проявляется в виде астроглиоза, микроглиоза, инфильтрации Т клеток и периферийных макрофагов, экспрессии циклооксигеназы-2 (Cox-2), каспазы-1 и индуцибельной NO синтазы (NOS2 или iNOS).
5. Впервые проведено сравнительное изучение аутопсийных образцов спинного мозга больных БП и неврологически здоровых лиц (*postmortem*). Показано преобладание поврежденных TUNEL<sup>+</sup> нейронов и мотонейронов у больных БП, обнаружены признаки аксональной дегенерации, отмечен рост уровня медиаторов воспаления (Cox-2, GFAP, Iba-1, CD3). Присутствие активного кальпаина, продуктов распада спектрина и дерегуляция кальпаистатина предполагают участие кальпаин-опосредованного пути нейродегенерации в спинном мозге больных БП.
6. На *in vitro* клеточных моделях БП, индуцированных МФП<sup>+</sup> и ротеноном, показан митохондриальный кальпаин-опосредованный путь апоптоза. На дифференцированных VSC 4.1 мотонейронах и SH-SY5Y клетках установлены следующие компоненты нейроапоптоза: индуцированный нейротоксинами рост  $\text{вк}[\text{Ca}^{2+}]$ , экспрессия активных субъединиц кальпаина и каспазы-3, повышение уровня продуктов распада спектрина, смещение соотношения мембранных про- и антиапоптотических белков Вах и Bcl-2.

7. Дифференциацией SH-SY5Y клеток нейробластомы получены два фенотипа клеток – дофаминергические (SH-SY5Y-DA) и холинергические (SH-SY5Y-ChAT), в соответствии с дофаминергическими нейронами nigrostriatum и холинергическими мотонейронами спинного мозга. Установлены пути апоптоза, вызванные действием МФП<sup>+</sup> и ротенона, с преобладанием оксидативного стресса в культуре SH-SY5Y-DA клеток и воспалительного стресса в культуре SH-SY5Y-ChAT клеток.
8. Показано цитопротекторное действие синтетических ингибиторов кальпаина – кальпептина и SNJ-1945, на дифференцированные VSC 4.1 мотонейроны и SH-SY5Y клетки, соответственно. Кальпаин-опосредованный путь апоптоза и цитопротекторный эффект кальпептина и SNJ-1945 указывает на возможность применения ингибиторов кальпаина для предотвращения апоптоза в фенотипически разных популяциях нейронов.
9. Одним из наиболее весомых научных результатов работы является демонстрация нейропротекторного эффекта кальпептина в МФТП-индуцированной модели БП (C57BL/6N мыши). Предотвращение кальпептином нейродегенерации дофаминергических нейронов nigrostriatum, с одной стороны, и нейронов, мотонейронов и аксонов спинного мозга, с другой, указывает на возможность применения нейропротекторных средств и в головном, и в спинном мозге.
10. Подавление активации медиаторов воспаления в спинном мозге кальпептином подтверждает роль кальпаина в формировании нейровоспалительного ответа в МФТП-индуцированной модели БП и указывает на дополнительную точку приложения ингибиторов кальпаина.
11. Впервые показано, что МФТП-индуцированные отклонения параметров длины и частоты шага выравниваются под действием кальпептина, что указывает на возможность регуляции параметров шага при ингибировании кальпаина.

**Научно-практическая значимость работы.** Результаты и выводы данного исследования в значительной степени расширяют классические представления о патогенезе БП и дополняют основные положения современной концепции нигральной и экстранигральной патологии этого комплексного заболевания. Протекающие в спинном мозге процессы нейро-аксональной дегенерации и нейровоспалительные реакции в ассоциации с патологическими изменениями в nigrostriатной системе могут привести к осложнению патофизиологических симптомов БП, особенно тех, которые связаны с нейрофизиологической активностью спинного мозга. Это свидетельствует о практической ценности работы и указывает на необходимость проведения биомедицинских исследований БП с учетом нейрохимии, нейроанатомии и нейрофизиологии спинного мозга.

Научно-практическую значимость работы определяют положения, изложенные ниже.

- Установленная в работе ключевая роль кальпаин-опосредованного механизма в процессах дегенерации нейронов и аксонов и развитии нейровоспалительных процессов в головном и в спинном мозге позволяет рассматривать кальпаин в качестве таргетной молекулы в указанных отделах ЦНС.
- Демонстрация нейропротекторных свойств кальпептина и SNJ-1945 в спинном мозге *in vivo* и *in vitro* открывает новые направления для изучения ингибиторов кальпаина при БП, а также при заболеваниях, ассоциирующихся с патологией спинного мозга.
- Активация нейровоспалительного ответа и рост оксидативного стресса указывают на целесообразность тестирования противовоспалительных средств и антиоксидантов с целью подавления и/или сдерживания развития патологических процессов в спинном мозге при БП.
- Уровни кальпаин- и каспаза-3-специфических продуктов распада спектрина и нейрофиментного легкого белка (68 кДа) могут служить биомаркерами прогрессирующих дегенеративных процессов в нейронах и аксонах спинного мозга на разных стадиях развития БП.

– Представленные данные являются основополагающими для нейрофармакологии и указывают на перспективность целенаправленной разработки в качестве универсальных нейропротекторов ингибиторов кальпаина, с целью подавления и/или предотвращения развития и распространения нейродегенеративных процессов в ЦНС.

– Результаты исследований могут быть включены в специальные разделы курсов по медицинской нейробиологии и неврологии.

**Апробация работы.** Основные результаты были представлены и обсуждены на международных конгрессах и конференциях: Inaugural Workshop of UNESCO/UNITWIN (Ереван, 2018); I-ая конференция «Достижения женщин Армении в области биологических наук» (Ереван, 2016); 38<sup>th</sup> (2007, Cancún, Mexico), 41<sup>st</sup> (2010, Santa Fee, NM), 42<sup>nd</sup> (2011, St. Louis, MO), 43<sup>rd</sup> (2012, Baltimore, MD) and 46<sup>th</sup> (2015, Atlanta, GA) Annual Meetings of the American Society for Neurochemistry (ASN); 5<sup>th</sup> Special Conference of the International Society for Neurochemistry (ISN) «Synapses and Dendritic Spines in Health and Disease» (2012, Buenos Aires, Argentina); 21<sup>th</sup> and 24<sup>th</sup> Biennial Meetings of the International Society for Neurochemistry (ISN) (2007, 2013, Cancún, Mexico); 36<sup>th</sup> (2006, Atlanta, GA), 37<sup>th</sup> (2007, San Diego, CA) and 41<sup>st</sup> (2011, Washington, DC) Annual Meetings of the Society for Neuroscience (SfN), 3<sup>rd</sup> International Drug Abuse Research Society (IDARS) & ISN/ESN satellite meeting (2011, Istanbul, Turkey); 36<sup>th</sup> Congress of the Federation of European Biochemical Societies (FEBS) (2011, Torino, Italy); 11<sup>th</sup> Annual Frontiers in Neuroscience Research Day (2010, Charleston, SC); Intl. Symposium «Immune System of the Brain: Neurochemical and Neuroendocrine Aspects» dedicated to the 80<sup>th</sup> anniversary of Academician A. Galoyan (Yerevan, 2009); UNESCO/IBRO Symposium (Yerevan, 2008); Intl. Symposium «Actual Problems of Neurochemistry and Neuroimmunology» dedicated to the 100<sup>th</sup> anniversary of Academician H.Kh. Buniatian (Yerevan, 2007); 3<sup>rd</sup> Annual Aging Research Day «Diversity in Aging Research» (2006, Charleston, SC); 30<sup>th</sup> FEBS Congress & 9<sup>th</sup> IUBMB Conference «The Protein World» (2005, Budapest, Hungary); XIX Annual Meeting of the Indian Academy of Neuroscience & International Symposium on «Neurodegeneration and Neuroprotection» (2002, Calcutta, India); joint 18<sup>th</sup> ISN Biennial Meeting and 32<sup>nd</sup> ASN Annual Meeting in association with the Argentinean Society for Neurochemistry (2001, Buenos Aires, Argentina); 2<sup>nd</sup> and 3<sup>rd</sup> Conferences of the Armenian IBRO Association (Yerevan, 1998, 2000).

**Публикации.** По теме работы опубликовано 20 статей и 22 тезиса.

**Структура диссертации.** Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследований, результатов собственных исследований и их обсуждения, заключения, выводов, списка цитируемой литературы из 390 источников. Работа изложена на 209 страницах компьютерного текста, содержит 5 таблиц и 44 рисунка.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Основная экспериментальная часть работы выполнена в лаборатории Отделения Неврологии и Нейрохимии Медицинского Института Северной Каролины (Чарлстон, США) в рамках международной программы Fulbright Scholar Program (CIES, США) и при поддержке гранта Национального Института Здравоохранения США (R01, NINDS-NIH), под руководством проф. Н.Л. Баника (Banik N.L.) и при участии др. С. Самантарей (Samantaryu S.). Реактивы, животные, культуры клеток, приборы и лабораторные принадлежности были предоставлены. Диссертация оформлена в Институте биохимии им. Г.Х. Бунятыяна НАН РА.

Экспериментальные *in vivo* модели БП индуцировали на линейных C57BL/6N мышях и Lewis крысах. Системное введение нейротоксинов МФТП и ротенона вызывает дегенерацию дофаминергических нейронов nigrostriатума и развитие паркинсонического синдрома. Исследования проводились с разрешения Комитета по уходу и использованию лабораторных животных в экспериментальных целях (Institutional Animal Care and Use Committee of MUSC), следуя Руководству (NIH Guide for the Care and Use of Laboratory



Animals). Животных содержали в стандартных условиях с 12-часовым циклом освещения при 23°C тепла и 55% относительной влажности, при свободном доступе к пище и воде. Инъекции МФТП проводили в отдельном лабораторном помещении, в вытяжном шкафу, следуя протоколу и предусмотренным правилам безопасности. C57BL/6N мышам (10-12-ти недельные самцы, весом 20-25 г, Charles Rivers Labs) вводили солевой раствор МФТП (МРТР-НСI, Sigma) по схеме: а) 25 мг/кг, в/б, 2-3 раза в течение дня с 2-х – 6-и часовым интервалом (острая форма); б) 25 мг/кг в/б, один раз в день в течение 5 дней (хроническая форма). Контрольным мышам в идентичном режиме вводили физиологический раствор. Животных декапитировали на 7-й, 14-й и 21-й день после последней инъекции. По оценкам специалистов, уже на 7-й день погибает до 40-50% дофаминергических клеток нигростриатума [Jackson-Lewis & Przedborski, 2007]. Тщательный уход и частая смена подстилок снижали смертность и отравление мышей выделяемыми ими токсинами. Извлеченные ткани головного и спинного мозга замораживали при -70°C и использовали для биохимического или гистохимического анализа.

Крысам линии Lewis (половозрелые самцы, весом 425 г) вводили ротенон, растворенный в смеси (1:1) диметилсульфоксида (ДМСО) и полиэтиленгликоля (ПЭГ-300) в течение 21 дня по схеме: 10 инъекций по 2.5 мг/кг, подкожно; всего 25 мг/кг. Контрольной группе вводили смесь ДМСО и ПЭГ-300. Крыс ежедневно взвешивали и наблюдали за их физиологической активностью. Декапитировали животных на 21-й день под анестезией кетаминном (80 мг/кг).

В опытах по нейропротекции использованы синтетические ингибиторы кальпаина: кальпептин (C<sub>20</sub>H<sub>30</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>; benzyloxycarbonylleucylnorleucinal, EMD Biosciences), пептидный альдегид с высокой степенью клеточной проницаемости, и амфипатический кетоамид SNJ-1945 – [((1S)-1((((1S)-1-benzyl-3-cyclopropylamino)-2,3-dioxopropyl) amino)-carbonyl)-3-methyl butyl) carbamic acid 5-methoxy-3oxapentyl ester, Senju Pharmaceutical Co. Ltd].

**Содержание дофамина в стриатуме** определяли на высокоэффективном жидкостном хроматографе (ВЭЖХ) с электрохимическим детектором (Merck-Hitachi) [Mehta et al., 2001]. Мышам линии Balb/c (вес 22-25 г) дважды вводили МФТП по 30 мг/кг (в/б) с интервалом в 16 часов; декапитировали мышей на 5-й день. Опыты проведены на базе Индийского института химической биологии (Калькутта, Индия) под руководством др. К.П. Моханакумара (Mohanakumar K.P.) в рамках международной программы JNCASR-COSTED (Индия).

**Содержание МФП<sup>+</sup>** в гомогенатах (*in vivo*) или в P2 грубой митохондриальной фракции (*in vitro*) стриатума и спинного мозга C57BL/6N мышей определяли на ВЭЖХ с фотодиодным детектором (HPLC, Waters 994 PDA) по описанному методу [Muralikrishnan et al., 2003]. В качестве стандарта использовали коммерческий препарат МФП<sup>+</sup> (Sigma) с пиком поглощения при 285 нм и времени ретенции RT=3.41 мин. Сразу после однократного введения МФТП (25 мг/кг; в/б) определяли содержание МФП<sup>+</sup> на нулевой точке (0 мин), затем на 30-й, 60-й, 90-й, 120-й, 240-й и 360-й мин. Количество МФП<sup>+</sup> выражали в пмоль/мг ткани или пмоль/мг митохондриального белка. Концентрацию белка (здесь и далее в работе) определяли спектрофотометрически при длине волны 595 нм с использованием реагента Кумасси (Coomassie Plus<sup>TM</sup> Protein Assay, Pierce).

**Активность MAO, MAO-A и MAO-B** в головном и спинном мозге мышей измеряли спектрофлуориметрически по количеству образования 4-гидрохинолиновой кислоты (нмоль 4-ГХК/мг митохондриального белка/мин) из экзогенного субстрата MAO кинурамина при длине волны возбуждения 315 нм и эмиссии 380 нм [Muralikrishnan et al., 2003].

**Высокоаффинный захват МФП<sup>+</sup>** в синапсосамах стриатума и спинного мозга определяли с добавлением [<sup>3</sup>H]-МФП<sup>+</sup> (5 нмоль/л, специфическая активность 85 Ci/ммоль); неспецифический захват измеряли при 500 мкМ МФП<sup>+</sup>; в контрольные пробы добавляли ингибитор захвата МФП<sup>+</sup> номифензин (200 мкМ). Радиоактивность определяли на

жидкостно-сцинтилляционном счетчике; количество захваченного вещества выражали в фемтомолях на мг синапсосомального белка/мин (фмоль/мг/мин).

**Иммунофлуоресцентное окрашивание (ИМФО)** с использованием одного или двух антител применяли для определения иммунореактивности (ИМР) на специфические иммуномаркеры нейронов, мотонейронов, глиальных клеток и целевых молекул. В качестве маркера фрагментации ДНК и апоптоза клеток использовали TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) recombinant-mediated dUTP nick end labeling). В реакции, катализируемой терминальной дезоксирибонуклеотидил трансферазой (TdT), происходит включение флуоресцеин-конъюгированного дезоксиридинтрифосфата (12-dUTP) в 3'-гидроксильные концы фрагментированных молекул ДНК. Замороженные (-70°C) в Histo Prep среде ткани головного и спинного мозга оттаивали до -18°C. Срезы (10 или 5 мкм, креостат Leica CM1850) фиксировали в 95% этаноле, ополаскивали в фосфатно-соляном буфере (ФСБ, pH 7.4) и хранили при 4°C. При двойном TUNEL ИМФО срезы фиксировали 95% этанолом, 4% раствором формальдегида без метанола, инкубировали в буфере с рекомбинированной трансферазой (TdT, Apoptosis Detection System, Promega), насыщали диоксибензил-мечеными нуклеотидами в присутствии флуоресцеин-конъюгированного 12-dUTP реагента (Roche), погружали в раствор 2x NaCl/Na-цитрата и ополаскивали в ФСБ (3x5 мин). Далее, срезы инкубировали в ФСБ, содержащей 2% сыворотку (лошади, козы или овцы), насыщали первичными IgG антителами в светозащитных ящичках (4°C). Несвязанные антитела отмывали буфером, срезы инкубировали с вторичными IgG антителами, ополаскивали буфером, дистиллированной водой и склеивали на предметных стеклах (Vectashield™; Vector Laboratories). Сигналы иммунофлуоресценции связанных антител детектировали с помощью микроскопа Olympus BH-2 с интегрированной фотокамерой и программным обеспечением MagnaFire (Media Cybernetics). Микроснимки (разрешение 1280x1024 pixel; ув. 200x) анализировали по программе NIH ImageJ 1.45. Показатели интенсивности иммунофлуоресценции (mean fluorescence intensity, MFI) выражали в условных единицах (arbitrary units).

**Методом иммуноблоттинга (Western blot)** оценивали уровень тестируемых белков, следуя лабораторному протоколу [Ray et al., 2000]. Белковые препараты получали из замороженных тканей спинного мозга или осажденных клеточных фракций. Концентрацию белка доводили до 1.5 мг белка/мл, разбавляя смесь двух буферов (1:1) и бромофенолом синим (0.01%). Электрофорез белков проводили на прекастных 4-20% или 7.5% натрия додецилсульфат-полиакриламидных гелях (SDS-PAGE, Bio-Rad Laboratories) при 100 V. Белки переводили с гелей на фтор-поливинилиден микропоровые мембраны (Immobilon™-P, Millipore) в аппарате Genie (Idea Scientific). Мембраны блокировали 5% раствором нежирного молочного порошка, инкубировали с первичными IgG антителами (4°C), инкубировали с пероксидаза-конъюгированными вторичными IgG антителами. ИМР белков на мембранах визуализировали хемилюменцентными реагентами (ECL, ECL Plus, Amersham) и проявляли на приборе Alpha-Innotech с FluorChem FC2 Imaging System (Cell Biosciences). Исследуемые белковые препараты анализировали в трех параллелях. Для контроля содержания белка иммуноблоты ретробировали на β-актин. Денситометрию белковых полос на иммуноблотах осуществляли по программе NIH ImageJ 1.63.

Нейродегенерацию в нигростриатуме оценивали по ИМР на тирозингидроксилазу (ТГ, маркер дофаминергических нейронов), а в спинном мозге – по ИМР на TUNEL в комбинации с NeuN (neuronal nuclei) – маркер нейронов и нейрональных ядер, или с холин-ацетилтрансферазой (ChAT, cholin-acetyltransferase) – маркер мотонейронов. Участки ко-локализации положительной (+) ИМР на TUNEL<sup>+</sup> и NeuN<sup>+</sup> указывали на поврежденные нейроны. Аксональную дегенерацию оценивали по ИМР на NFL (neurofilament light protein) – маркер нейрофиламентного легкого белка, и на deNFP (dephosphorylated neurofilament protein) – маркер дефосфорилированного белка нейрофиламента. Митохондриальный путь апоптоза оценивали по уровню и соотношению белков митохондриальных мембран Bcl-2

(B-cell lymphoma 2) и Вах (Bcl-2-like protein 4; Bcl-2 ассоциированный X протеин). Кальпаин-опосредованный путь определяли по экспрессии активного кальпаина (active Calpain). Активацию кальпаина и каспазы-3 оценивали по образованию специфических продуктов распада спектрина (SBDP, spectrin breakdown products) с использованием  $\alpha$ II-spectrin антител. Активацию нейровоспалительных процессов оценивали по следующим показателям: глиальный фибриллярный кислый белок и фактор астроглиоза – GFAP (glial fibrillary acidic protein); факторы микроглиоза – OX-42 (anti-CD11b/c) и Iba-1 (Ionized calcium-binding adapter molecule 1); факторы инфильтрации Т клеток и периферийных макрофагов – CD3, CD4, CD8, ED-2; воспалительные ферменты – Cox-2 (cyclooxygenase-2), caspase-1, NOS2.

**Производители.** (Anti-) mouse monoslonal  $\beta$ -Actin, Neurofilament 200 clone NE14, Neurofilament 68 clone NR4 (Sigma); Calpastatin, Caspase-3, Caspase-8, Caspase-1, Вах, Bcl-2, Cox-2, CD163 (ED2), CD3 (PC3/188A), NOS2 (Santa Cruz Biotechnology, Inc. USA);  $\alpha$ II-spectrin (Enzo Biomol.); CD11b/c или OX-42 (Invitrogen); GFAP, NeuN (EMD Millipore, USA); deNFP (Covance, SMI-311R); TH (Chemicon, Intl.,USA). Goat polyclonal MAO-B (Santa Cruz Biotechnology Inc.); ChAT (Chemicon), Iba-1 (Abcam). Rabbit polyclonal mCalpain,  $\mu$ Calpain, active Calpain [Banik et al., 1983]. Вторичные антитела: Peroxidase-conjugated IgG (MP Biomedicals, USA), Fluorescein isothiocyanate-conjugated (FITC, green), Texas Red-conjugated IgG (Vector Labs, Burlingame, USA); anti-digoxigenin-rhodamine-coupled, Fab fragments (Roche, Germany); DyLight 488 (green), Dylight 594 (red) (Thermo Scientific).

**Клеточные *in vitro* модели БП** индуцировали в культуре гибридных мотонейрон-нейробластома VSC 4.1 (vental spinal cord cells) клеток, любезно предоставленных (Dr. Appel S.H.) и SH-SH5Y клеток нейробластома. Клетки культивировали в Corning 75 см<sup>2</sup> флаконах при 37°C, во влажной атмосфере воздуха и заданной концентрации CO<sub>2</sub> (5%). Прирост и морфологию клеток оценивали под микроскопом при 10-, 20- и 40-кратном увеличении.

VSC 4.1 клетки дифференцировали (0.5 мМ цАМФ, 0.4 мкг/мл афидиколина) в течение 5-7 дней. Культуральная среда: DMEM/Ham's F12 50/50 Mix с добавлением пенициллина (100 IU/мл), стрептомицина (100 мкг/мл), 2% раствора компонентов Sato [Bottenstein & Sato, 1979] и 2% эмбриональной бычьей сыворотки (HyClone). На 7-й день дифференциации VSC 4.1 мотонейроны инкубировали с МФП<sup>+</sup> (10-500 мкМ) или ротеноном (10-500 нМ).

SH-SY5Y клетки культивировали в среде DMEM/Ham's F12 50/50 Mix с L-глутамином и 15 мМ глутамин-NEPES, с добавлением пенициллина, стрептомицина, 10% эмбриональной бычьей сыворотки (heat-inactivated). Для дифференциации в дофаминергический (SH-SY5Y-DA) или холинергический (SH-SH5Y-ChAT) фенотипы использовали ретиноевую кислоту (РК, 10 мкМ) или РК (10 мкМ) с форбол-12-миристат-13-ацетатом (ФМА, 80 нМ) [Presgraves et al. 2004; Xie et al., 2010]. Фенотипы клеток подтверждали маркерными ферментами. После инкубации с МФП<sup>+</sup> или ротеноном клетки собирали в пробирки, осаждали (14.000 x g, 5 мин) и замораживали (-20°C). Из клеток, предварительно обработанных ультразвуком, получали белковые препараты для иммуноблоттинга.

**Жизнеспособность клеток** оценивали с использованием желтого тетразолиевого красителя – 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-тетразолиум бромида (МТТ), который восстанавливается дегидрогеназами митохондрий живых клеток до нерастворимых пурпурных кристаллов формазана. Количество последних, после растворения, определяли колориметрически при длине волны 570 нм за вычетом фонового поглощения при 630 нм [Mosmann, 1983]. Показатели оптической плотности (ОП) переводили в проценты (%).

**Уровень свободного  $\text{Ca}^{2+}$**  измеряли с помощью ратиометрического красителя Fura-2 АМ по описанному методу [Grynkiewicz et al., 1985; Butler et al., 2009]. После 24 ч инкубации клеток с МФП<sup>+</sup> или ротеноном, культуральную среду насыщали Fura-2 АМ. Флуоресценцию (R) регистрировали при длине волны эмиссии 510 нм и двойном возбуждении (340 и 380 нм). Концентрацию  $\text{Ca}^{2+}$  вычисляли по уравнению  $[\text{Ca}^{2+}]_i =$

$K_d(R-R_{min})/(R_{max}-R)$ ;  $R_{max}$  и  $R_{min}$  определяли в присутствии дигитонина (25 мкМ) и ЭГТА (5 мМ), соответственно.

**Окрашивание клеток эозином и гематоксилином (*in situ* Wright's stain)** применяли для морфологической оценки клеток; окрашенные клетки фотографировали под микроскопом (Olympus BH-2, световой фильтр, ув. 200x). При окраске гематоксилином базофильные клеточные структуры, содержащие нуклеиновые кислоты ДНК и РНК (клеточное ядро, рибосомы, богатые РНК участки цитоплазмы), приобретают ярко-синий цвет, а при окраске эозином эозинофильные структуры, содержащие внутри- и внеклеточные белки (тельца Леви, цитоплазма) приобретают розово-красный цвет. Апоптотические клетки идентифицировали по характерным морфологическим признакам, таким как уменьшение цитоплазматического объема, укорочение отростков (нейритов), конденсация хроматина.

**Внутриклеточный и общий уровень АФК** определяли красителем CM-H2DCFDA (Life Technologies). Интенсивность флуоресценции регистрировали при возбуждении (485 нм) и эмиссии (538 нм). Для оценки уровня АФК в культуре клеток *in situ* препараты фотографировали при увеличении 200x; по микроснимкам считывали интенсивность флуоресценции красителя, показатели выражали в условных единицах (arbitrary units).

**Для экстракции геномной ДНК** из тканей и клеточных суспензий использовали коммерческий кит (Wizard® Genomic DNA Purification Kit, Promega). Фрагментацию ДНК определяли путем электрофореза в агарозном геле (1%) с добавлением флуоресцентного красителя SYBR Safe. ДНК визуализировали на трансиллюминаторе с ультрафиолетовой лампой (Alpha-Innotech UV transilluminator, FluorChem FC2 Imaging System). Фрагменты ДНК определяли по сопоставлению образцов и стандарта (100 bp DNA ladder, Promega).

**Методом полимеразной цепной реакции (ПЦР)** определяли транскрипционную экспрессию  $\mu$ -, m-кальпаина и кальпастатина в тканях спинного мозга человека [Shields et al., 1999]. Для амплификации продуктов ПЦР аликвоты cDNA инкубировали с праймерами олигонуклеотидов: CAPN1 calpain 1, large unit  $\mu$ -calpain (239 bp); CAPN2 calpain 2, large unit m-calpain (131 bp), CAST calpastatin (188 bp). Для внутреннего контроля проводили амплификацию 18S рибосомальной РНК человека (18S ribosomal RNA, 245 bp) и  $\beta$ -актина (ACTB  $\beta$ -actin, 198 bp). Реакции амплификации: 1 цикл при 95°C (10 мин), 40 циклов при 95°C (30 сек), затем при 60-65°C и 72°C (по 1-й мин), 1 цикл при 72°C (10 мин), остановка реакции при 4°C. Продукты ПЦР разделяли электрофорезом на прекастных гелях (Mini-PROTEAN 10% TBE, Bio-Rad) при 100 V (2 часа). Гели инкубировали (5-10 мин) с красителем ДНК SYBR Safe (Molecular probes), растворенном в Трис-ЭДТА буфере (pH 8.0). Флуоресценцию продуктов ПЦР считывали на трансиллюминаторе под ультрафиолетовым светом (Alpha-Innotech UV transilluminator, FluorChem FC2 Imaging System). ОП продуктов на электрофореграммах определяли по программе NIH ImageJ 1.63.

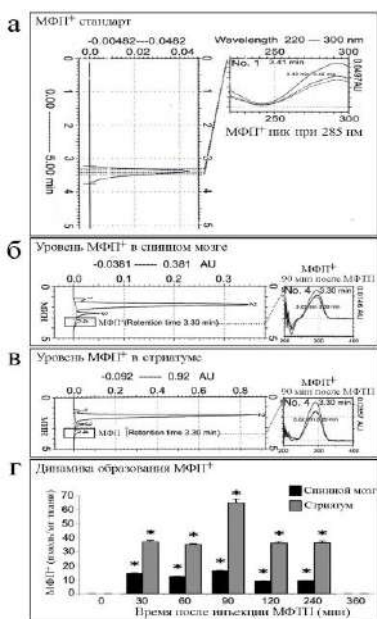
**Методом проточной цитометрии (Flow Cytometry)** анализированы субпопуляции Т клеток (CD4 и CD8) в спленоцитах мышей, следуя описанию [Trager et al., 2014].

**Статистический анализ данных.** Для статистической обработки использовали показатели интенсивности иммунофлуоресценции с микроснимков в условных единицах (NIH ImageJ 1.45) и данные денситометрии иммунореактивных белковых полос на электрофореграммах (NIH ImageJ 1.63). Используемые программы: Microsoft Office Excel, Stat View (Abacus Concepts), Graphpad Prism-5.0, метод однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA). Достоверность различий между средними значениями определяли по t-критерию Фишера-Стьюдента. Показатели  $M \pm SEM$ , где M (mean) – средняя арифметическая величина значений, SEM (standard error mean) – средняя стандартная ошибка, переведены в проценты (%) и представлены в виде гистограмм. Относительные различия значений между контрольными и экспериментальными группами были приняты как статистически достоверные при  $p < 0.05$ .

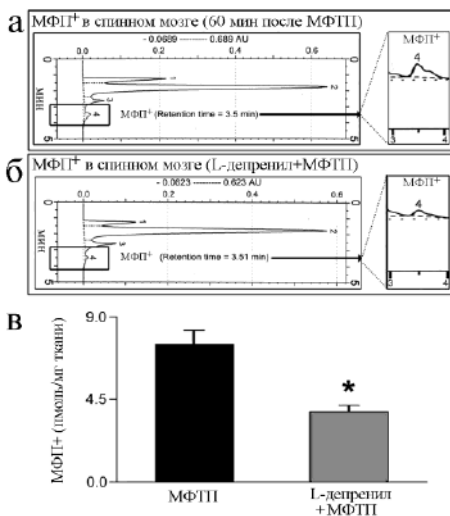
## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

### 1. МЕХАНИЗМЫ НЕЙРОТОКСИЧНОСТИ МФТП В ГОЛОВНОМ И СПИННОМ МОЗГЕ C57BL/6N МЫШЕЙ

В этом разделе представлено доказательство ферментатического превращения МФТП в МФП<sup>+</sup> в препаратах спинного мозга и стриатума C57BL/6N мышей при участии MAO-B, ДАТ и высокоаффинного захвата МФП<sup>+</sup>. Данные ВЭЖХ, регистрируемые в течение 360 после однократного введения МФТП мышам, показали достоверные ( $p \leq 0.001$ ;  $n=6$ ) изменения МФП<sup>+</sup> в гомогенатах спинного мозга (Рис. 1, б) по сравнению с содержанием вещества на нулевой (0) мин, в соответствии со стандартным пиком МФП<sup>+</sup> (285 нм; RT=3.41 мин) (Рис. 1, а). Максимальный уровень МФП<sup>+</sup> в гомогенатах спинного мозга и стриатума (*in vivo*) был зарегистрирован на 90-й мин (RT=3.30 мин) и составлял  $15.11 \pm 2.5$  и  $60.05 \pm 1.2$  пмоль/мг ткани, соответственно, с 4-х кратным преобладанием МФП<sup>+</sup> в стриатуме. (Рис. 1, б, в). На 120-й мин уровень МФП<sup>+</sup> в стриатуме и спинном мозге снижался, достигнув начальных показателей, а на 360-й мин – опустился до нулевой отметки (Рис. 1, г). Эти данные объясняют нейротоксичность МФТП в спинном мозге и обосновывают дальнейшее изучение механизмов нейродегенерации спинного мозга в МФТП-индуцируемой модели БП.



**Рис. 1.** Регистрация на ВЭЖХ уровня МФП<sup>+</sup> в гомогенатах (б) спинного мозга и (в) стриатума C57BL/6N мышей (г) Динамика образования МФП<sup>+</sup> ( $M \pm SEM$ ;  $*p \leq 0.001$ ;  $n=6$ ).



**Рис. 2.** Регистрация на ВЭЖХ превращения МФТП в МФП<sup>+</sup> и количественная оценка уровня МФП<sup>+</sup> в гомогенатах спинного мозга мышей под действием L-депренила *in vitro*. ( $M \pm SEM$ ;  $p \leq 0.01$ ;  $n=3$ ).

Превращение МФТП в МФП<sup>+</sup> в спинном мозге *in vivo* показано также в присутствии ингибитора МАО-Б – L-депренила (1 мг/кг, в/б), который вводили за 30 мин до инъекции МФТП. Анализ хроматограмм показал, что через час после введения МФТП в гомогенатах спинного мозга мышей, получивших L-депренил, уровень МФП<sup>+</sup> достоверно снижался на 49.23% ( $p \leq 0.01$ ;  $n=3$ ) по сравнению с контролем (Рис. 2, а, б, в). Образование МФП<sup>+</sup> в стриатуме и спинном мозге подавлялось под действием L-депренила в одинаковой степени – на 50% ( $p \leq 0.01$ ;  $n=3$ ), по сравнению с контролем, что указывало на сходство механизмов метаболизма МФТП в этих отделах ЦНС.

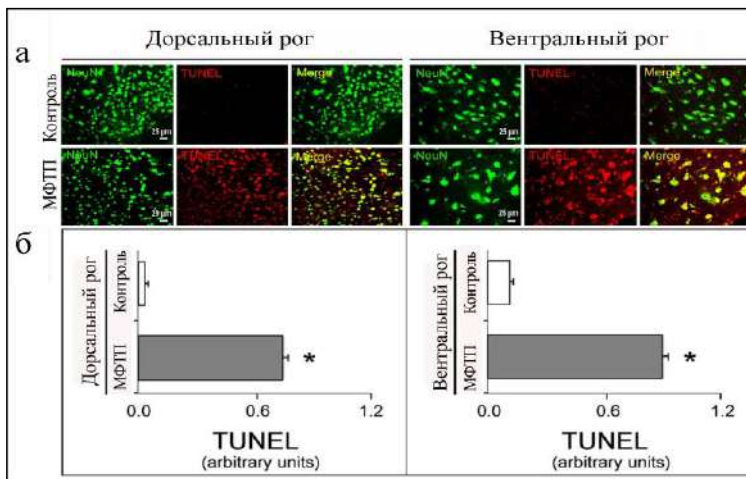
Содержание МФП<sup>+</sup> в митохондриях спинного мозга и стриатума *in vitro* составляло 95 и 130 пмоль/мг белка/мин, соответственно, с преобладанием МФП<sup>+</sup> в митохондриях стриатума в 1.36 раз, возможно вследствие разной активности МАО-Б в этих отделах. Образование МФП<sup>+</sup> достоверно ( $p \leq 0.01$ ;  $n=3$ ) подавлялось под действием L-депренила (40 нМ) в митохондриях стриатума (на 83%) и спинного мозга (на 95%), возможно вследствие прямого действия L-депренила на митохондриальный фермент МАО-Б.

Результаты ИМФО показали иммулокализацию МАО-Б в перинуклеарной области дорсальных сенсорных нейронов и вентральных мотонейронов спинного мозга. В исследованных тканях активность МАО-Б убывала в следующем порядке: печень>головной мозг>спинной мозг. Активность МАО-Б и МАО-А в митохондриальных фракциях спинного мозга составляла 5.89 и 2.36 нмоль 4-ГХК/мг митохондриального белка/мин, соответственно. Данные подтверждают роль МАО-Б в метаболизме МФТП в спинном мозге C57BL/6N мышей. Следовательно, применяемые в фармакотерапии БП ингибиторы МАО-Б могут действовать и в головном, и в спинном мозге, что следует учесть в клинической практике. Токсичность МФП<sup>+</sup> обусловлена также его синаптическим захватом. В работе показан ДАТ-опосредованный захват меченого <sup>3</sup>H-МФП<sup>+</sup> синапсосомами спинного мозга и установлена иммулокализация ДАТ в нейронах спинного мозга.

### ***Нейродегенерация в спинном мозге в МФТП-индуцированной модели БП***

C57BL/6N мышам в течение дня дважды с 6-ти часовым интервалом вводили МФТП (25 мг/кг, в/б) и на 7-й день животных декапитировали. Вырождение нейронов спинного мозга оценивали по результатам двойного ИМФО срезов – TUNEL (*красный*) в сочетании с NeuN (*зеленый*). При исследовании образцов поясничного отдела спинного мозга контрольных мышей были выявлены интактные ядра маленьких сенсорных нейронов дорсального рога и более крупные ядра мотонейронов вентрального рога при отсутствии участков колокализации TUNEL и NeuN (Рис. 3, а). У МФТП-инъектированных мышей были видны множественные участки TUNEL<sup>+</sup> ИМП, указывающие на поврежденные нейроны, при отсутствии TUNEL ИМП в контроле. Слияние микроснимков выявило участки колокализации TUNEL<sup>+</sup> и NeuN<sup>+</sup> (*желтый*) в поврежденных дорсальных нейронах и вентральных мотонейронах (Рис. 3, merge). Количественная оценка интенсивности иммунофлуоресценции показала достоверное ( $p \leq 0.05$ ;  $n \geq 4$ ) повышение TUNEL<sup>+</sup> ИМП в спинном мозге МФТП-инъектированных мышей по сравнению с контролем, что свидетельствует о высокой степени уязвимости нейронов спинного мозга к нейротоксичности МФТП.

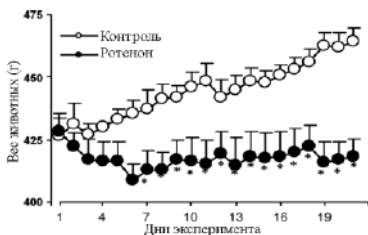
Подытоживая результаты этой серии исследований, можно заключить, что в спинном мозге нейротоксическое действие МФТП обусловлено его метаболическим превращением в МФП<sup>+</sup> при участии МАО-Б и ДАТ-опосредованного захвата МФП<sup>+</sup> нервными окончаниями. Следовательно, нейроны и мотонейроны спинного мозга являются прямыми мишенями протоксина МФТП и его активного метаболита МФП<sup>+</sup>.



**Рис. 3.** (а) Иммунофлуоресцентные микроснимки срезов спинного мозга контрольных и МФТП-инъецированных C57BL/6N мышей (ув. 200х). (б) Интенсивность TUNEL<sup>+</sup> (arbitrary units); M±SEM; \* $p \leq 0.05$ ;  $n \geq 4$ .

## 2. МЕХАНИЗМЫ НЕЙРОДЕГЕНЕРАЦИИ В СПИННОМ МОЗГЕ КРЫС В РОТЕНОН-ИНДУЦИРОВАННОЙ МОДЕЛИ БП

Ингибирование ротенонем активности комплекса I в митохондриальной дыхательной цепи влияет на метаболические процессы и в нервной системе, и во всем организме животных. Результаты ежедневного мониторинга веса Lewis крыс показали, что последствия действия ротенона стали проявляться уже в первую неделю эксперимента. Ротенон-инъецированные крысы теряли в весе, тогда как контрольные – наоборот, прибавляли (Рис. 4). К концу 3-й недели весовой разрыв между группами достиг максимума при показателях  $464 \pm 2.8$  г и  $420 \pm 4.2$  г у контрольных и ротенон-инъецированных крыс, соответственно.



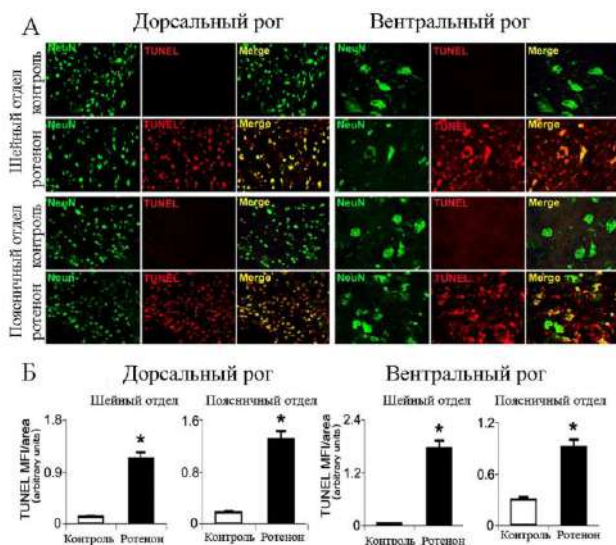
**Рис. 4.** Мониторинг веса контрольных и ротенон инъецированных Lewis крыс (M±SEM; \* $p \leq 0.05$   $n > 9$ ).

### *Нейродегенерация, активация астроглии и микроглии в спинном мозге*

Хроническое ингибирование комплекса I ротенонем ведет к развитию митохондриальной дисфункции и оксидативного стресса в отделах ЦНС, связанных с БП [Sherer et al., 2003; Talpade et al., 2000], что может вызвать повреждение нейронов, астроглиоз и микроглиоз в головном и спинном мозге. Решающим звеном в каскаде реакций, индуцированных ротенонем, является нарушение баланса и аккумуляция  $Ca^{2+}$  внутри

клеток, активацию  $Ca^{2+}$ -зависимых протеаз, кальпаина и каспазы-3 [Jacobson & Duchon, 2004; Ray & Banik, 2003]. Последние расщепляют белок цитоскелета спектрин, что ведет к нарушению целостности и разрушению нейронов спинного мозга.

Результаты ИМФО поперечных срезов спинного мозга (5 мкм) показали, что системное введение ротенона Lewis крысам в течение 21-го дня вызывает повышение TUNEL<sup>+</sup> ИМР; определяются участки колокализации TUNEL<sup>+</sup>-NeuN<sup>+</sup> и TUNEL<sup>+</sup>-ChAT<sup>+</sup>, обозначая поврежденные дорсальные нейроны и вентральные мотонейроны при отсутствии TUNEL ИМР в контроле (Рис. 5, а). Рост уровня TUNEL<sup>+</sup> в шейном и поясничном отделах спинного мозга ротенон-инъектированных крыс по сравнению с контролем составлял 90% и 87% в дорсальном роге, 97% и 89% в вентральном роге, соответственно. Показатели повышения TUNEL<sup>+</sup> ИМР в области ChAT<sup>+</sup> мотонейронов в шейном (на 92%) и в поясничном отделах (на 96%) по сравнению с контролем ( $p < 0.05$ ,  $n \geq 4$ ) указывают на высокую чувствительность нейронов и мотонейронов спинного мозга к нейротоксичности ротенона.



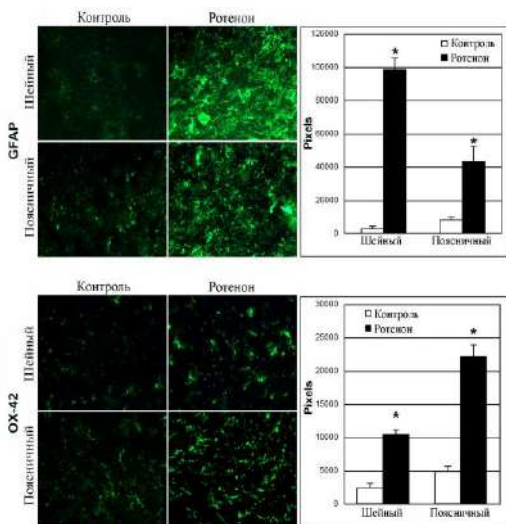
**Рис. 5.** Нейродегенерация в спинном мозге ротенон-инъектированных крыс.

(а) TUNEL<sup>+</sup> ИМР (красный), NeuN<sup>+</sup> (зеленый) и их слияние (Merge, желтый) в поврежденных нейронах; ув. 200х.

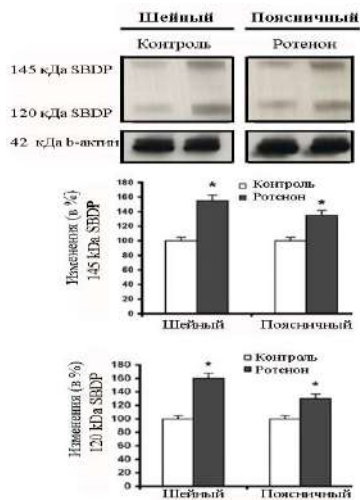
(б) TUNEL<sup>+</sup> (arbitrary units); M±SEM; \* $p < 0.05$ ,  $n \geq 4$ .

Исследования на ротеноновой модели БП демонстрируют сопряженность процессов нейродегенерации и нейровоспаления. Ротенон индуцирует нейровоспалительный ответ в спинном мозге, который проявляется в виде астроглиоза (GFAP<sup>+</sup>) и микроглиоза (OX-42<sup>+</sup>), при отсутствии ИМР на GFAP и OX-42 в контроле (Рис. 6). В количественном отношении достоверное ( $p < 0.05$ ,  $n \geq 4$ ) повышение уровня GFAP<sup>+</sup> ИМР составляло 97% и 81%, а OX-42 ИМР – 77% и 77%, соответственно в шейном и поясничном отделах спинного мозга. По данным иммуноблоттинга под действием ротенона достоверно ( $p < 0.05$ ) повышается уровень специфических продуктов распада 270 кДа спектрина (SBDP), как результат роста протеолитической активности кальпаина и каспазы-3. По сравнению с контролем, уровень 145 кДа кальпаин-SBDP повышался на 55% и 35%, а уровень 120 кДа каспаза-3-SBDP – на 60% и 30% в шейном и поясничном отделах спинного мозга, соответственно (Рис. 7). Можно заключить, что в ротенон-индуцированной модели БП активация кальпаин-опосредованного пути играет ключевую роль в процессе повреждения и вырождения нейронов спинного мозга.





**Рис. 6.** Астроглиоз и микроглиоз в спинном мозге ротенон-инъектированных крыс по сравнению с контролем. Слева: микроснимки GFAP<sup>+</sup> и OX-42<sup>+</sup> ИМП (зеленый), ув. 200х. Справа: интенсивность GFAP<sup>+</sup> и OX-42<sup>+</sup> (Pixels; M±SEM; \**p*<0.05, n≥4).



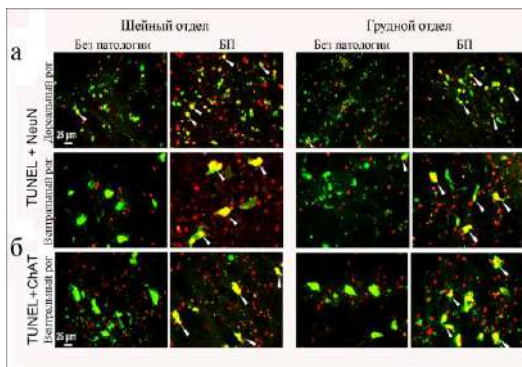
**Рис. 7.** Иммуноблоты и изменение уровней кальпаин- и каспаза-3-специфических продуктов распада спектрина (SBDP) в спинном мозге ротенон-инъектированных и контрольных крыс (M±SEM в %; \**p*<0.05).

### 3. ИССЛЕДОВАНИЕ ОБРАЗЦОВ СПИННОГО МОЗГА БОЛЬНЫХ БП

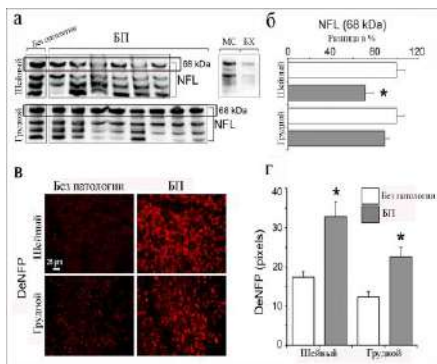
#### Дегенерация нейронов и аксонов

Были исследованы аутопсийные образцы шейного (n=6) и грудного (n=8) отделов спинного мозга больных БП и неврологически здоровых лиц (n=4). Результаты ИМФО поперечных срезов (5 мкм) с использованием TUNEL (красный) в комбинации с NeuN или ChAT (зеленый) показали множественные участки TUNEL<sup>+</sup> ИМП в спинном мозге больных БП и были выявлены участки колокализации TUNEL<sup>+</sup>-NeuN<sup>+</sup> и TUNEL<sup>+</sup>-ChAT<sup>+</sup> (желтый), указывая на поврежденные нейроны и мотонейроны в спинном мозге при БП (Рис. 8, а, б). Без патологии колокализация TUNEL с нейромаркерами незначительна.

Впервые в спинном мозге больных БП была выявлена аксональная патология, определяемая по снижению (на 29%; *p*<0.05) уровня 68 кДа нейрофиламентного легкого белка (NFL, neurofilament light protein) по сравнению с нормой (Рис. 9, а, б). Следует отметить, что при МС (n=2) и БХ (n=2) нейрофиламентный легкий белок почти полностью лизирован. Результаты ИМФО с использованием моноклональных SMI-311R антител показали, что уровень дефосфорилированного белка нейрофиламента (deNFP) в области белого вещества спинного мозга больных БП выше по сравнению с нормой на 53% и 55% (*p*≤0.05), соответственно, что также указывало на аксональную патологию (Рис. 9, в, г). Полученные данные позволяют рассматривать изменения в содержании нейрофиламентных белков в качестве биомаркеров аксональной дегенерации и как точку приложения нейропротекторных средств с целью предотвращения или замедления процессов нейроаксональной дегенерации в спинном мозге.



**Рис. 8.** Нейродегенерация в спинном мозге при БП. (а, б) Колокализации TUNEL<sup>+</sup>-NeuN<sup>+</sup> и TUNEL<sup>+</sup>-ChAT<sup>+</sup> (желтый) в поврежденных нейронах и мотонейронах при БП и их незначительное количество в норме; ув. 200х.



**Рис. 9.** Аксональная патология в спинном мозге при БП. (а, б) Иммуноблоты и изменение уровня NFL (M±SEM в %). (в, г) deNFP<sup>+</sup> (красный) и его уровень в белом веществе спинного мозга при БП и в норме (ув. 200х; Pixels; M±SEM; \*p≤0.05).

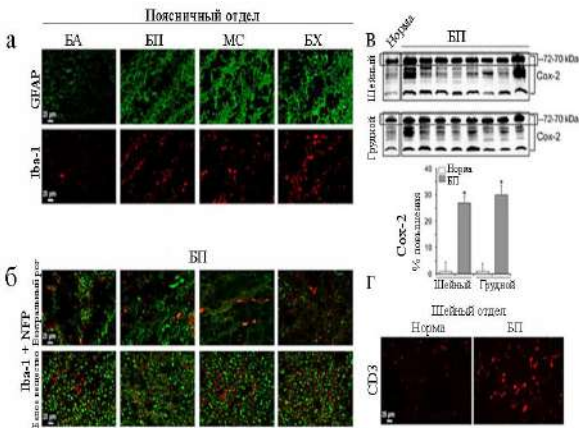
### Активация медиаторов воспаления

Активация глии и повышенная экспрессия *Sox-2* характерны для нейродегенеративных заболеваний, включая БП, МС, БХ, травмы головного и спинного мозга [McGeer & McGeer, 2008; Ray & Vanik 2003]. Сигнальная роль глии в развитии нейровоспалительного ответа заключается в активации провоспалительных факторов, таких как активные формы кислорода (АФК), оксид азота (NO), цитокины TNF-а и IL-6. Воспалительные факторы секретируются из реактивной глии, губительно действуя на нейроны [Smith et al., 2012]. Есть мнение, что *Sox-2* потенцирует нейровоспалительный ответ через активацию микроглии и содействует повреждению и гибели дофаминергических нейронов [Teismann et al., 2003].

Медиаторы воспаления в срезах тканей шейного, грудного и поясничного отделов спинного мозга больных БП (*postmortem*) определяли методом ИМФО. Для сравнения были исследованы аутопсийные образцы спинного мозга неврологически здоровых лиц, а также лиц с диагнозом БА, МС (множественный склероз) и БХ (болезнь Хантингтона).

В спинном мозге больных БП установлен повышенный уровень ИМР на GFAP и Iba-1 (маркер микроглии/макрофаг-специфического кальций-связывающего белка), что указывает на явления астроглиоза и микроглиоза, а повышенный уровень ИМР на Iba-1 и NFP (SMI312, маркер пан-аксонального нейрофиламента) – на распространение микроглиоза в белое вещество и вентральную область серого вещества спинного мозга (Рис. 10, а, б).

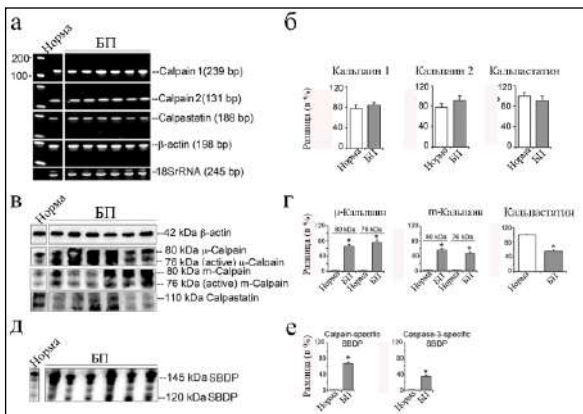
Иммуноблоттинг показал, что при БП уровень медиатора воспаления циклооксигеназы-2 (*Sox-2*, 72-70 кДа) в шейном и грудном отделах спинного мозга превышает показатели в норме на 27% и 30% ( $p < 0.05$ ; n=8), соответственно (Рис. 10, в). Повышенный уровень ИМР на CD3 – маркер клеток Т, свидетельствует о присутствии этих клеток в спинном мозге при БП, вероятно, в результате их инфильтрации; в норме уровень CD3 ниже (Рис. 10, г).



**Рис. 10.** Астроглиоз (GFAP<sup>+</sup>), микроглиоз (Iba-1<sup>+</sup>) и рост уровня медиаторов воспаления Sox-2 и CD3 в спинном мозге больных БП по результатам ИМФО и иммуноблоттинга (M±SEM в %).

### Активация кальпаина и дерегуляция кальпастина

Аутопсийные образцы спинного мозга больных БП (n=6) и неврологически здоровых лиц (n=4) были исследованы на наличие активного кальпаина методом иммуноблоттинга с использованием антител к инактивному (80 кДа) и активному (76 кДа) кальпаину и их микро- (μ) и милли- (m) форм. Изменения уровней транскрипционной экспрессии кальпаина и кальпастина оценивали методом ПЦР и иммуноблоттинга продуктов ПЦР. Согласно данным, по сравнению с нормой существенных изменений в экспрессии кальпаина и кальпастина при БП (n=6) не отмечалось (Рис. 11, а, б). Установлено повышенное содержание m- и μ-кальпаина (80 кДа) при БП по сравнению с нормой; разница составляла 50–70% в случае активного 76 кДа кальпаина и 55–65% в случае инактивного 80 кДа кальпаина ( $p \leq 0.05$ ) (Рис. 11, в, г). В спинном мозге больных БП уровень эндогенного ингибитора кальпаина кальпастина достоверно ниже, чем в норме (на 30%;  $p \leq 0.05$ ). Уровни 145 кДа кальпаин- и 120 кДа каспаза-3-специфических продуктов распада спектрина (SBDP) были выше в спинном мозге больных БП, чем в норме на 68% и 38% ( $p \leq 0.05$ ), (Рис. 11, д, е). Это подтверждает наше предположение о том, что при БП дегенеративные процессы в спинном мозге протекают на фоне активации кальпаина.



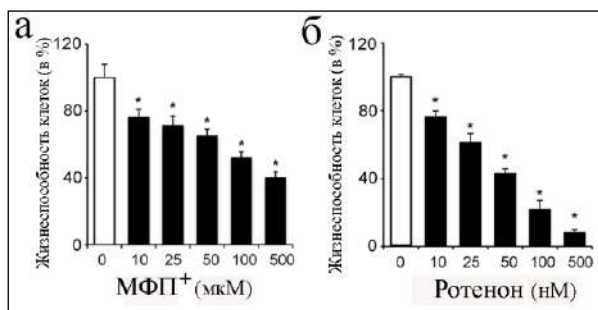
**Рис. 11.** (а, б) Транскрипционная экспрессия кальпаина и кальпастина в спинном мозге при БП и в норме. (в, г, д, е) Иммуноблоты и изменение уровней кальпаина, кальпастина, кальпаин- и каспаза-3-специфических продуктов распада спектрина (M±SEM в %).

#### 4. МЕХАНИЗМЫ НЕЙРОТОКСИЧНОСТИ МФП<sup>+</sup> И РОТЕНОНА В КУЛЬТУРЕ VSC 4.1 МОТОНЕЙРОНОВ *IN VITRO*

##### ЦИТОПРОТЕКТОРНЫЙ ЭФФЕКТ КАЛЬПЕПТИНА В КУЛЬТУРЕ VSC 4.1 МОТОНЕЙРОНОВ

###### *Влияние МФП<sup>+</sup> и ротенона на жизнеспособность VSC 4.1 мотонейронов*

Ключевые механизмы цитотоксического действия паркинсонических токсинов МФП<sup>+</sup> и ротенона были изучены на культуре гибридных мотонейрон-нейробластома клеток линии VSC 4.1. Дифференциация VSC 4.1 клеток вызывает индукцию специфичных для мотонейронов млекопитающих ферментов (холинацетилтрансфераза, нейроспецифическая энзолаза, иммунореактивный белок нейрофиламента), что позволяет рассматривать VSC 4.1 клетки в качестве *in vitro* модели мотонейронов спинного мозга [Smith et al., 1994]. По показателям МТТ теста на жизнеспособность клеток установлены рабочие концентрации для МФП<sup>+</sup> – 25 и 100 мкМ, для ротенона – 10 и 50 нМ, при оптимальном времени инкубации с токсинами 24 ч (Рис. 12, а). Величина LC<sub>50</sub> (lethal concentration) для МФП<sup>+</sup> составляет 100 мкМ, для ротенона – 50 нМ.

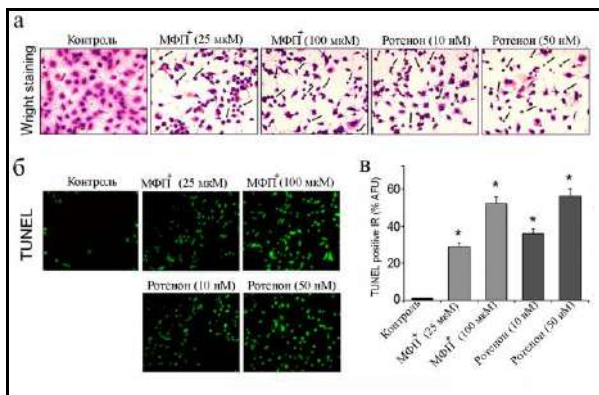


**Рис. 12.** Изменение жизнеспособности VSC 4.1 мотонейронов под действием (а) МФП<sup>+</sup> (0-500 мкМ) и (б) ротенона (0-500 нМ) (M±SEM в %; \**p*≤0.05; n=4-6).

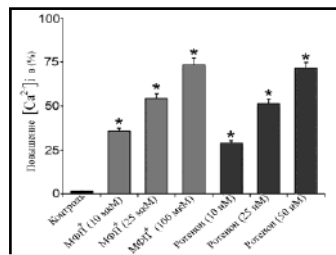
При инкубации VSC 4.1 мотонейронов с МФП<sup>+</sup> или ротеноном морфологические изменения (*in situ* Wright's stain) проявлялись уже через 6 ч инкубации, а по истечении 36 ч интактные клетки почти полностью исчезали (Рис. 13, а). Сначала наблюдалось изменение формы, уменьшение размеров, истончение и сокращение отростков мотонейронов. Затем контуры клеток становились расплывчатыми, клеточная цитоплазма сжималась, исчезали полюсные и боковые отростки; конденсация хроматина приводила к сморщиванию ядер. С появлением округлых плавающих апоптотических клеток плотность мотонейронов снижалась. Высокие концентрации МФП<sup>+</sup> (100 мкМ) и ротенона (50 нМ) вызывали гибель около 50% мотонейронов; оставшиеся клетки приобретали укороченную форму с искаженным контуром. Под действием нейротоксинов возрастала TUNEL<sup>+</sup> ИМР по сравнению с контролем. При низких концентрациях МФП<sup>+</sup> (25 мкМ) и ротенона (10 нМ) интенсивность TUNEL<sup>+</sup> ИМР повышалась в 3-4 раза, а при высоких концентрациях МФП<sup>+</sup> (100 мкМ) и ротенона (50 нМ) – в 5-6 раз, по сравнению с контролем (*p*≤0.05; n≥4).

###### *Повышение $вк[Ca^{2+}]$ , активация кальпаина и каспазы-3*

При инкубации мотонейронов с МФП<sup>+</sup> (25, 50, 100 мкМ) или ротеноном (10, 25, 50 нМ) наблюдался рост  $вк[Ca^{2+}]$  в концентрационной зависимости (Рис. 14). Уровень  $вк[Ca^{2+}]$  достоверно повышался (*p*≤0,05; n=3) в 2-2.5 раза по сравнению с уровнем  $вк[Ca^{2+}]$  в контроле. Абсолютное значение  $вк[Ca^{2+}]$  в контроле составляло 80 ± 7.3 нМ (n=3).

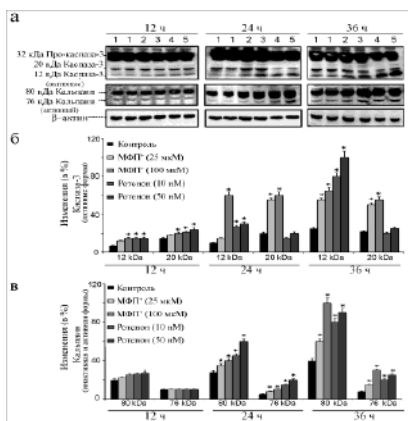


**Рис. 13.** Апоптоз VSC 4.1 мотонейронов. (а) Микроснимки VSC 4.1 мотонейронов в контроле и под действием МФП<sup>+</sup> (25 и 100 мкМ) и ротенона (10 и 50 нМ). (б, в) TUNEL<sup>+</sup> ИМР в контроле и под действием МФП<sup>+</sup> и ротенона (ув. 200х; М±SEM в %).



**Рис. 14.** Рост уровня вк[Ca<sup>2+</sup>] в VSC 4.1 мотонейронах (M±SEM в %; \*p≤0.05; n=3).

Рост уровня вк[Ca<sup>2+</sup>] в VSC 4.1 мотонейронах вызвал активацию Ca<sup>2+</sup>-зависимых протеаз кальпаина и каспазы-3 с образованием их активных форм – 76 кДа кальпаина, 20 кДа и 12 кДа каспазы-3 (Рис. 15). Результаты иммуноблоттинга показали временную (12, 24 и 36 ч) и концентрационную зависимость индукции активных форм протеаз от МФП<sup>+</sup> (25 и 100 мкМ) или ротенона (10 и 50 нМ). МФП<sup>+</sup> повышал экспрессию обеих активных форм каспазы-3, а ротенон – преимущественно ее 12 кДа формы (Рис. 15, б, в).



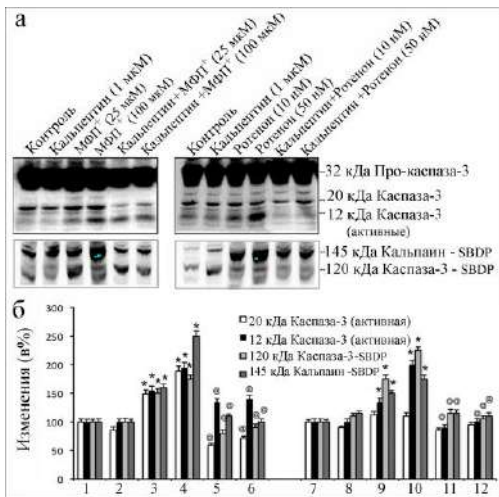
**Рис. 15.** Индукция активных форм каспазы-3 и кальпаина в мотонейронах.

(а) Иммуноблотты про-каспазы-3 (32 кДа), активных форм каспазы-3 (20 кДа и 12 кДа), неактивного (80 кДа) и активного (76 кДа) кальпаина.

(б, в) Изменение уровня активных форм каспазы-3 и кальпаина по сравнению с контролем (M±SEM в %; \*p≤0.05; n=3).

1- контроль; 2- МФП<sup>+</sup> (25 мкМ); 3- МФП<sup>+</sup> (100 мкМ); 4- ротенон (10 нМ); 5- ротенон (50 нМ).

Исходя из того, что МФП<sup>+</sup> и ротенон вызывают апоптоз мотонейронов через кальпаин-опосредованный механизм, нами был изучен цитопротекторный эффект ингибитора кальпаина – кальпептина. После преинкубации мотонейронов с кальпептином (1 мкМ; 30 мин), в культуральную среду добавляли МФП<sup>+</sup> (25 и 100 мкМ) или ротенон (10 и 50 нМ), продолжая инкубацию 24 ч. Кальпептин снижал экспрессию обеих активных форм каспазы-3 и, в результате чего падал уровень 145 кДа и 120 кДа специфических продуктов распада спектрина по сравнению с повышением, вызванным нейротоксинами (p≤0.05) (Рис. 16).



**Рис. 16.** Подавление экспрессии активных форм каспазы-3 в мотонейронах кальпектином.

(а, б) Иммуноблоты и изменение уровней про-каспазы-3 (32 кДа), активных форм каспазы-3 (20 кДа и 12 кДа) и SBDP под действием MPP<sup>+</sup> и ротенона по сравнению с контролем (\* $p \leq 0.05$ ) и под действием кальпектина ( $M \pm SEM$  в %; @ $p \leq 0.05$ ;  $n=3$ ).

1 и 7 – контроль; 2 и 8 – кальпектин (1 мкМ); 3 и 4 – MPP<sup>+</sup> (25 и 100 мкМ); 5 и 6 – кальпектин + MPP<sup>+</sup> (25 и 100 мкМ); 9 и 10 – ротенон (10 и 50 нМ); 11 и 12 – кальпектин + ротенон (10 и 50 нМ).

MPP<sup>+</sup> и ротенон вызывали повышение уровня TUNEL<sup>+</sup> ИМР в мотонейронах, тогда как в условиях преинкубации клеток с кальпектином эти показатели снижались. Под действием нейротоксинов нарушался баланс белков митохондриальных мембран Вах:Всl-2, которые обладают про- и анти-апоптотическими свойствами, что также указывало на активацию митохондриального пути апоптоза. При этом уровень Вах (24 кДа и 21 кДа) повышался, а уровень Всl-2 (26 кДа) снижался, что приводило к росту соотношения Вах:Всl-2 по сравнению с контролем, тогда как в присутствии кальпектина это соотношение снижалось ( $p \leq 0.05$ ;  $n=3$ ). Цитопротекторное действие кальпектина проявлялось также в предотвращении фрагментации ДНК, снижении экспрессии активного кальпаина и каспазы-3, подавлении распада спектрина, способствуя сохранению структурной и функциональной целостности мотонейронов. Можно заключить, что кальпектин ингибирует апоптоз мотонейронов уже на начальных стадиях, препятствуя активации кальпаина и каспазы-3.

## 5. МЕХАНИЗМЫ НЕЙРОТОКСИЧНОСТИ MPP<sup>+</sup> И РОТЕНОНА В КУЛЬТУРЕ SH-SY5Y КЛЕТОК *IN VITRO*

### ЦИТОПРОТЕКТОРНЫЙ ЭФФЕКТ SNJ-1945 – СИНТЕТИЧЕСКОГО ИНГИБИТОРА КАЛЬПАИНА

Механизмы нейротоксичности MPP<sup>+</sup> и ротенона и цитопротекторные свойства ингибитора кальпаина SNJ-1945 были изучены в культуре клеток нейробластомы SH-SY5Y, дифференцированных в дофаминергические (SH-SY5Y-DA) и холинергические (SH-SY5Y-ChAT) фенотипические клетки. Следует отметить, что научные работы с использованием дифференцированных SH-SY5Y клеток не часто встречаются в литературе, хотя именно такие культуры клеток позволяют с наибольшим приближением воспроизводить *in vitro* модели БП. Мы предположили, что MPP<sup>+</sup> и ротенон вызывают кальпаин-опосредованный апоптоз SH-SY5Y клеток, как это наблюдалось в культуре VSC 4.1 мотонейронов.

## ***Повышение $\text{вк}[\text{Ca}^{2+}]$ и активация кальпаина***

Инкубация SH-SY5Y-DA клеток с МФП<sup>+</sup> (50, 100 и 500 мкМ) или ротеноном (10, 50 и 100 нМ) в течение 24 ч приводила к достоверному повышению ( $p \leq 0.05$ ) уровня  $\text{вк}[\text{Ca}^{2+}]$  по сравнению с контролем. Результаты ИМФО, что МФП<sup>+</sup> (100 мкМ) и ротенон (50 нМ) вызывают индукцию активного  $\mu$ -кальпаина в SH-SY5Y-DA клетках. В контрольных препаратах активный  $\mu$ -кальпаин не обнаруживался.

## ***Влияние МФП<sup>+</sup> и ротенона на жизнеспособность SH-SY5Y клеток и цитопротекция под действием SNJ-1945***

Исходя из того, что нейротоксины вызывают  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимый рост уровня кальпаина, была проведена оценка цитопротекторного эффекта ингибитора кальпаина SNJ-1945. Клетки преинкубировали в культуральной среде с SNJ-1945 (10, 100 или 250 мкМ), затем продолжали инкубацию с МФП<sup>+</sup> или ротеноном в течение 24 ч. МТТ тест показал, что МФП<sup>+</sup> (50, 100 и 500 мкМ) или ротенон (10, 50 и 100 нМ) достоверно ( $p \leq 0.05$ ;  $n=6$ ) снижают выживаемость SH-SY5Y-DA клеток по сравнению с контролем. Морфологические изменения SH-SY5Y-DA клеток, обработанных нейротоксинами, выражались в уменьшении их размеров и конденсации ядер (Wright's stain). Ингибитор SNJ-1945 в концентрациях 100 мкМ и 250 мкМ повышал выживаемость клеток ( $p \leq 0.05$ ). При этом, оптимальная концентрация SNJ-1945 в 250 мкМ не вызывала заметных сдвигов в показателях цитологической устойчивости, что позволило исключить побочные действия ингибитора в дальнейших экспериментах.

## ***Снижение оксидативного стресса под действием SNJ-1945***

Митохондриальная дисфункция и нарушение баланса  $\text{вк}[\text{Ca}^{2+}]$  приводят к генерации активных форм кислорода (АФК). Использование флуоресцирующего красителя CM-H2DCFDA показало, что инкубация SH-SY5Y-DA клеток с МФП<sup>+</sup> (100 мкМ) или ротеноном (50 нМ) в течение 24 ч вызывает повышение внутриклеточного уровня АФК. При 72 ч инкубации с МФП<sup>+</sup> (100 мкМ) уровень АФК в клетках продолжал расти по сравнению с контролем ( $p \leq 0.05$ ;  $n=3$ ), но снижался в условиях преинкубации с SNJ-1945 (250 мкМ) ( $p \leq 0.05$ ;  $n=3$ ) относительно повышения, вызванного нейротоксином.

При 24 ч инкубации SH-SY5Y-ChAT клеток с нейротоксинами уровень АФК повышался незначительно, указывая на то, что оксидативный стресс и генерация АФК ассоциируются с дофаминергическим фенотипом клеток, тогда как холинергический фенотип устойчив к оксидативному стрессу. Это означает, что нейротоксичность МФП<sup>+</sup> и ротенона по-разному проявляется в SH-SY5Y-DA и SH-SY5Y-ChAT клетках.

## ***Снижение уровня медиаторов воспаления под действием SNJ-1945***

Исходя из того, что холинергические SH-SY5Y-ChAT клетки оказались устойчивыми к оксидативному стрессу, мы предположили альтернативный механизм вырождения клеток, сопряженный с воспалительным стрессом. Было изучено действие МФП<sup>+</sup> и ротенона на индукцию медиаторов воспаления Cox-2, каспазы-1 и его расщепленного фрагмента p10 в культуре SH-SY5Y-DA и SH-SY5Y-ChAT клеток. Результаты иммуноблоттинга показали относительно устойчивый уровень медиаторов воспаления в культуре SH-SY5Y-DA.

Однако в культуре SH-SY5Y-ChAT клеток и МФП<sup>+</sup>, и ротенон вызывали достоверное ( $p \leq 0.05$ ;  $n=3$ ) повышение уровня Cox-2 (на 35% и 32%), каспазы-1 (на 20% и 23%) и p10 (на 45% и 35%), соответственно, по сравнению с контролем ( $p \leq 0.05$ ;  $n=3$ ). В условиях

преинкубации клеток с SNJ-1945 (100 и 250 мкМ) уровень медиаторов воспаления снижался относительно повышения, вызванного нейротоксинами ( $p \leq 0.05$ ;  $n=3$ ).

Эти данные свидетельствуют о том, что в SH-SY5Y-ChAT клетках нейротоксины способствуют индукции медиаторов воспаления с заметным повышением их внутриклеточного уровня. Снижение уровня медиаторов воспаления под действием SNJ-1945 подтверждает активацию кальпаин-опосредованного пути повреждения клеток. Кальпаин вовлекается и в оксидативные, и воспалительные механизмы, которые становятся причиной повреждения и гибели SH-SY5Y-DA и SH-SY5Y-ChAT клеток.

### ***Снижение активности протеаз под действием SNJ-1945***

Для подтверждения активации кальпаин-опосредованного пути вырождения клеток определяли уровень специфических продуктов распада спектрина. Наиболее демонстративным результатом было то, что в культуре SH-SY5Y-DA клеток МФП<sup>+</sup> и ротенон вызвали повышение уровня 145 кДа кальпаин-специфического продукта распада спектрина по сравнению с контролем ( $p \leq 0.05$ ;  $n=3$ ), что указывало на экспрессию активного кальпаина; тогда как изменений в уровне активных форм каспазы-3 (12 кДа и 20 кДа) не отмечалось.

В условиях преинкубации SH-SY5Y-DA клеток с SNJ-1945 уровень 145 кДа кальпаин-специфического продукта распада спектрина снижался, относительно повышения, вызванного нейротоксинами ( $p \leq 0.05$ ;  $n=3$ ). В SH-SY5Y-ChAT клетках МФП<sup>+</sup> и ротенон вызвали достоверный ( $p \leq 0.05$ ;  $n=3$ ) рост про-каспазы-3 (на 40–65%) по сравнению с контролем, который снижался под действием SNJ-1945 (50, 100 или 250 мкМ), но при отсутствии изменений активных форм каспазы-3. Несмотря на то, что в SH-SY5Y-ChAT клетках экспрессия активного кальпаина не была установлена, SNJ-1945 снижал уровень кальпаин- и каспаза-3-специфических продуктов распада спектрина.

Отсюда следует, что под действием нейротоксинов происходит активация обеих протеаз, кальпаина и каспазы-3, которые через каскад реакций приводят к гибели SH-SY5Y-DA и SH-SY5Y-ChAT клеток. Отличные по фенотипу клетки по-разному реагировали на действие нейротоксинов, но одинаково поддавались цитопротекции SNJ-1945. В обработанных ингибитором SH-SY5Y-DA клетках снижался уровень активных протеаз кальпаина, каспазы-3 и каспазы-8, а в SH-SY5Y-ChAT клетках – медиаторов воспаления Cox-2, каспазы-1 и его фрагмента p10; сохранялась структурная целостность клеток.

Как отмечено выше, активация кальпаина и каспазы-3 и расщепление спектрина приводят к апоптозу VSC 4.1 мотонейронов. Таким образом, механизмы действия МФП<sup>+</sup> и ротенона на холинергические VSC 4.1 мотонейроны, дофаминергические SH-SY5Y-DA и холинергические SH-SY5Y-ChAT клетки во многом схожи. Полученные данные свидетельствуют о некоторой универсальности действия SNJ-1945, что расширяет возможность его тестирования и применения в качестве нейропротекторного средства.

## **6. НЕЙРОПРОТЕКТОРНЫЙ ЭФФЕКТ КАЛЬПЕПТИНА В СПИННОМ МОЗГЕ В МФТП-ИНДУЦИРОВАННОЙ МОДЕЛИ БП**

Механизмы нейропротекции под действием кальпептина в спинном мозге были изучены на *in vivo* МФТП-индуцированной модели БП. Использовали ранее разработанную схему введения нейротоксина, которая обеспечивает развитие хронической прогрессирующей модели БП.



Мышей линии C57BL/6N разделили на 4 группы: 1 – контроль (n=4); 2 – контроль + кальпептин (n=4); 3 – МФТП (n= 6); 4 – кальпептин + МФТП (n=6). МФТП вводили ежедневно по 25 мг/кг веса животного (в/б) в течение 5 последовательных дней.

Такой режим инъекций МФТП обеспечивал максимальную выживаемость животных (>90%). Фактором снижения смертности является тщательный уход за животными, включая обеспечение санитарного контроля их содержания и ежедневную смену подстилки в клетках. После окончания инъекций животных переносили в новые клетки. Мышей декапитуировали на 7-й день после последней инъекции МФТП. Было проведено три независимых эксперимента, результаты которых проанализированы и представлены ниже.

Кальпептин (EMD Biosciences) растворяли в ДМСО (2.5 мг/мл) и хранили при -20°C. Непосредственно перед инъекциями исходный раствор разбавляли в физиологическом растворе в соотношении 1:1000, на каждую инъекцию брали по 200–250 мкл (в соответствии с весом мышей), из расчета 25 мкг кальпептина на кг веса животных, учитывая, что низкая доза кальпептина (10 мкг/кг) не эффективна, а высокая (100 мкг/кг) – токсична. Кальпептин вводили за 30 мин до инъекции МФТП. Кумулятивная доза кальпептина, введенного в течение 5 дней каждому животному, составляла 125 мкг/кг. По нашим наблюдениям уровень выживаемости животных, получивших кальпептин, оставался таким же, что и в контрольной группе.

### ***Нейропротекторный эффект кальпептина в головном мозге***

Нейропротекторный эффект кальпептина в черной субстанции мышей линии C57BL/6N оценивали по результатам Western blot анализа и ИМФО. Образцы всех 4-х групп (контроль, кальпептин, МФТП, кальпептин+МФТП) анализировали одновременно. В случае необходимости число экспериментальных мышей увеличивали до 12–18 в каждой группе.

Результаты Western blot анализа показали достоверное ( $p<0.05$ ) повышение уровней обеих форм m-кальпаина – неактивной (80 кДа) и активной (76 кДа) в черной субстанции МФТП-мышей на 55% и 35%, соответственно, по сравнению с контролем. Параллельно отмечалось повышение кальпаин-специфического продукта распада спектрина (145 кДа SBDP) у МФТП-мышей по сравнению с контролем. Однако, в группе [кальпептин+МФТП] мышей уровни активного кальпаина и 145 кДа SBDP достоверно ( $p<0.05$ ) снижались относительно повышения, вызванного МФТП. Это указывало на то, что МФТП вызывает активацию кальпаина и кальпаин-опосредованного пути нейродегенерации дофаминергических клеток в черной субстанции. Кальпептин оказывает нейропротекторный эффект, ингибируя активный кальпаин и предотвращая распад спектрина.

Результаты ИМФО срезов черной субстанции показали, что в контрольных образцах сохраняются интактные TГ<sup>+</sup> нейроны, а сигналы ИМР на активный кальпаин отсутствуют, тогда как у МФТП-мышей наблюдалось достоверное снижение ИМР на TГ<sup>+</sup> на 55% ( $p<0.05$ ) по сравнению с контролем. Кроме того, у МФТП-мышей выявлены участки колокализации ИМР активного кальпаина и TГ<sup>+</sup> в дофаминергических нейронах (76 кДа).

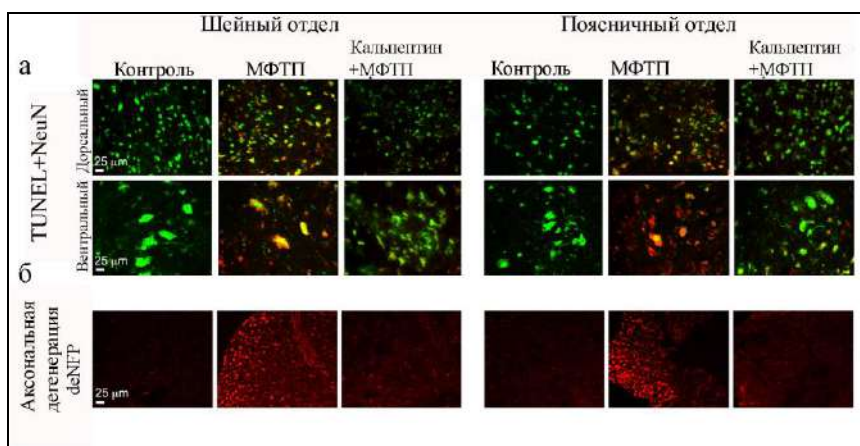
Введение кальпептина привело к восстановлению ИМР на TГ<sup>+</sup> в черной субстанции на 28% ( $p<0.05$ ) относительно снижения, вызванного МФТП. В группе [кальпептин+МФТП] участков колокализации активного кальпаина и TГ<sup>+</sup> стало меньше. Следует отметить, что введение кальпептина вызывало незначительные отклонения уровня TГ, что исключало возможное побочное действие ингибитора.

Полученные данные демонстрируют, что кальпептин оказывает нейропротекторное действие и предотвращает разрушительное действие МФТП на дофаминергические нейроны черной субстанции C57BL/6N мышей.

## Нейропротекторный эффект кальпептина в спинном мозге

Для оценки нейропротекторного эффекта кальпептина в спинном мозге использовали метод ИМФО срезов с иммуномаркерами TUNEL (*красный*) и NeuN (*зеленый*). При микроскопическом исследовании образцов шейного и поясничного отделов спинного мозга МФТП-инъектированных мышей были обнаружены участки интенсивной ИМР на TUNEL в зонах дорсального рога и вентрального рога, при отсутствии сигналов TUNEL в контроле. При слиянии микроснимков TUNEL и NeuN были видны участки колокализации TUNEL<sup>+</sup> с NeuN<sup>+</sup> (*желтый*), указывающие на поврежденные нейроны и мотонейроны в спинном мозге МФТП-инъектированных мышей. В контрольных образцах эти участки отсутствовали. В группе [кальпептин+МФТП] мышей число участков колокализации TUNEL<sup>+</sup>-NeuN<sup>+</sup> заметно сокращалось. Это означало, что кальпептин предотвращает повреждение нейронов и мотонейронов спинного мозга нейротоксином. Эти результаты еще раз подтверждают, что МФТП вызывает кальпаин-опосредованную нейродегенерацию как в nigростриатуме, так и в спинном мозге C57BL/6N мышей.

Как было показано выше (Рис. 9, а, б), при БП разрушается аксональный нейрофиламентный легкий белок (68 кДа), что может привести к структурным изменениям и функциональным нарушениям аксонов. Наряду с нейронами, важно было проверить действие кальпептина на аксональный белок. Результаты ИМФО показали, что в спинном мозге МФТП-инъектированных мышей, в отличие от контрольной группы, происходит рост уровня deNFP, что является показателем дегенерирующих аксонов в белом веществе. Введение кальпептина снижало ИМР на deNFP в спинном мозге мышей группы [кальпептин+МФТП], предотвращая разрушение структурного нейрофиламентного белка аксонов. Нейропротекторное действие кальпептина одинаково проявлялось в шейном и поясничном отделах спинного мозга. Фактически, кальпептин проникает в ткани спинного мозга и эффективно действует на кальпаиновую систему в сером и белом веществе. Можно полагать, что кальпептин обладает универсальным свойством, предотвращающим дегенерацию нейронов и аксонов в головном и спинном мозге C57BL/6N мышей.



**Рис. 17.** Нейропротекторный эффект кальпептина в спинном мозге.

(а) Микроснимки колокализации TUNEL<sup>+</sup> (*красный*) и NeuN<sup>+</sup> (*зеленый*) в группах: контроль, [МФТП], [кальпептин+МФТП]; ув. 200х. (б) Микроснимки ИМР на deNFP<sup>+</sup> (*красный*) в группах: контроль, [МФТП], [кальпептин+МФТП]; ув. 220х.

## *Снижение уровня медиаторов воспаления под действием кальпептина*

Нейротоксичность МФТП в ЦНС сопряжена с нейровоспалительным ответом, активацией и высвобождением медиаторов воспаления из иммунокомпетентной глии, что повышает риск повреждения дофаминергических нейронов [Litteljohn et al., 2011]. На животных моделях БП показана активация глии и инфильтрация CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т клеток в мозг [Fuzzati-Armentero et al., 2019]. Выделяемые микроглией TNF- $\alpha$ , интерферон- $\gamma$  и Cox-2 усиливают воздействие МФТП на нейроны, а сенсибилизация активной микроглии способствует выработке провоспалительных цитокинов и губительных кислородных радикалов.

Нейровоспалительные процессы в спинном мозге при БП недостаточно изучены. Нами была поставлена задача определения медиаторов воспаления в МФТП-индуцированной модели БП. Результаты ИМФО показали, что и в среднем мозге, и в вентральных областях шейного и поясничного отделов спинного мозга МФТП-инъекцированных мышей уровень ИМР на GFAP, Iba-1 и ED-2 повышается, указывая на активацию нейровоспаления и инфильтрацию макрофагов. В контрольных препаратах эти факторы почти не определялись. Исследование спинного мозга группы [кальпептин+МФТП] показало снижение ИМР на GFAP, Iba-1 и ED-2 по сравнению с МФТП-группой. Положительный уровень ИМР на CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т клетки отмечался в тканях шейного и поясничного отдела спинного мозга МФТП-инъекцированных мышей, что также указывало на активацию нейровоспалительных процессов, при незначительном уровне Т клеток в контроле. Предполагается, что присутствие Т клеток в головном и спинном мозге является результатом их миграции и инфильтрации в отделы ЦНС. Введение кальпептина снижало уровень Т клеток как в головном, так и в спинном мозге мышей группы [кальпептин+МФТП] по сравнению с [МФТП] группой.

Результаты иммуноблоттинга подтвердили активацию нейровоспалительных процессов в спинном мозге под действием МФТП. Было установлено достоверное ( $p < 0.05$ ;  $n = 8$ ) повышение уровня медиатора воспаления Cox-2 (на 39 %), каспазы-1 (на 22 %), и NOS-2 (на 112 %) у МФТП-инъекцированных мышей по сравнению с контрольной группой. В группе [кальпептин+МФТП] уровень медиаторов нейровоспаления достоверно ( $p < 0.05$ ) снижался по сравнению с группой [МФТП]. Согласно этим результатам, МФТП вызывает активацию медиаторов нейровоспаления и в головном, и спинном мозге мышей, тогда как ингибирование кальпаина кальпептином предупреждает распространение воспалительных процессов в ЦНС. Кальпептин подавляет активацию астроглии, микроглии и периферийных макрофагов, снижает экспрессию Cox-2, NOS-2 и каспазы 1, регулирует уровень Т клеток.

## *Модуляция активации Т клеток под действием кальпептина*

Мы предположили, что периферийные Т клетки задействованы в нейровоспалительных процессах в спинном мозге. С этой целью была поставлена задача определить изменения уровня популяций CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т клеток под действием МФТП и изучить возможную модуляторную роль кальпептина в этом процессе. Был проведен анализ содержания Т клеток в спленоцитах с использованием метода проточной цитометрии. В эксперименте были использованы три (3) группы животных: контрольные, МФТП- и кальпептин+МФТП-инъекцированные мыши. Объединенные фракции спленоцитов из поджелудочной железы мышей каждой группы были инкубированы с антителами к CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup>, конъюгированными с PerCP и FITC, соответственно, или с иммуномаркерами CD4-PerCP и Foxp3-APC, и было анализировано наличие в них Foxp3 регуляторных Т клеток. Исследования показали, что число CD4<sup>+</sup> клеток увеличивается под действием МФТП по сравнению с контролем (12.6 vs 19.9 %). Однако в популяции CD8<sup>+</sup> существенных изменений не наблюдалось.

Количество CD4<sup>+</sup> клеток уменьшалось (19.9 vs 12.6 %) под действием кальпептина. У МФТП-мышей рост определенной популяции CD4<sup>+</sup> клеток сравнению с контролем (2.9 vs 9.4 %), подавлялся под действием кальпептина (9.4 vs 3.2 %). Предстояло выяснить патогенный характер этих популяций Т клеток *in vivo*. Известно, что регуляторные Т клетки, например, CD4<sup>+</sup> и Foxp3<sup>+</sup>, подавляют чрезмерную активацию иммунных клеток, поддерживая иммунный баланс и толерантность. В литературе описан случай, когда при пониженной функции регуляторных Т клеток у МФТП-мышей экзогенное введение этих клеток подавляет микроглиальный воспалительный ответ. При этом уменьшалось число патогенно функционирующих Th1/Th17 клеток и обеспечивалась нигростриатная защита [Reynolds et al., 2010]. Уровень регуляторных Т клеток убывал у МФТП-мышей по сравнению с контролем (3.6 vs 1.1 %), но возрастал под действием кальпептина (1.1 vs 5 %).

Полученные данные подтверждают ключевую роль кальпаина в развитии процессов нейродегенерации и нейровоспаления в спинном мозге. При этом, ингибирование кальпаина подавляет нейровоспалительный ответ как локального (астроциты, микроглия), так и периферического происхождения (субпопуляции Т клеток). Кальпаин-опосредованная активация нейровоспалительных реакций в МФТП-индуцированной модели БП в головном и спинном мозге предполагает применение противовоспалительной терапии с учетом ее эффективности и в головном, и в спинном мозге.

### ***Коррекция параметров шага под действием кальпептина***

Оценка параметров походки и шага при БП, включая его длину и частоту, важна для характеристики двигательных флуктуаций и их своевременной коррекции [Mirelman et al., 2019]. Особенности нарушений походки и шага, механизмы их развития на разных стадиях заболевания, связь с симптомами паркинсонизма остаются недостаточно изученными. Кроме того, в литературе отсутствуют данные о продолжительном модулирующем влиянии антипаркинсонических препаратов на данную симптоматику.

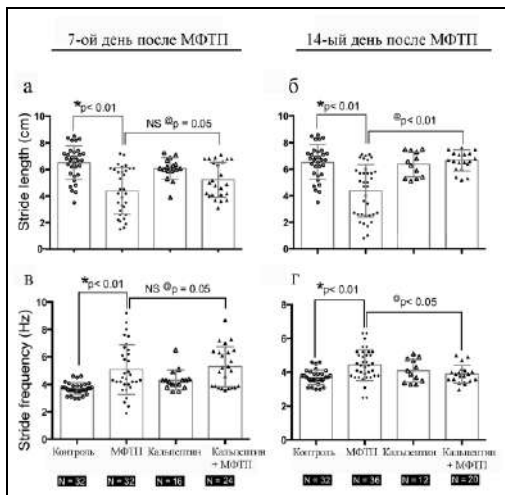
Мониторинг параметров шага у C57BL/6N мышей проводили на приборе DigiGait (Mouse Specifics). Прибор состоит из бегущей дорожки, оборудованной оптическим видеографом, который транслирует изображение движущихся конечностей мыши на монитор. Прилагаемое компьютерное обеспечение дает возможность видеозаписи движущегося объекта и сбора данных. В процессе работы руководствовались описанными методами и рекомендациями [Amende et al., 2005; Kale et al., 2004]. Данные для каждой конечности (правая, левая, передняя, задняя) анализировали отдельно. Обработку данных проводили с помощью однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA), с применением теста множественного сравнения Tukey's при значениях  $p < 0.05$  и  $p < 0.01$ .

Параметры походки и шага были исследованы в группах контрольных, МФТП- и кальпептин+МФТП-инъектированных мышей. Мониторинг проводили на 7-й и 14-й день после последней инъекции МФТП в 3-х независимых экспериментах. Измерения проводили при заданной скорости движения ленты – 25 см/сек. Для МФТП-инъектированных мышей скорость ленты сбавляли до 10 см/сек или 5 см/сек, так как у животных заметно снижалась двигательная активность. Уже на 7-й день после введения МФТП часть экспериментальных мышей (около 10% от общего числа) не преодолевали заданную скорость движения ленты ( $F_{1, 30} 13.6; p < 0.01$ ). При повторных измерениях на 14-й день после введения МФТП картина ухудшалась и уже 25% мышей не справлялись с заданием ( $F_{1, 30} 17.9; p < 0.01$ ). На завершающем этапе были отобраны только те животные, которые справлялись с заданием и передвигались при скорости движения ленты в 25 см/сек. Из большого спектра параметров были проанализированы показатели, отклонения которых характерны для БП. Это длина шага, частота шага и число прикосновений к поверхности ленты при ее движении.

В комбинированном анализе данных величина N соответствует числу мышей в каждой группе, умноженному на 4 – число конечностей каждого животного (Рис. 18). Результаты анализа показали, что параметры шага МФТП-инъекцированных мышей существенно отличаются от таковых контрольных мышей. Самым заметным отклонением было достоверное сокращение длины шага (Stride length), которое было зарегистрировано на 7-й день ( $F_{3, 100} 13.48; p < 0.0001$ ) и на 14-й день ( $F_{3, 96} 16.77; p < 0.0001$ ) после инъекций МФТП по сравнению с контролем (Рис. 18, а, б).

Сокращение длины шага у МФТП-мышей было сопряжено с достоверным увеличением частоты шага и общего числа прикосновений конечностей к поверхности движущейся дорожки (Stride frequency, Hz) на 7-й день ( $F_{3, 100} 13.48; p < 0.0001$ ), показатели которых продолжали расти в течение следующей недели, вплоть до 14-го дня ( $F_{3, 96} 16.77; p < 0.0001$ ), по сравнению с контрольной группой. Параметры варибельности длины шага на 7-й день после инъекций МФТП были достоверно ( $F_{3, 112} 2.951; p < 0.03$ ) выше по сравнению с контролем. Однако, по показателям измерений 14-го дня значительных сдвигов этих параметров ( $F_{3, 112} 1.086; p = 0.3581$ ) не наблюдалось. Аналогично, общее число прикосновений конечностей к поверхности движущейся дорожки на 7-й день после инъекций МФТП по сравнению с контролем достоверно ( $F_{3, 97} 4.900; p < 0.0033$ ) увеличивалось. Однако, отклонения, развивающиеся на ранней стадии, не прогрессировали, оставаясь на том же уровне и на 14-й день ( $F_{3, 90} 1.607; p = 0.1934$ ).

Параллельно тестировали действие кальпептина. Побочное действие кальпептина было исключено при проверке мышей, получивших кальпептин. В группе [кальпептин+МФТП] мышей уже на 7-й день после последней инъекции МФТП наблюдалась тенденция к восстановлению параметров длины и частоты шага, хотя изменения по сравнению с группой [МФТП] не были достоверными ( $p = 0.05$ ). На 14-й день отмечалась обратимость параметров и восстановление показателей длины шага до уровня контрольной и [кальпептин] групп ( $p < 0.01; p < 0.05$ ). Иначе выглядят параметры общего числа прикосновений конечностей к поверхности движущейся дорожки. При регистрации соответствующих показателей в группе [кальпептин+МФТП] на 7-й день после инъекций МФТП выраженных изменений по отношению к группе [МФТП] отмечено не было; однако, на 14-й день наблюдалось сокращение частоты шага в группе [кальпептин+МФТП] по сравнению с [МФТП] группой.



**Рис. 18.** Восстановление параметров шага у МФТП-инъекцированных мышей под действием кальпептина.

(а, б) Сокращение длины шага (Stride length), (в, г) увеличение частоты шага (Stride frequency) на 7-й и 14-й день после инъекций МФТП, и восстановление этих параметров под действием кальпептина на 14-й день ( $M \pm SEM; *p < 0.01; @p < 0.05$ ).

N = число мышей в группе  $\times 4$  (число конечностей).

## ВЫВОДЫ

1. Полученное доказательство энзиматического превращения МФТП в МФП<sup>+</sup> в спинном мозге C57BL/6N мышей при участии МАО-Б, ДАТ и высокоаффинного захвата МФП<sup>+</sup> означает, что этот отдел ЦНС является прямой мишенью для нейротоксина МФТП и научно обосновывает изучение механизмов нейродегенерации спинного мозга в МФТП-индуцируемой модели БП.
2. В МФТП-индуцируемой модели БП у C57BL/6N мышей нейродегенеративные процессы протекают как в дофаминергических нейронах nigростриатума, так и в популяциях нейронов спинного мозга. В результате прямого токсического действия МФТП-МФП<sup>+</sup> в исследованных шейном и поясничном отделах спинного мозга вырождаются нейроны (TUNEL<sup>+</sup>-NeuN<sup>+</sup>) и мотонейроны (TUNEL<sup>+</sup>-ChAT<sup>+</sup>) дорсального и вентрального рога, соответственно.
3. В спинном мозге МФТП-инъецированных C57BL/6N мышей наблюдается аксональная дегенерация, на что указывает повышение уровня дефосфорилированного белка нейрофиламента (deNFP).
4. В ротенон-индуцируемой модели БП у Lewis крыс нейродегенеративные процессы протекают в nigростриатуме и в исследованных шейном и поясничном отделах спинного мозга. В спинном мозге избирательно повреждаются нейроны (TUNEL<sup>+</sup>-NeuN<sup>+</sup>) и мотонейроны (TUNEL<sup>+</sup>-ChAT<sup>+</sup>) серого вещества. Нейротоксическое действие ротенона не распространяется на белое вещество спинного мозга.
5. Процессы, сопутствующие и/или способствующие дегенерации нейронов и аксонов в спинном мозге *in vivo* МФТП- и ротенон-индуцированных моделях БП, включают:
  - а) экспрессию активных субъединиц Ca<sup>2+</sup>-зависимых протеаз - кальпаина и каспазы-3;
  - б) расщепление белка цитоскелета спектрина с образованием специфических продуктов его распада как результат протеолитической активности кальпаина и каспазы-3;
  - в) активацию медиаторов нейровоспалительных процессов, проявляясь в виде астроглиоза (GFAP<sup>+</sup>), микроглиоза (Iba-1<sup>+</sup>, OX-42<sup>+</sup>), инфильтрации Т клеток (CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>) и периферийных макрофагов (ED-2<sup>+</sup>), экспрессии Cox-2, каспазы-1, NOS2.
6. При исследовании образцов спинного мозга больных БП (*postmortem*) установлена нейродегенерация и аксональная дегенерация, о чем свидетельствуют повышенный уровень поврежденных TUNEL<sup>+</sup>-NeuN<sup>+</sup> дорсальных нейронов и TUNEL<sup>+</sup>-ChAT<sup>+</sup> вентральных мотонейронов в сером веществе, распад нейрофиламентного легкого белка (68 кДа) и повышенный уровень deNFP в белом веществе. Установлен повышенный уровень медиаторов нейровоспалительных процессов в виде астроглиоза (GFAP<sup>+</sup>), микроглиоза (Iba-1<sup>+</sup>), инфильтрации Т клеток (CD3<sup>+</sup>) и экспрессии Cox-2. Обнаружены активные формы кальпаина и каспазы-3 и продукты распада спектрина, уровень которых превышает таковой в норме.
7. В культуре дифференцированных VSC 4.1 мотонейронов спинного мозга (*in vitro* модель БП) под действием МФП<sup>+</sup> и ротенона запускается митохондриальный кальпаин-опосредованный путь апоптоза. Этот механизм включает рост  $\text{вк}[\text{Ca}^{2+}]$ , фрагментацию ДНК, изменение уровня про- и антиапоптотических мембранных белков Вах и Bcl-2 и повышение их соотношения (Вах:Bcl-2), экспрессию активных форм кальпаина и каспазы-3, расщепление спектрина и увеличение уровня продуктов его распада,

апоптоз мотонейронов. Ингибирование кальпаина кальпептином оказывает цитопротекторный эффект на VSC 4.1 мотонейроны.

8. В культуре дифференцированных SH-SY5Y клеток МФП<sup>+</sup> и ротенон индуцируют апоптотические реакции, включая повышение  $\text{вк}[\text{Ca}^{2+}]$ , изменение уровня про- и анти-апоптотических мембранных белков Вах и Bcl-2 и повышение их соотношения (Вах:Bcl-2), экспрессию активных форм кальпаина и каспазы-3, ведущей к расщеплению спектрина и росту продуктов его распада, морфологическим изменениям, гибели клеток.
9. Дифференцированные SH-SY5Y-ДА (дофаминергические) более чувствительны к действию нейротоксинов, чем SH-SY5Y-ChAT (холинергические) клетки. Апоптоз SH-SY5Y-ДА клеток обусловлен оксидативным стрессом, тогда как при апоптозе SH-SY5Y-ChAT клеток преобладает воспалительный стресс. Ингибитор кальпаина SNJ-1945 оказывает цитопротекторный эффект на SH-SY5Y-ДА и SH-SY5Y-ChAT клетки.
10. Экспрессия активных субъединиц кальпаина имеет критическое значение в процессах нейродегенерации нейронов и аксонов в спинном мозге в *in vivo* моделях БП, а также в спинном мозге больных БП (*postmortem*). Определение кальпаин-опосредованного митохондриального пути нейродегенерации нейронов и мотонейронов спинного мозга (*in vivo, in vitro, postmortem*), участие кальпаина в активации медиаторов нейровоспалительных процессов, сопровождающих и/или способствующих развитию нейродегенерации, позволяет рассматривать кальпаин в качестве таргетной молекулы для ингибиторов, подавляющих экспрессию и/или активацию кальпаина.
11. Эффекты нейропротекции и цитопротекции в спинном мозге (*in vivo*) и в нейрональных культурах (*in vitro*), обусловленные действием ингибиторов кальпаина – кальпептином и SNJ-1945, свидетельствуют о том, что ингибиторы кальпаина могут рассматриваться в качестве потенциальных терапевтических средств для подавления и/или предотвращения распространения нейродегенеративных процессов в спинном мозге.
12. Кальпептин существенно ослабляет действие нейротоксина в спинном мозге МФП<sup>+</sup>-инъцированных C57BL/6N мышей, на что указывают уменьшение числа TUNEL<sup>+</sup>-NeuN<sup>+</sup> нейронов и снижение уровня аксонального дефосфорилированного белка нейрофиламента (deNFP), подавление экспрессии медиаторов нейровоспалительных процессов (GFAP, Iba-1, ED-2, Cox-2, каспаза-1, NOS2, CD4), улучшение параметров шага, его длины и частоты. Эти показатели подтверждают нейропротекторный эффект ингибирования кальпаина.
13. Сходство кальпаин-опосредованного механизма нейродегенерации и нейропротекции в головном и спинном мозге создает предпосылки для разработки универсальных нейропротекторных средств с целью подавления и/или предотвращения развития и распространения нейродегенеративных процессов в ЦНС.
14. Полученные результаты позволяют ответить на поставленные вопросы, касающиеся механизмов нейродегенерации и нейропротекции в спинном мозге при БП, и представляют полезный научный материал для всестороннего изучения нейробиологии спинного мозга при БП.

Статьи

1. Samantaray S, **Knaryan V**, Del Re A, Woodward J, Shields D, Azuma M, Inoue J, Ray S, Banik N. Cell-permeable calpain inhibitor SJA6017 provides functional protection to spinal motoneurons exposed to MPP. // *Neurotox Res.* 2020; p. 1-10. doi:10.1007/s12640-020-00264-3.
2. Haque A, Samantaray S, **Knaryan V**, Capone M, Hossain A, Matzelle D, Chandran R, Shields D, Farrand A, Boger H, Banik N. Calpain mediated expansion of CD4+ cytotoxic T cells in rodent models of Parkinson's disease. // *Exp Neurol.* 2020; 330, p. 1-11. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2020.113315>
3. **Knaryan V**. The role of calpain in spinal cord degeneration in experimental Parkinson's disease. // *Biol J of Armenia.* 2018; 70(1), p. 75-84.
4. **Кнарян В**. Нейродегенерация спинного мозга в экспериментальной модели болезни Паркинсона, индуцированной 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидро-пиридином. // *Мед наука Армении НАН РА.* 2017; 57(2), с. 25-32.
5. **Кнарян В**. Экстранигральная патология и нейродегенерация спинного мозга при болезни Паркинсона. // *Мед наука Армении НАН РА.* 2016; 56(4), с. 3-12.
6. Samantaray S, **Knaryan V**, Shields D, Cox A, Haque A, Banik N. Inhibition of calpain activation protects MPTP-induced nigral and spinal cord neurodegeneration, reduces inflammation, and improves gait dynamics in mice. // *Mol Neurobiol.* 2015; 52(2), p. 1054-1066. doi:10.1007/s12035-015-9255-6
7. Samantaray S, **Knaryan V**, Patel K, Mulholland P, Becker H, Banik N. Chronic intermittent ethanol induced axon and myelin degeneration is attenuated by calpain inhibition. // *Brain Res.* 2015; 1622, p. 7-21. doi:10.1016/j.brainres.2015.06.014
8. **Knaryan V**, Samantaray S, Park S, Azuma M, Inoue J, Banik N. SNJ-1945, a calpain inhibitor, protects SH-SY5Y cells against MPP<sup>+</sup> and rotenone. // *J Neurochem.* 2014; 130(2), p. 280-290. doi:10.1111/jnc.12629
9. \*Samantaray S, \***Knaryan V**, Shields D, Banik N. Critical role of calpain in spinal cord degeneration in Parkinson's disease. // *J Neurochem.* 2013; 127(6), p. 880-890. (\*equal contribution). doi:10.1111/jnc.12374c
10. Samantaray S, Patel K, **Knaryan V**, Takore N, Roudabush S, Heissenbuttle J, Becker H, Banik N. Calpain inhibition prevents ethanol-induced alterations in spinal motoneurons. // *Neurochem Res.* 2013; 38(8), p. 1734-1741. doi:10.1007/s11064-013-1077-1
11. **Knaryan V**, Samantaray S, Le Gal C, Ray S, Banik N. Tracking extranigral degeneration in animal models of Parkinson's disease: quest for effective therapeutic strategies. // *J Neurochem.* 2011; 118(3), p. 326-338. doi:10.1111/j.1471-4159.2011.07320.x
12. Samantaray S, **Knaryan V**, Le Gal C, Ray S, Banik N. Calpain inhibition protected spinal cord motoneurons against 1-methyl-4-phenylpyridinium ion and rotenone. // *Neuroscience.* 2011; 192, p. 263-274. doi:10.1016/j.neuroscience.2011.06.007
13. **Кнарян В**. Влияние ротенона на нейрональные клетки спинного мозга при экспериментальном паркинсонизме у крыс линии Lewis. // *Мед наука Армении НАН РА.* 2010; 50(2), с. 51-61.
14. Samantaray S, Sribnick E, Das A, **Knaryan V**, Matzelle D, Yallapragada A, Reiter R, Ray S, Banik N. Melatonin attenuates calpain upregulation, axonal damage and neuronal death in spinal cord injury in rats. // *J Pineal Res.* 2008; 44(4), p. 348-357. doi:10.1111/j.1600-079X.2007.00534.x



15. Samantaray S, **Knaryan V**, Butler J, Ray S, Banik N. Spinal cord degeneration in C57BL/6N mice following induction of experimental parkinsonism with MPTP. // *J Neurochem*. 2008; 104(5), p. 1309-1320. doi:10.1111/j.1471-4159.2007.05091.x
16. Samantaray S, **Knaryan V**, Guyton M, Matzelle D, Ray S, Banik N. The parkinsonian neurotoxin rotenone activates calpain and caspase-3 leading to motoneuron degeneration in spinal cord of Lewis rats. // *Neuroscience*. 2007; 146(2), p. 741–755. doi:10.1016/j.neuroscience.2007.01.056
17. **Knaryan V**, Samantaray S, Varghese M, Srinivasan A, Galoyan A, Mohanakumar K. Synthetic bovine proline-rich-peptides generate hydroxyl radicals and fail to protect dopaminergic neurons against 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced dopaminergic neuro-toxicity in mice. // *Neuropeptides*. 2006; 40(4), p. 291-298. doi:10.1016/j.npep.2006.03.005
18. **Knaryan V**, Samantaray S, Galoyan A, Mohanakumar K. A synthetic human proline-rich-peptide enhances hydroxyl radical generation and fails to protect dopaminergic neurons against 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced toxicity in mice. // *Neurosci Lett*. 2005; 375(3), p. 187-191. doi:10.1016/j.neulet.2004.11.010
19. **Knaryan V**, Arakelyan L, Marouchyan G, Kevorkian G. High affinity glutamate uptake in rat brain slices in experimental crush syndrome. // *Med Sci Monit*. 2002; 8(2), p. 75-79.
20. Барсегян С, Канаян А, **Кнарян В**, Аракелян Л. Влияние гипокинезии на захват нейромедиаторных аминокислот в срезах коры и гипоталамуса мозга крыс. // *Мед наука Армении*. 1998; 38(1-2), с. 51-60.

#### Материалы конференций

1. **Кнарян В**. Роль кальпаина в механизмах нейродегенерации спинного мозга при экспериментальной болезни Паркинсона. "Достижения женщин Армении в области биологических наук". Сборник тезисов конференции, Ереван, РА, 2016; с. 20.
2. Samantaray S, **Knaryan V**, Patel K, Mulholland P, Becker H, Banik N. Chronic intermittent ethanol-induced axon and myelin degeneration is attenuated by calpain inhibition. ASN 46<sup>th</sup> Annual Meeting, March 14-18, 2015, Atlanta, GA. *Transactions of the ASN*. 2015; p.49
3. Samantaray S, **Knaryan V**, Shields D, Banik N. Possible calpain-mediated spinal cord degeneration in Parkinson's disease. ISN 24<sup>th</sup> Biennial Meeting, Apr 20-24, 2013, Cancun, Mexico. *J Neurochem*. 2013; 125 (Suppl. 1), p.141.
4. Samantaray S, **Knaryan V**, Le Gal C, Ray S, Banik N. Mechanisms of spinal cord degeneration in experimental parkinsonism and Parkinson's disease. ASN 43<sup>rd</sup> Annual Meeting, Baltimore, MD, Mar 3-7, 2012. *Transactions of the ASN*. 2012; p. 92.
5. Ayzavian N, Ghazaryan N, **Knaryan V**. Monitoring of free-radical processes in the course of rotenone modeling of Parkinson's disease. ISN 5<sup>th</sup> Special Conference «Synapses and Dendritic Spines in Health and Disease», Buenos Aires, Argentina, Sep 12-15, 2012. *J Neurochem*. 2012; 122 (Suppl. 1), p.12.
6. Samantaray S, **Knaryan V**, Ray S, Banik N. Calpeptin a potent calpain inhibitor protected against nigral and extra-nigral degeneration in MPTP-induced experimental Parkinsonism. SfN 41<sup>st</sup> Annual Meeting, Washington, DC, Nov 12-16, 2011.
7. Samantaray S, **Knaryan V**, Le Gal C, Ali S, Ray S, Banik N. Priming with methamphetamine intensified mitochondrial dysfunction and cell damage induced by 1-methyl-4-phenylpyridinium ion and rotenone *in vitro*. The 3<sup>rd</sup> International Drug Abuse Research Society and ISN/ESN satellite meeting, Istanbul, Turkey, Aug 23-26, 2011; p. 74.
8. Samantaray S, **Knaryan V**, Ray S, Banik N. Neuroprotection by the calpain inhibitor SJA6017 against the parkinsonian neurotoxin MPP<sup>+</sup> in ventral spinal cord motoneurons. ASN 42<sup>nd</sup> Annual Meeting, St. Louis, Mar 19-23, 2011.

9. Ayvazyan N, Ghazaryan N, **Knaryan V**. Free radical oxidation disturbance in the rotenone animal model of Parkinson's disease. Special issue: FEBS 36<sup>th</sup> Congress, Biochemistry for Tomorrow's Medicine, Torino, Italy, June 25-30, 2011. *The FEBS Journal*. 2011; vol. 278, Suppl.1, p.21.
10. Samantaray S, **Knaryan, V**, Ray S, Banik N. Calpain inhibitor protects against parkinsonian toxin-induced apoptosis in motoneurons. ASN 41<sup>st</sup> Annual Meeting, Santa Fee, New Mexico, Mar 6-10, 2010.
11. Samantaray S, **Knaryan V**, Ray S, Banik N. Some mechanisms of spinal cord neurodegeneration in experimental Parkinsonism. Intl. Symp. «Immune System of the Brain: Neurochemical and Neuroendocrine Aspects», dedicated to the 80<sup>th</sup> anniversary of Acad. Armen A. Galoyan, Yerevan, Armenia, Oct 6-8, 2009; p. 16-17.
12. Samantaray S, **Knaryan V**, Guyton M, Matzelle D, Ray S, Banik N. Degeneration of spinal cord motoneurons at rotenone-induced experimental parkinsonism in Lewis rats. Abstracts of the International Symposium, honoring the 100<sup>th</sup> Anniversary of H.Kh. Buniatian. *Neurochem Res*. 2008; v. 33, No. 6/June, p.1154. doi: 10.1007/s11064-008-9621-0
13. **Knaryan V**, Arakelyan L, Gevorkian G, Akopyan V. Stress and trauma inhibit uptake of glutamic acid in rat cerebral cortex slices. *Neurochemical J*. 2008; 25 (4), p. 310-311. doi: 10.1134/S181971240804017X
14. Samantaray S, **Knaryan V**, Ray S, Banik N. Direct evidence for MPP<sup>+</sup> neurotoxicity in spinal cord of C57BL/6N mice with MPTP-induced experimental parkinsonism. ISN 21<sup>th</sup> Biennial and 38<sup>th</sup> Annual ASN meetings, Cancún, Mexico, 19–24 August, 2007. *J Neurochem*. 2007; 102 (Suppl.1), 139 -140.
15. Samantaray S, **Knaryan V**, Ray S, Banik N. Spinal cord degeneration in C57BL/6N mice with experimental chronic parkinsonism and also in human patients with Parkinson's disease. The SfN 37<sup>th</sup> Annual Meeting, San Diego, CA, Nov 3-7, 2007.
16. Samantaray S, **Knaryan V**, Ray S, Banik N. Spinal cord motoneuron degeneration in animal models of acute and chronic Parkinson's disease. The SfN 36<sup>th</sup> Annual Meeting, Oct 14-18, 2006, Atlanta, GA. *Neuroscience*. 2006.
17. **Knaryan V**, Samantaray S, Swapan K. Ray S, Banik N. Parkinsonian toxins activated calpain for apoptosis in ventral spinal cord motoneurons in culture. The 3<sup>rd</sup> Annual Aging Research Day "Diversity in Aging Research" Charleston, SC, 2006; p. 36.
18. **Knaryan V**, Samantaray S, Galoyan A, Mohanakumar K. A synthetic human proline-rich-polypeptide enhances hydroxyl radical generation and fails to protect dopaminergic neurons against MPTP-induced toxicity in mice. The 30<sup>th</sup> FEBS Congress and 9<sup>th</sup> IUBMB Conference "The Protein World", Budapest, Hungary. *The FEBS Journal*. 2005; vol. 272, Suppl.1, p. 535.
19. **Knaryan V**. High affinity uptake of aspartate and glutamate in rat brain synaptosomes of young and aged rats. The XIX Annual Meeting of Indian Academy of Neuroscience & International Symposium on "Neurodegeneration and Neuroprotection", Indian Institute of Chemical Biology, Calcutta, India, 2002; p. 54.
20. **Knaryan V**, Arakelyan L, Marouchyan G, Kevorkian G. Glutamate uptake in rat brain slices during experimental crush syndrome pathogenesis Joint ISN 18<sup>th</sup> Biennial Meeting and 32<sup>nd</sup> ASN Annual Meeting in association with the Argentinean Society for Neurochemistry, Buenos Aires, Aug 26-Sep 1, 2001. *J Neurochem*. 2001; 78 (Suppl. 1), p. 64.
21. **Knaryan V**, Arakelyan L. Effect of a novel hypothalamic peptide on the glutamate uptake in rat brain slices. Third Conference of the Armenian IBRO Association, Yerevan, RA; 2000; p. 47.
22. **Knaryan V**, Arakelyan L, Marukhyan G. Differential effects of N-acetyl-L-aspartate on the synaptosomal uptake of excitatory amino acids in rat cerebral cortex, cerebellum and brain stem. The Second Conference of the Armenian IBRO Association, Yerevan, RA, 1998; p. 44.

## Քնարյան Վարդուհի Հարությունի

### Նեյրոդեգեներացիայի և նեյրոպրոտեկցիայի մեխանիզմները ողնուղեղում փորձարարական Պարկինսոնի հիվանդության ժամանակ

#### Ամփոփում

*Առանցքային բառեր:* Պարկինսոնի հիվանդություն, ողնուղեղ, մոտոնեյրոններ, ՄՖՏՊ, ռոտենոն, նեյրոդեգեներացիա, կալպահին, կալպեպտին, նեյրոպրոտեկցիա

Պարկինսոնի հիվանդությունը (ՊՀ) արտահայտվում է շարժողական խանգարումներով, որոնք զարգանում և ի հայտ են գալիս սև մարմնի (*substantia nigra pars compacta*) և զոլավոր մարմնի (*striatum*) դոֆամինային նեյրոնների դեգեներացիայի հետևանքով: Արդի պատկերացումների համաձայն՝ ողնուղեղը նույնպես ներգրավվում է ՊՀ-ն պայթուցիական պրոցեսների մեջ: Սակայն, ի տարբերություն գլխուղեղի, ողնուղեղի նեյրոդեգեներացիայի մեխանիզմները քիչ են ուսումնասիրվել: Բացի այդ, մշակված փորձարարական մոդելները կիրառվել են հիմնականում գլխուղեղի նշված հատվածների ուսումնասիրության համար:

Մեր հետազոտությունները ցույց են տվել, որ C57BL/6N մկների մոտ 1-մեթիլ-4-ֆենիլ-1,2,3,6-տետրահիդրոպիրիդինոլ (ՄՖՏՊ) և Lewis առնետների մոտ ռոտենոնով առաջացրած ՊՀ-ի *in vivo* փորձարարական մոդելները կարելի է կիրառել նաև ողնուղեղի ուսումնասիրության և նեյրոդեգեներացիայի մեխանիզմների բացահայտման նպատակով: Ցույց է տրվել, որ C57BL/6N մկներին ՄՖՏՊ-ն ներարկելուց հետո, այն ողնուղեղում մետաբոլիկ ճանապարհով վերածվում է ակտիվ 1-մեթիլ-4-ֆենիլպիրիդին (ՄՖՊ<sup>+</sup>) տրոսինի: Ողնուղեղում բացահայտված ՄՖՏՊ-ի մետաբոլիզմի բաղադրիչները՝ MAO-B ֆերմենտը, դոֆամինի փոխադրիչը (DAT) և ՄՖՊ<sup>+</sup>-ի հետադարձ կլանումը փաստում են, որ ՄՖՊ<sup>+</sup>-ն անմիջականորեն է ազդում ողնուղեղի նեյրոնների վրա:

Հայտնի է, որ ՄՖՏՊ-ից առաջացած ՄՖՊ<sup>+</sup> ակտիվ նեյրոտրոսինը և ռոտենոնը միտոքոնդրիումների շնչառական շղթայի կոմպլեքս I-ի ինհիբիտորներ են, որոնք բերում են միտոքոնդրիումների ֆունկցիայի խանգարմանը և օքսիդատիվ սթրեսի զարգացմանը, ինչը բնորոշ է նաև ՊՀ-ն պայթուցենեզին: ՄՖՏՊ-ի և ռոտենոնի երկարատև ազդեցության արդյունքում նեյրոններում բարձրանում է ներթոքային կալցիումի ( $Ca^{2+}$ ) մակարդակը, ինչի հետևանքով ակտիվանում են  $Ca^{2+}$ -կախյալ պրոտեազները՝ կալպահինը և կասպազ-3-ը: Վերջիններս քայքայում են նեյրոնների կառուցվածքային սպիտակուցները:

Մենք ուսումնասիրել ենք ողնուղեղի նեյրոդեգեներացիայի մեխանիզմները, մասնավորապես, կալպահինով միջնորդավորված ուղին *in vivo* և *in vitro* պայմաններում: Ցույց է տրվել, որ ՄՖՏՊ-ի և ռոտենոնի ներարկումները C57BL/6N մկներին և Lewis առնետներին կործանարար են ազդում ողնուղեղի վրա, վնասելով գորշ նյութի հետին և արջևի եղջյուրների նեյրոնները և մոտոնեյրոնները: Կալպահինի ակտիվացումը բերում է բջիջների կառուցվածքային սպիտակուցների սպեկտրինի և նեյրոֆիլամենտների սպիտակուցի քայքայմանը, ինչը կարող է նեյրոնների և աքսոնների կառուցվածքային և ֆունկցիոնալ խանգարումների հանգեցնել: Ողնուղեղի հյուսվածքներում գրանցվել է սպեկտրինի քայքայման արդյունքում առաջացած

սպիտակուցների ավելացում: Փորձարարական ՊՀ-ի ժամանակ դիտվել է նաև նյարդաբորբոքային գործոնների ակտիվացում, որը հանգեցնում է աստրոգլիոզի, միկրոգլիոզի, մակրոֆագերի ներթափանցմանը և բորբոքային ֆերմենտների մակարդակի բարձրացմանը: Նշված երևույթների մասին վկայում է ստուգված ցուցանիշների բարձրացումը (GFAP, OX-42, Iba-1, ED-2, Cox-2, կասպազ-1, NOS2, CD4, CD8):

Աշխատանքում ՊՀ-ով ախտորոշված հիվանդների (postmortem) ողնուղեղի դեգեներացիայի հստակ ապացույցներ են ներկայացված: Դրա ցուցանիշներն են TUNEL<sup>+</sup> (դրական) նեյրոնները և մոտոնեյրոնները, աքսոնների նեյրոֆիլամենտի թեթև սպիտակուցի քայքայումը, նեյրոբորբոքային գործոնների (Cox-2, GFAP, Iba-1, CD3) ավելացումը: Այստեղ նույնպես արտահայտված է ակտիվ կալպահինի առկայությունը, որը միջնորդում է նեյրոդեգեներացիայի գործընթացները:

ՊՀ-ի բջջային *in vitro* մոդելների վրա կատարած հետազոտությունները ցույց տվեցին, որ ՄՖՊ<sup>+</sup> և ռոտենոնը խիստ նվազեցնում են տարբերակված VSC 4.1 մոտոնեյրոնների, SH-SY5Y-DA և SH-SY5Y-ChAT բջիջների կենսունակությունը և ապոպտոզի ենթարկում: Առկա են ապոպտոզին բնորոշ երևույթներ, ինչպիսիք են բջիջների մորֆոլոգիական փոփոխությունները, ԴՆԹ-ի մասնատումը, TUNEL դրական բջիջների քանակական աճը, միտոքոնդրիումների թաղանթների Bax և Bcl-2 սպիտակուցների հարաբերակցության բարձրացումը: Արձանագրվել է ներբջջային Ca<sup>2+</sup> մակարդակի աճ և կալպահինի և կասպազ-3-ի ակտիվացում, որոնց ազդեցության ներքո ավելանում են սպեկտրինի քայքայման արդյունքում առաջացած նյութերը:

Ուսումնասիրվել են նաև կալպահինի սինթետիկ ինհիբիտորների՝ կալպեպտինի պաշտպանիչ ունակությունը: Ցույց է տրվել, որ կալպեպտինը նվազեցնում է ՄՖՊ<sup>+</sup>-ի և ռոտենոնի կործանարար ազդեցությունը VSC 4.1 մոտոնեյրոնների վրա, իսկ SNJ-1945-ն՝ տարբերակված SH-SY5Y բջիջների վրա: Այս տվյալները հաստատում են կալպահինի առանցքային դերը նշված բջիջների ապոպտոզի գործընթացներում:

Կալպեպտինի նյարդապաշտպանիչ հատկությունները ցայտուն կերպով արտահայտվել են C57BL/6N մկների մոտ ՄՖՏՊ-ով հարուցված *in vivo* ՊՀ-ի մոդելում: Ցույց է տրվել, որ կալպեպտինը կանխարգելում է թե գլխուղեղի սև նյութի դոֆամինային նեյրոնների, և թե ողնուղեղի նեյրոնների, մոտոնեյրոնների և աքսոնների դեգեներացիան: Այն արգելակում է կալպահինի ակտիվացումը և նվազեցնում բորբոքային գործոնների (Cox-2, կասպազ-1, NOS2, CD4) մակարդակը ողնուղեղում: Հատկանշական է, որ կալպեպտինը կարգավորում է ՄՖՏՊ-ով հարուցված քայլվածքի շեղումները, քայլի կրճատված երկարության ու ավելացած հաճախականության ցուցանիշները, դրանք մոտեցնելով հսկիչ մակարդակին:

Այսպիսով, մեր ուսումնասիրությունները ցույց են տալիս, որ ՊՀ-ի փորձարարական մոդելներում կալպահինի ակտիվացումը և կալպահինով միջնորդավորված ուղին որոշիչ դեր ունի և գլխուղեղի, և ողնուղեղի նեյրոդեգեներացիայի գործընթացներում: Հետևաբար, կալպահինը կարող է թիրախ հանդիսանալ նյարդապաշտպանիչ դեղամիջոցների, մասնավորապես, կալպահինի ինհիբիտորների համար, որոնք կարող են կիռավել և գլխուղեղի, և ողնուղեղի դեգեներացիան կանխարգելելու նպատակով ՊՀ-ի ժամանակ:

**Mechanisms of neurodegeneration and neuroprotection in the spinal cord  
at experimental Parkinson's disease**

**Summary**

Key words: Parkinson's disease, spinal cord, motoneurons, MPTP, rotenone, neurodegeneration, calpain, calpeptin, neuroprotection

Parkinson's disease (PD) is characterized by disturbances in motor functions, which are mainly ascribed to degeneration of dopaminergic neurons in the substantia nigra pars compacta and reduction of dopamine neurotransmission in the caudate nucleus of corpus striatum. Growing evidence from clinical and laboratory studies indicate that spinal cord, a final coordinator of motor functions, is also implicated in the progression of PD. However, the mechanisms of spinal cord neurodegeneration have been less investigated, and the existing experimental models of PD have been validated and explored largely for studying nigrostriatal pathway.

Our investigations substantiated that experimental neurotoxic *in vivo* animal models of PD, induced by 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) in C57BL/6N mice and rotenone in Lewis rats, can be effectively used to study the mechanisms of neurodegeneration in the spinal cord. We demonstrated enzymatic conversion of protoxin MPTP to active toxic 1-methyl-4-phenylpyridinium ion (MPP<sup>+</sup>) by MAO-B, and provided evidence of dopamine transporters (DAT) expression and high affinity uptake of <sup>3</sup>H-MPP<sup>+</sup> in the spinal cord of C57BL/6N mice. These data indicate that spinal cord is a direct target of MPTP neurotoxicity. Presence of selective machinery for MPTP neurotoxicity in the spinal cord was confirmed by TUNEL-positive (+) neurons in the dorsal horn and motoneurons in the ventral horn of MPTP-injected mice.

The PD pathology is associated with consistent systemic mitochondrial dysfunction and aberrant intracellular Ca<sup>2+</sup> homeostasis, leading to upregulation of Ca<sup>2+</sup>-dependent proteases – calpain and caspase-3. Such intracellular environment can be generated by mitochondrial toxins MPTP and rotenone, which are accepted parkinsonian neurotoxins used for *in vivo* and *in vitro* PD models. These models are based on the mitochondrial pathway to play key role in cell death machinery. We investigated the mechanisms of spinal cord neurodegeneration, focusing on calpain-mediated pathway of neuronal cell death. Uncontrolled intracellular Ca<sup>2+</sup> overload, calpain upregulation and subsequent cleavage of its substrates ( $\alpha$ -spectrin, neurofilament proteins, etc.) may result in detrimental damage of structural and functional integrity of neurons, axons and myelin. Cleavage of cytoskeletal structural protein  $\alpha$ -II-spectrin generates spectrin breakdown products (SBDP). It is worth to mention that SBDP levels are considered as correlative biomarkers of degenerating neurons damaged through proteolysis.

Our studies showed that chronic injections of MPTP to C57BL/6N mice and rotenone administration to Lewis rats strongly affect spinal cord, causing substantial damage to dorsal neurons and ventral motoneurons in the investigated cervical and lumbar spinal sections, as indicated by increased TUNEL<sup>+</sup> immunoreactivity. Moreover, in the MPTP model axons in the white matter undergo neurotoxic damage, shown by elevated dephosphorylated neurofilament protein (deNFP). In the rotenone model only neurons and motoneurons in the grey matter were affected, nevertheless rotenone toxicity did not reach the white matter, containing oligodendrocytes, since TUNEL immunoreactivity was not detected in this area.

MPTP- and rotenone-induced neuronal and axonal degeneration in the spinal cord is associated with activation of inflammatory responses – astrogliosis (GFAP), microgliosis (OX-42, Iba-1), infiltration of macrophages (ED-2), and expression of inflammatory mediators (Cox-2,

caspase-1, NOS2, CD4, and CD8). Increased activation of calpain and caspase-3 led to elevation of 145 kDa calpain- and caspase-3-specific 120 kDa SBDP.

Samples from cervical and thoracic spinal cord of patients diagnosed with PD (postmortem) and age matched neurologically normal subjects have been examined for neuronal damage, neuroinflammation, and calpain activation. We found traces of TUNEL immunoreactivity in the spinal cord of normal subjects, whereas damaged TUNEL<sup>+</sup>-NeuN<sup>+</sup> neurons and TUNEL<sup>+</sup>-ChAT<sup>+</sup> motoneurons were detected in the spinal dorsal and ventral areas of PD patients, respectively, indicating neuronal degeneration. Degradation of the neurofilament light protein (68 kDa NFL) showed occurrence of axonal degeneration in the spinal cord of PD patients, but not in normal subjects. Elevated levels of neuroinflammatory mediators GFAP (astrogliosis), Iba-1 (microgliosis), Cox-2, and presence of CD3 signified neuroinflammation in the PD spinal cord. Active calpain upregulation, dysregulation of calpain-calpastatin system and SBDP elevation substantiated the role of calpain-mediated pathway in neuronal and axonal degeneration in the spinal cord of PD patients

The mechanisms of MPP<sup>+</sup> and rotenone toxicity and calpain activation have been studied in *in vitro* PD models, using differentiated spinal motoneurons VSC 4.1 (ventral spinal cells), SH-SY5Y-DA (dopaminergic) and SH-SY5Y-ChAT (cholinergic) cells. Both neurotoxins dramatically reduced viability of VSC 4.1 and SH-SY5Y cells, causing DNA fragmentation, changes in the levels of mitochondrial membrane pro- and anti-apoptotic Bax and Bcl-2 proteins as well as rise of their ratio (Bax:Bcl-2), indicating activation of intrinsic mitochondrial pathway of apoptosis, which culminate in apoptotic cell death. The critical step is increased intracellular Ca<sup>2+</sup> level, which drives activation of proteases. Calpain and caspase-3 were upregulated by MPP<sup>+</sup> and rotenone, with concomitant formation of active subunits of calpain (76 kDa), caspase-3 (12 and 20 kDa), and subsequent proteolytic cleavage of spectrin with formation of calpain- and caspase-3 specific SBDP.

The critical role of active calpain impelled investigations of cytoprotective effects of synthetic calpain inhibitors – calpeptin and SNJ-1945. Calpeptin substantially reduced MPP<sup>+</sup> and rotenone neurotoxicity in VSC 4.1 motoneurons, and SNJ-1945 – in SH-SY5Y cells. Both calpain inhibitors provided cytoprotection, increasing cell viability, decreasing levels of active proteases and reducing SBDP formation. These data confirmed the key role of calpain in MPP<sup>+</sup>- and rotenone-induced apoptosis of VSC 4.1 motoneurons and SH SY5Y cells.

The neuroprotective efficiency of calpeptin has been demonstrated in the MPTP model in C57BL/6N mice. Calpeptin significantly diminished damage to tyrosine hydroxylase positive dopaminergic neurons in the brain (substantia nigra), to neurons, motoneurons, and axons in the spinal cord of MPTP-injected mice, signifying neuroprotection through calpain inhibition and confirming calpain involvement in neuro-axonal degeneration in the spinal cord. Moreover, calpeptin regulated MPTP-induced deviations in characteristic for PD gait parameters – stride length and stride frequency. DigiGait analysis showed reduction of stride length and increase of stride frequency in MPTP-injected mice; whereas, calpeptin pretreatment had regulatory effect, restoring both gait parameters up to the control levels. Calpeptin pretreatment was effective against MPTP-induced inflammatory responses, reducing expression of Cox-2, caspase-1, NOS2, and CD4.

Taking together, our studies demonstrated that in experimental PD models activation of the calpain-mediated pathway plays crucial role in neurodegenerative processes both in the brain and in spinal cord. Therefore, calpain is suggested as a therapeutic target molecule for its inhibitors as neuroprotective agents to prevent and/or slow down neuronal and axonal degeneration in the brain and spinal cord at PD.

