

На правах рукописи

Карпенко Марина Николаевна

Регуляция адаптивных реакций мозга кальпаинами

1.5.5. – Физиология человека и животных

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
доктора биологических наук

Санкт-Петербург – 2021

Работа выполнена в Физиологическом отделе им. И.П. Павлова Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Институт экспериментальной медицины», г. Санкт-Петербург.

Научный консультант:

Клименко Виктор Матвеевич, доктор медицинских наук, профессор

Официальные оппоненты:

Ватаева Людмила Анатольевна, доктор биологических наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Российский государственный педагогический университет им. А.И. Герцена», кафедра клинической психологии и психологической помощи, профессор

Ордян Наталья Эдуардовна, доктор биологических наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт физиологии им. И.П. Павлова Российской академии наук, лаборатория нейроэндокринологии, заведующий

Помников Виктор Григорьевич, доктор медицинских наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное учреждение дополнительного профессионального образования «Санкт-Петербургский институт усовершенствования врачей-экспертов» Министерства труда и социальной защиты Российской Федерации, кафедра неврологии, медико-социальной экспертизы и реабилитации, заведующий

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Северо-западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита состоится « » _____ 2021 года в _____ часов на заседании диссертационного совета 24.1.158.02 на базе Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Институт экспериментальной медицины» (197376, Санкт-Петербург, ул. Академика Павлова, д. 12) по адресу: 197022, Санкт-Петербург, Каменноостровский пр., д. 71.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Институт экспериментальной медицины» по адресу: 197376, Санкт-Петербург, ул. Академика Павлова, д. 12 и на сайте <https://iemspsb.ru/external/karpenko-mn/>.

Автореферат разослан « » _____ 2021 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета
доктор биологических наук

Хныченко Людмила Константиновна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования

Центральная роль в реализации механизмов приспособления человека и животных к действию различных экологических факторов принадлежит мозгу. Индукция этих механизмов обеспечивает способность мозга и организма в целом поддерживать гомеостаз за счет перераспределения энергетических, метаболических и структурных ресурсов. Несмотря на то, что мозг обладает огромными адаптационными возможностями, при действии на организм экстремальных факторов возникает опасность развития дисрегуляторных процессов, приводящих к срыву адаптационных механизмов, причем область толерантности к действию экологического фактора зависит от индивидуальных особенностей организма и природы самого фактора.

Адаптационный потенциал клеток ЦНС в первую очередь определяется активностью внутриклеточных регуляторных систем, среди которых ключевой является кальциевая сигнальная система. Причем особенности ее функционирования заключаются в уникальной способности выполнять роль своеобразного триггера при переключении адаптационных процессов на патологические. В связи с этим, изучение вклада различных компонентов кальциевой сигнальной системы в формирование адаптивного потенциала клеток мозга является актуальной медико-биологической задачей. В этом аспекте особый интерес вызывает Ca^{2+} -зависимая кальпаиновая система внутриклеточных протеаз, физиологическая роль которой определяется способностью к ограниченному протеолизу белков и пептидов. Среди субстратов кальпаинов есть транскрипционные факторы, трансмембранные рецепторы, различные ферменты, белки цитоскелета, белки синаптических окончаний. Таким образом, активация протеаз семейства кальпаинов приводит к расщеплению белков-субстратов и, как следствие, к реорганизации цитоскелета клетки, изменению силы межклеточных связей, преобразованию пластических свойств клеточных мембран, модификации трансдукции сигнала от рецептора до генома, т. е. к активации базисных для реализации адаптации механизмов.

Настоящее исследование направлено на выявление роли кальпаиновой системы в регуляции ответа клеток ЦНС на действие неблагоприятных факторов, что необходимо для понимания механизмов формирования адаптивных реакций и для разработки стратегий, направленных на повышение адаптационного потенциала клеток ЦНС.

Степень разработанности проблемы

В основу современных представлений об особенностях адаптации организма к изменяющимся условиям среды легли теории критических фаз развития организма (Светлов П.Г., 1966), функциональных систем (Анохин П.К., 1968), нейроэнтропийная теория (Аршавский И.А., 1982), теория дисрегуляторной патологии (Крыжановский Г.Н., 2002) др. При исследовании процессов адаптации организма к неблагоприятным факторам

особое внимание всегда уделялось ЦНС, обеспечивающей объединение всех информационных сигналов, необходимых для реализации физиологических функций (Самойлов М.О., 1999). Доказано, что в реализации адаптивных реакций мозга принимают участие нейромедиаторные системы, цитокины и протеолитические ферменты (Zubareva O.E. et al., 2015; Sokolova E.S. et al., 2007; Gorbunova A.A. et al., 2017; Gulyaeva N.V. et al., 2003; Kryzhanovskii G.N., 2006 и мн. др.). Выявлен вклад регуляторных пептидов, образованных при ограниченном протеолизе белков, в механизмы переноса информации между системами организма для реализации интегративной функции (Ашмарин И.П., Обухова М.Ф., 1986; Марьянович А.Т., 2014).

В последние годы показана роль отдельных протеолитических систем в реализации адаптивных реакций мозга. Например, стало понятно, что, наряду с участием в апоптотической гибели, каспаза-3 вовлечена в процессы структурной и функциональной адаптации головного мозга к изменяющимся условиям внешней и внутренней среды и в механизмы дифференцировки нервных клеток (Gulyaeva N.V., 2003). Список исследований, посвященных изучению роли кальпаиновой системы в регуляции адаптивных реакций мозга, весьма короткий, но непрерывно расширяется. Например, было установлено, что в мозге крыс при кратковременной умеренной гипотермии, глубокой гипотермии и иммобилизации активность кальпаинов снижается, но возрастает при пролонгировании глубокой гипотермии (Нурмагомедова П.М., Омарова М.М., 2006). При воздействии на водные организмы факторов среды различной природы, включая антропогенный, показано, что протеолиз белков и пептидов под действием кальпаинов является приспособительным ответом (Немова Н.Н. и др., 2001). В работах последних лет все чаще стала обсуждаться возможная плейотропная роль кальпаинов, поскольку при развитии патологии ЦНС ферменты данного семейства теоретически могут определять как гибель нервных клеток, так и компенсаторные процессы, необходимые для восстановления нормального функционирования мозга (Vaudry M., Vi X., 2016).

Цель исследования: выявить кальпаин-опосредованные механизмы регуляции повреждающих и защитных процессов, развивающихся в центральной нервной системе в ответ на действие неблагоприятных факторов различной природы.

Задачи исследования:

1. Оценить способность факторов бактериальной и химической природы (липополисахарид, $MnCl_2$, 3-нитропропионовая кислота, МФТП) влиять на активность кальпаинов *in vitro* и на модели нервных окончаний (синапсом).
2. Проанализировать влияние факторов бактериальной и химической природы (липополисахарид, $MnCl_2$, 3-нитропропионовая кислота, МФТП) на способность m-кальпаина высвобождаться из синапсом.

3. Установить связь между степенью активации кальпаинов и содержанием внутри- и внесинапсосомального пула нейромедиаторов (на примере дофамина).
4. Выявить механизм высвобождения m-кальпаина из синапсом.
5. Среди внеклеточных и трансмембранных белков произвести поиск неизвестных ранее белков-субстратов кальпаина.
6. Определить содержание и активность кальпаинов в мозге крыс после воздействия на организм неблагоприятных факторов бактериальной и химической природы.
7. Оценить возможность повышения адаптационного потенциала клеток ЦНС с помощью подавления активности кальпаинов.
8. Определить активность кальпаинов в плазме крови пациентов с различной тяжестью течения заболеваний экстрапирамидной системы.

Научная новизна работы

В настоящей работе выявлено включение кальпаиновой системы в механизмы регуляции ответа клеток ЦНС на действие повреждающих факторов бактериальной и химической природы, а именно: впервые показано, что μ -кальпаин активируется в присутствии хлорида марганца; аппликация нейротропных факторов химической природы ($MnCl_2$, МФТП, 3-НПК) к выделенным нервным окончаниям вызывает активацию m-кальпаина, а $MnCl_2$ также стимулирует, блокируемое глибенкламидом, высвобождение m-кальпаина из синапсом; подавление активности m-кальпаина с помощью синтетических ингибиторов интенсифицирует высвобождение дофамина выделенными нервными окончаниями; впервые среди внеклеточных и трансмембранных белков обнаружены потенциальные субстраты кальпаинов (матриксная металлопротеаза 2 и 9, внеклеточный домен D(1A) рецептора дофамина, КОМТ и др.).

Установлено, что при действии на организм повреждающих факторов бактериальной (ЛПС) или химической ($MnCl_2$) природы продукция мРНК/белка и активность μ - и m-кальпаина в клетках стриатума и гиппокампа меняется, причем временная динамика и выраженность данных изменений специфична для вида воздействия и для отдела мозга. При интоксикации $MnCl_2$ впервые продемонстрировано протективное действие синтетического ингибитора кальпаинов, соответствующего (184-210) аминокислоте в последовательности кальпастина человека, при хроническом интраназальном способе его введения в дозе 50 мкг/кг в день.

Обнаружено повышение активности кальпаинов в плазме крови при развитии экстрапирамидных нарушений (болезни Паркинсона (БП) и эссенциального тремора (ЭТ)), причем при БП, но не при ЭТ, активность кальпаинов возрастает при переходе от ранних к развернутым стадиям заболевания: на ранних стадиях развития БП повышение активности кальпаинов определяется вкладом μ -кальпаина, а на развернутых стадиях заболевания - m-кальпаином.

Теоретическая и практическая значимость исследования

Полученные результаты дополняют существующие представления о физиологических функциях кальпаинов, расширяют понимание различной функциональной роли μ - и m -кальпаина.

В ходе исследования выявлены потенциальные мишени, воздействуя на которые возможно скорректировать негативное влияние повреждающих факторов бактериальной и химической природы на клетки ЦНС. На основе полученных данных могут быть разработаны методические подходы, позволяющие включить в схемы лечения заболеваний нервной системы препараты на основе ингибиторов кальпаина, действующие с учетом различной функциональной роли μ - и m -кальпаина.

Результаты, полученные в ходе выполнения данного исследования, позволяют дополнить современные представления о молекулярных основах патогенеза экстрапирамидных нарушений и будут способствовать разработке стратегии выявления среди пациентов с БП групп риска с высокой скоростью прогрессирования заболевания.

Полученные данные могут быть использованы при преподавании курсов лекций по физиологии, нейрехимии, патологической физиологии.

Методология и методы исследования

Объектом настоящего исследования были частично очищенные протеазы семейства кальпаинов; выделенные нервные окончания – синаптосомы; самцы крыс Вистар; плазма крови, полученная от пациентов с заболеваниями нервной системы.

Методология работы состояла в оценке последствий воздействия на объекты исследования неблагоприятных факторов бактериальной и химической природы, которые оценивались по изменению содержания мРНК, белка, активности, локализации и спектра доступных субстратов основных представителей кальпаиновой системы (μ - и m -кальпаина), по изменению содержания мРНК основных провоспалительных цитокинов, по уровню дофамина и его метаболитов и др.

Для выполнения поставленных задач применялись методы анализа поведения животных (тест «Открытое поле», тест «Следы»), методы выделения и частичной очистки белков, субклеточного фракционирования, различные виды электрофореза в ПААГ, иммуноблоттинг, иммунопреципитация, ПЦР в реальном времени, атомно-абсорбционная спектрометрия, высокоэффективная жидкостная хроматография, иммуноферментный анализ, компьютерный анализ первичной структуры белков, арсенал методов математической статистики и др.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Под действием неблагоприятных факторов различной природы m-кальпаин высвобождается нервными окончаниями во внеклеточное пространство, где он сохраняет свою протеолитическую активность и может расщеплять ряд внеклеточных и трансмембранных белков.
2. При подавлении активности синапсосомального m-кальпаина синтетическими ингибиторами интенсифицируются компенсаторные процессы, направленные на поддержание физиологического уровня внеклеточного дофамина.
3. При действии на организм бактериальных (липополисахарид) или химических ($MnCl_2$) токсинов переходное состояние от нормы к патологии характеризуется фактор-специфичным вовлечением различных изоформ кальпаинов; при развитии нейродегенеративного процесса вне зависимости от типа повреждающего действия происходит гиперактивация исключительно m-кальпаина.
4. Подавление активности m-кальпаина с помощью синтетического ингибитора Cast (184-210) способствует повышению адаптационного потенциала клеток ЦНС при действии на организм неблагоприятных факторов.
5. Повышение активности m-кальпаина в плазме крови при болезни Паркинсона является потенциальным маркером перехода с ранних на развернутые стадии заболевания.

Степень достоверности результатов

Степень достоверности полученных результатов подтверждается достаточным и репрезентативным объемом выборок, достаточным количеством выполненных наблюдений с использованием широкого спектра современных методов исследования и подтверждена адекватными методами статистической обработки данных.

Личное участие соискателя в исследовании

Автором самостоятельно проведен анализ литературных источников по теме диссертации, планирование экспериментальных исследований и подбор методов для достижения поставленной цели. Экспериментальные исследования выполнялись автором лично. Обработка полученных данных, их интерпретация, написание научных статей, подготовка научных докладов и оформление работы осуществлены автором самостоятельно. Основные положения диссертации, составляющие ее новизну и практическую значимость, сформулированы автором.

Апробация работы

Основные результаты работы были представлены на научных семинарах и заседаниях Физиологического отдела им. И.П. Павлова ФГБНУ «ИЭМ» (2011-2020); в виде устных и стендовых докладов на следующих

всероссийских и международных конференциях: III Съезд физиологов СНГ (Ялта, Украина, 2011); Multidisciplinary International Neuroscience and Biological Psychiatry «Stress and Behavior» (Saint Petersburg, 2012-2019); Всероссийская молодежная конференция "Нейробиология интегративных функций мозга" (Санкт-Петербург, 2013); Международный междисциплинарный конгресс «Нейронаука для медицины и психологии» (Судак, Крым, Россия, 2014, 2015, 2017, 2018); IV Съезд физиологов СНГ (Сочи-Дагомыс, Россия, 2014); XIII Всероссийская молодежная научная конференция института физиологии Коми НЦ УрО РАН «Физиология человека и животных: от эксперимента к клинической практике» (Сыктывкар, 2014); Международная научная конференция Научного Парка СПбГУ «Трансляционная биомедицина: современные методы междисциплинарных исследований в аспекте внедрения в практическую медицину» (Санкт-Петербург, 2015); III Всероссийская научная конференция молодых ученых «Проблемы биомедицинской науки третьего тысячелетия» (Санкт-Петербург, 2016); XXIII Съезд Российского Физиологического Общества им. И.П. Павлова (Воронеж, 2017); 16th International Symposium of Trace Elements in man and Animals (Saint Petersburg, 2017); Зимняя молодежная школа по биофизике и молекулярной биологии (Рошино, 2017-2019); Юбилейный конгресс с международным участием «Давиденковские чтения» (Санкт-Петербург, 2018); FEBS Open Bio (Прага, Чешская Республика, 2018); VI Съезд физиологов с международным участием (Сочи-Дагомыс, Россия, 2019); III Российская научно-практическая конференция «Фундаментальные и клинические аспекты нейродегенеративных заболеваний» (Ижевск, 2019).

Публикации

По теме диссертации опубликованы 28 работ, из них 14 статей в журналах, рекомендованных ВАК РФ, в т.ч. 9 статей в изданиях, входящих в базы данных Scopus и Web of Science.

Структура и объем диссертации

Диссертация содержит разделы «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты и их обсуждение», «Заключение», «Выводы», «Список сокращений», «Список литературы», включающий 373 источника. Диссертация изложена на 270 страницах. Результаты и обсуждение представлены в 2 таблицах и иллюстрированы 82 рисунками.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Лабораторные животные. Все описываемые в работе исследования проводились на самцах крыс Вистар, всего 310 особей. На момент начала эксперимента возраст животных составил 12 недель, а вес – 180–230 г. Все запланированные в исследовании процедуры с животными рассмотрены Локальным этическим комитетом ФГБНУ «ИЭМ», который пришел к заключению, что планируемое исследование соответствует принципам гуманного обращения с животными; количество запрашиваемых животных соответствует планируемым исследованиям; имеющаяся материальная база соответствует планируемым исследованиям, и запланированные манипуляции, согласно классификации, предложенной в директиве 2010/63/EU, относятся к категории легкой степени тяжести (Электронный ресурс. Directive 2010/63/eu of The European Parliament And Of The Council of 22 September 2010. Режим доступа: <https://eurlex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2010:276:0033:0079:EN:PDF> (Дата обращения 07.12.2019)). Перед началом каждого эксперимента животные акклиматизировались к условиям содержания в течение 10 дней, находясь на карантине в отдельном помещении вивария Физиологического отдела им. И.П. Павлова Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Институт экспериментальной медицины». В течение этого периода времени состояние животных ежедневно контролировалось при общем осмотре в клетке. При проведении всех экспериментов осуществлялся контроль параметров окружающей среды. Световой режим: 12 часов ночь – 12 часов день при искусственном освещении. Уход и содержание животных осуществлялось в соответствии со стандартами ФГБНУ «ИЭМ». Животные содержались по 8 особей в клетке, тип клетки IV (площадь пола клетки – 1815 см². В качестве подстилочного материала использовали наполнитель растительного происхождения – древесную стружку. На протяжении всего исследования использовали корм для лабораторных животных: «Комбикорм полнораціонный экструдированный для лабораторных животных (мышей, крыс, хомяков) для содержания». Корм давался животным без ограничения. Вода в поилках использовалась бутилированная. Для формирования экспериментальных групп использовали метод блочной рандомизации.

Общая характеристика пациентов. Все описываемые в данной части работы исследования построены на анализе вторичных данных. Первичные данные собирались врачами-неврологами при проведении собственных исследований, одобренных Локальным этическим комитетом ФГБНУ «ИЭМ». В исследование вошли данные, полученные при проведении неврологического осмотра 12 пациентов с диагнозом «эссенциальный тремор», которые проходили обследование на базе Общеполиклинического отделения СПб ГБУЗ «Городская поликлиника №120» за период с 2015 года по 2017 год; 12 пациентов с диагнозом «болезнь Паркинсона», которые проходили обследование на базе Клиники ФГБУ «НИИЭМ» СЗО РАМН за период с 2010 года по 2016 год. В качестве контроля использовались данные, полученные врачами-неврологами при обследовании 12 неврологически здоровых добровольцев.

Схема экспериментов по определению содержания и активности кальпаинов в мозге крыс после воздействия на организм субсептической дозы ЛПС. Исследование проводилось в два равнозначных этапа. В общей сложности в исследование вошло 180 животных, которые случайным образом разделялись на две группы. Первой, контрольной группе (n=60), однократно внутрибрюшинно вводили 1 мл апириногенного физиологического раствора, второй, экспериментальной группе (n=120), однократно внутрибрюшинно вводили ЛПС (*Escherichia coli* O55:B5) в дозе 1 мг/кг веса животного в 1 мл апириногенного физиологического раствора. Далее группы условно обозначали: контрольная группа – контроль; экспериментальная группа – ЛПС. Через 4 часа, а также на 7, 14, 30 и 180 день у 7 животных из каждой группы анализировали общую активность в тесте «Открытое поле». Через 4 и 24 часа, также на 7, 14, 30 и 180 день после начала эксперимента декапитировали по 20 животных из экспериментальной группы; через 4 часа, 24 часа и 180 дней – по 20

животных контрольной группы; собирали плазму крови; мозг извлекали из черепной коробки, из правого и левого полушария иссекали стриатум и гиппокамп. Материал использовали для определения содержания мРНК кальпаинов и др. (методом ОТ-ПЦР в реальном времени), для определения содержания и активности кальпаинов (методом Вестерн-блоттинга и зимографии в геле), для определения содержания моноаминов (ВЭЖХ-ЭД), оставшийся материал замораживали и использовали для увеличения объема выборки при необходимости.

Схема экспериментов по определению содержания и активности кальпаинов в мозге крыс после воздействия на организм хлорида марганца. Ввиду большого объема, исследование проводилось в два этапа. *Этап первый.* Животные были случайным образом разделены на 2 группы: первая – контрольная, вторая – опытная, по 20 крыс в каждой. 90 дней животным экспериментальной группы интраназально вводили 1 мг/кг $MnCl_2$ в объеме 10-20 мкл в зависимости от веса животного; животные контрольной группы получали физиологический раствор по аналогичной схеме. Далее группы условно обозначали: контрольная группа – контроль; экспериментальная группа – $MnCl_2$. У 10-ти животных из каждой группы на 20-й и 60-й день эксперимента оценивалась походка в тесте «Следы» и у 10-ти животных на 30-й и 90-й день эксперимента оценивалась двигательная активность в тесте «Открытое поле». Через 90 дней после начала эксперимента животных декапитировали; собирали плазму крови; мозг извлекали из черепной коробки, из правого и левого полушария иссекали стриатум и гиппокамп. Материал использовали для определения содержания марганца (методом атомно-абсорбционной спектрометрии), для определения содержания и активности кальпаинов (методом Вестерн-блоттинга и зимографии в геле), для определения содержания моноаминов (методом ВЭЖХ-ЭД), для определения содержания мРНК кальпаинов и др. (методом ОТ-ПЦР в реальном времени). От остальных животных материал замораживали и использовали для увеличения объема выборки при необходимости. *Этап второй.* Животные были случайным образом разделены на три группы, по 20 особей в каждой. 30 дней животным экспериментальной группы интраназально вводили 1 мг/кг $MnCl_2$ в объеме 10-20 мкл в зависимости от веса животного; животные второй экспериментальной группы 30 дней получали интраназально 1 мг $MnCl_2$ в объеме 10-20 мкл в зависимости от веса животного и дополнительно интраназально получали ингибитор кальпаина– пептид, соответствующий аминокислотной последовательности кальпастина человека с 184 по 210 аминокислоту (далее Cast (184-210)) в дозе 50 мкг/кг в объеме 10-20 мкл в зависимости от веса животного; животные контрольной группы получали физиологический раствор по аналогичной схеме. Далее группы условно обозначали: контрольная группа – контроль; экспериментальная группа – $MnCl_2$, вторая экспериментальная группа – $MnCl_2$ + Cast (184-210). У всех животных на 20-й день эксперимента оценивалась походка в тесте «Следы» и на 30-й день – двигательная активность в тесте «Открытое поле». На 30-й день эксперимента всех животных декапитировали, собирали плазму крови; мозг извлекали из черепной коробки, из правого и левого полушария иссекали стриатум и гиппокамп. Материал использовали аналогично первому этапу.

Методы анализа поведения животных. Тест «Открытое поле» проводили согласно процедуре, описанной в (Ivleva I.S. et al., 2020), фиксировали суммарную пройденную дистанцию и время нахождения в неподвижном состоянии. Тест «Следы» проводили по методике (Амикишиева А. В, 2009), фиксировали ширину и длину шага.

Лабораторные методы исследования. Получение синаптосом. Синаптосомы выделяли из ткани стриатума животных по методу, описанному в (Krueger, В. К., 1977). За целостностью синаптосом следили по активности лактатдегидрогеназы (ЛДГ) в инкубационной среде (Xu J., 2013). Активность ЛДГ анализировали с помощью коммерческого набора реактивов Promega (Madison, WI, USA).

Вестерн-блотт. Белки разделяли в 12% полиакриламидном геле (ПААГ) по Лэммли. Иммуномечение осуществляли с помощью антител производства Abcam (UK): № ab28258,

ab39165, ab28253, ab112, ab34731. В работе использовали вторые антитела к IgG кролика, конъюгированные с пероксидазой хрена (ab91866). Пероксидазную реакцию выявляли методом усиленной хемилюминесценции – ab133409 Optiblot ECL Ultra Detect Kit, денситометрический анализ проводили с помощью программы ImageJ.

Иммунопреципитация. m-кальпаин преципитировали из среды после инкубации синапсом с различными добавками. Для этого к 100 мкл супернатанта добавляли 5 мкл поликлональных антител против m-кальпаина (Abcam №ab39165) и инкубировали на протяжении ночи при постоянном перемешивании при 4°C. Далее пробы в течение 4 часов инкубировали с 70 мкл 50%-ной сефарозы, конъюгированной с белком А, при постоянном перемешивании и при 4°C. Затем образцы центрифугировали при 3000g 5 минут. Осадок трижды промывали в буфере следующего состава: 150 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl (pH=7,4), 1 mM ЭДТА, 0,1% Triton X-100, 0,1% бета-меркаптоэтанол. Комплекс разрушали кипячением в течение 5 минут в буфере для нанесения образцов и затем разделяли в ПААГ.

Казеиновая зимография в геле. Образцы гомогенизировали в 5-10 объемах буфера (150 mM NaCl, 10% глицин, 0,1% Triton X-100, 5 mM ЭДТА, 20 mM Tris-HCl (pH=7,6), 10 mM бета-меркаптоэтанол). Далее образцы центрифугировали 10 минут при 12000 g. Надосадок смешивали с буфером следующего состава: 0,0625 M Tris-HCl (pH=6,8), 10%-ный глицерин, 5%-ный бета-меркаптоэтанол, 0,001%-ный бромфеноловый синий. Аналитическое разделение белков проводили в 9% ПААГ. На дорожку наносили по 70 мкг суммарного белка. Затем гель переносили в активационный буфер (5 mM CaCl₂, 10 mM бета-меркаптоэтанол, 20 mM Tris-HCl (pH=7,0)) на 1 час. Затем гель переносили в активационный буфер аналогичного состава, но с pH=7,2 и оставляли на ночь. На следующий день гель переносили в активационный буфер аналогичного состава, но с pH=7,4 и выдерживали 1 час. Затем ПААГ окрашивали с помощью красителя Coomassie brilliant blue R-250. Об активности кальпаинов судили по площади неокрашенных красителем зон; изоформу кальпаина устанавливали, исходя из положения зоны относительно стандартного (коммерческого) образца μ - и m-кальпаина. Для выявления способности веществ напрямую активировать кальпаины использовали модифицированный метод казеиновой зимографии в геле: при проведении электрофоретического разделения белков в ПААГ на каждую дорожку наносили одинаковое количество белка из одной и той же пробы. Затем гель разрезали вдоль на три (или больше) одинаковые части. Одну часть инкубировали в активационном буфере стандартного состава. Вторую часть инкубировали в аналогичных условиях, но вместо 5 mM CaCl₂ добавляли 10 mM NaCl (отрицательный контроль – в отсутствие кальция в среде кальпаины не активируются). Третью часть геля инкубировали в аналогичных условиях, но 5 mM CaCl₂ заменяли на вещество интереса.

Казеиновая зимография в растворе. Исследуемый образец разбавляли буфером (250 mM Tris-HCl, 150 mM KCl, 2 mM CaCl₂, 0,01% FITC-казеин (pH=7,4)) в отношении 1:1 и инкубировали при 25°C в течение необходимого времени, которое указано в каждом случае отдельно. После инкубации образец смешивали с буфером для нанесения образцов следующего состава: 0,0625 M Tris-HCl, 2%-ный додецилсульфат натрия, 10%-ный глицерин, 5%-ный бета-меркаптоэтанол, 0,001%-ный бромфеноловый синий (pH=6,8). Образец подвергали электрофоретическому разделению, зоны FITC-казеина визуализировали с помощью Molecular Imager GelDoc XR+, Bio-Rad при 280 нм. Об активности кальпаинов судили по степени деградации FITC-казеина.

Содержание марганца в образцах определяли методом атомно-абсорбционной спектроскопии как описано в (Ivleva I.S. et al., 2020).

Определение уровней экспрессии генов. Об уровне экспрессии генов судили по содержанию мРНК мишени относительно количества мРНК референсного гена (Gapdh и Sustr), применяли метод обратной транскрипции с последующей полимеразной цепной реакцией (ОТ-ПЦР) в режиме реального времени. Выделение тотальной РНК проводили методом гуанидин-изотиоцианат-фенол-хлороформной экстракции согласно протоколу,

прилагаемому к TRI-реагенту. Реакцию ОТ проводили согласно протоколу, прилагаемому к M-MLV. Определение количества мРНК производили $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -методом. Последовательность праймеров и условия проведения ПЦР представлены в (Ivleva I.S. et al., 2020 и Maystrenko V.A. et al., 2020). Данные выражали в относительных единицах.

Определение содержания моноаминов осуществляли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с электрохимическим детектором (ВЭЖХ-ЭД). Процедура пробоподготовки, состав подвижной фазы и условия разделения описаны в (Dremencov E. et al., 2019 и Ivleva I.S., 2020). Данные представляли в условных единицах.

Компьютерные программы и базы данных. Поиск сигнальных пептидов, определяющих способность кальпаинов секретироваться клетками по классическому пути, проводился с помощью инструмента PrediSi (<http://www.predisi.de>). Вероятность секреции кальпаинов клетками по неклассическому пути рассчитывалась с помощью сервиса SecretomeP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SecretomeP2>). согласно рекомендациям, указанным в (Bendtsen J.D. et al., 2004). Поиск потенциальных субстратов кальпаина среди внеклеточных белков проводили с помощью базы данных CaMPDB, Calpain for Modulatory Proteolysis Database (<http://www.calpain.org/predict.rb?cls=substrate>). Выравнивание аминокислотных последовательностей осуществляли в MultAlin (<http://bioinfo.genotoul.fr/multalin/multalin.html>).

Методы математической статистики. Обработка данных производилась с использованием пакета статистических программ «Statistica 10.0» (StatSoft, США). Нормальность распределения проверяли критерием Шапиро-Уилка. Для регистрируемых количественных переменных, в случае подтверждения гипотезы о нормальности распределения, рассчитывались среднее значение параметра в группе (Mean) и ошибка среднего (\pm SEM); в противном случае – медиана (нижняя квантиль; верхняя квантиль). Данные для контрольных и экспериментальных групп подвергались статистической обработке с использованием параметрических критериев (тест Стьюдента - в случае двух групп; дисперсионный анализ с последующим применением post hoc критерия Тьюки – в случае трех или более групп) или непараметрических критериев (Краскела-Уоллиса и Ньюмана-Кейлса). Для сравнения долей использовался точный критерий Фишера с поправкой на множественные сравнения; для выявления статистических зависимостей рассчитывали коэффициент корреляции Кендалла или Спирмена. Величина эффекта вычислялась в программе G*Power 3.1.9.2 software для уровня значимости 5% при мощности в 90%. При применении всех статистических критериев различия считались значимыми при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

1. Влияние различных биологически активных веществ на активность кальпаинов *in vitro*

Обоснование выбора биологически активных веществ. Для проверки возможности регуляции активности кальпаинов с помощью биологически активных веществ (БАВ) были выбраны следующие препараты.

МФТП (МРТР) — 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридин — органическое соединение, проникает через гематоэнцефалический барьер (ГЭБ), метаболизируется до токсичного катиона 1-метил-4-фенилпиридиния (МФП+) под действием моноаминоксидазы типа В (МАО-В) и блокирует комплекс I в цепи переноса электронов, что приводит к гибели клеток (преимущественно, ДА-нейронов). Соединение используется в промышленности, применяется для моделирования БП на лабораторных животных (Langston J.W., 2017).

$MnCl_2$ — неорганическое соединение, проникает через ГЭБ, используя транспортеры двухвалентных металлов и/или транспортер дофамина; накапливается преимущественно астроцитами, токсичен для ДА-, ГАМК-, АцХ-ергических нейронов. Соединение широко используется в промышленности, применяется для моделирования марганцевой энцефалопатии на лабораторных животных (Chen P. et al., 2018).

3-НПК — 3-нитропропионовая кислота — органическое соединение, проникает через ГЭБ, ингибирует сукцинатдегидрогеназу в митохондриальной цепи переноса электронов, что приводит к нарушению метаболизма глюкозы, снижению синтеза АТФ, преимущественно страдают ДА-нейроны. Является микотоксином, используется для моделирования БП и болезни Гентингтона (Francis K. et al., 2013).

ЛПС — липополисахарид, основной компонент клеточной стенки грамотрицательных бактерий, проникает через ГЭБ; в субсептических дозах используется для моделирования БП (Lopes P.C., 2016; Vargas-Caraveo A., et al., 2017; Batista C.R.A. et al., 2019).

Для проверки способности выбранных соединений напрямую активировать кальпаины был применён модифицированный метод казеиновой зимографии в геле, где в активационный буфер вместо 5мМ $CaCl_2$ вносили 2мМ $MnCl_2$ или 0,5мМ МФТП, или 10 мМ 3-НПК, или 5 мкг/мл ЛПС. Оказалось, что из всех тестируемых соединений только хлорид марганца (рис.1) вызывает активацию μ -кальпаина, при этом m -кальпаин в этих условиях не активируется.



Далее была определена активность кальпаинов в выделенных нервных окончаниях – синапсосомах, являющихся наилучшей моделью для изучения синаптической передачи (Evans G.J.O., 2015), – после их инкубации с тестируемыми БАВ (отметим, что в нервных окончаниях присутствует исключительно m -кальпаин (Ahmad F. et al., 2018)). Об активации m -кальпаина во время инкубации синапсом судили по уменьшению площади зоны, соответствующей m -кальпаину, с одновременным увеличением площади зоны, соответствующей его автолизованной форме (рис. 2).

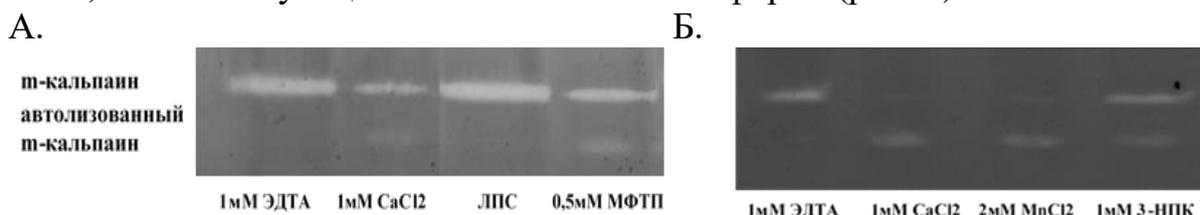


Рисунок 2 – Казеиновая зимограмма, отражающая активность m -кальпаина после инкубации синапсом с ЛПС (5 мкг/мл образца), 0,5 мМ МФТП (А) и с 2мМ $MnCl_2$, 10мМ 3-НПК (Б), Отрицательным контролем служил образец, к которому добавляли 1мМ ЭДТА, а положительным – 1мМ $CaCl_2$.

Как видно из данных, представленных на рис. 2, добавление в среду для инкубации синапсом 0,5 мМ МФТП или 1 мМ 3-НПК приводит к активации синапсомального m-кальпаина, но его активность ниже, чем при добавлении 1 мМ CaCl₂. В случае же с инкубацией синапсом в присутствии 2 мМ MnCl₂ активность m-кальпаина сопоставима с таковой при аппликации 1 мМ CaCl₂. Добавление ЛПС никак не сказалось на активности m-кальпаина.

Для выявления последствий активации m-кальпаинамы определили содержание дофамина в инкубационной среде синапсом в зависимости от активности протеазы. Добавление 1 мМ ЭДТА приводило к снижению ($p=0,001$), а 1 мМ CaCl₂ – к увеличению ($p=0,002$) уровня дофамина в инкубационной среде по сравнению с образцом без добавок, добавление же синтетических ингибиторов кальпаина вызывало повышение уровня внесинапсомального дофамина по сравнению с инкубированным без добавок контролем ($p=0,001$ и $p=0,02$ для ингибитора кальпаина I и II соответственно), но не достигало уровня положительного контроля ($p=0,02$ для обоих ингибиторов по сравнению с добавлением 1 мМ CaCl₂). Эффект ингибиторов в присутствии ионов кальция был аналогичным: одновременное добавление к синапсомам 1 мМ CaCl₂ и 50 мкМ соответствующего ингибитора приводило к увеличению уровня дофамина в среде по сравнению с образцом, к которому добавляли только 1 мМ CaCl₂ ($p=0,02$ и $p=0,03$ для ингибитора кальпаина I и II соответственно). Таким образом, на модели синапсом, нами было показано, что подавление активности кальпаинов вызывает увеличение уровня внесинапсомального дофамина как в присутствии ионов кальция, так и без добавления CaCl₂, следовательно, изменение активности m-кальпаина сказывается на функциональной активности синапса.

2. Влияние биологически активных веществ на способность m-кальпаина высвобождаться из синапсом

Общепризнано, что кальпаины локализуются исключительно внутриклеточно (Goll D.E. et al., 2003). Немногочисленные экспериментальные исследования свидетельствуют о внеклеточной локализации кальпаинов (Laske C. et al., 2015 и др.). В связи с этим мы проверили наличие m-кальпаина в среде после инкубации синапсом в стандартном растворе Рингера-Кребса и в присутствии указанных выше добавок. Для этого синапсомы 30 мин инкубировали в присутствии 1 мМ CaCl₂ (кальпаин активен). После инкубации образцы центрифугировали, а в надосадочной жидкости методом иммунопреципитации идентифицировали m-кальпаин. Результаты приведены на рис. 3.

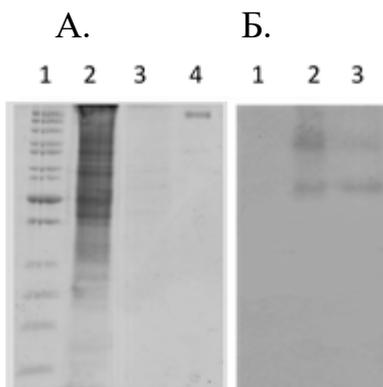


Рисунок 3 – Обнаружение m-кальпаина в среде после инкубации синапсом. А. Электрофореграмма 1. Маркеры молекулярного веса 2. Гомогенат синапсомальной фракции 3. Преципитат из инкубационной среды 4. Антитела к m-кальпаину. Б. Иммуноблотт, проявленный антителами против m-кальпаина, дорожки соответствуют 1-3 на электрофореграмме. Верхняя зона соответствует m-кальпаину, нижняя – его автолизированной форме.

Оказалось, что после инкубации синапсом в присутствии 1мМ CaCl₂ в среде выявляется полноразмерная и автолизированная форма m-кальпаина. Здесь и во всех последующих экспериментах активность ЛДГ в инкубационной среде не превышала 3% от активности в гомогенате синапсом после обработки ультразвуком, таким образом, обнаружение m-кальпаина в инкубационной среде синапсом не может быть следствием их разрушения.

Далее мы проанализировали зависимость между временем инкубации синапсом в растворе Рингера-Кребса в присутствии различных концентраций CaCl₂ и активностью m-кальпаина в среде. Об активности m-кальпаина судили по степени расщепления FITC-казеина (рис. 4).

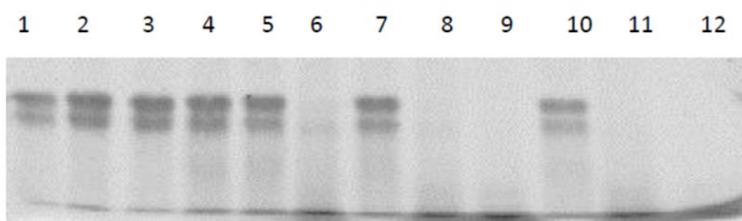


Рисунок 4 – Казеинограмма, отражающая зависимость между временем инкубации синапсом в растворе Рингера-Кребса в присутствии CaCl₂ и активностью m-кальпаина в среде. 1-3 инкубация в

присутствии 2 мМ ЭДТА (30, 60 и 90 минут); 4-6 инкубация в присутствии 10 мкМ CaCl₂ (30, 60 и 90 минут); 7-9 инкубация в присутствии 100 мкМ CaCl₂ (30, 60 и 90 минут); 10-12 инкубация в присутствии 1 мМ CaCl₂ (30, 60 и 90 минут).

Оказалось, что при увеличении времени инкубации синапсом от 30 мин до 90 мин степень расщепления казеина пропорционально увеличивается, R=0,82, p<0,05 (данные по пяти независимым опытам). В отсутствие ионов кальция в среде (к буферу Рингера-Кребса добавляли 2 мМ ЭДТА) высвобождения m-кальпаина из синапсом не происходило.

В отдельной серии экспериментов после инкубации синапсом в присутствии 1мМ ЭДТА или 1мМ CaCl₂, отделив инкубационную среду, мы переводили синапсомы в раствор Рингера-Кребса, содержащий 150 мМ KCl (далее раствор D-Рингера-Кребса). В ответ на такое воздействие синапсомы отвечают выбросом в среду нейромедиаторов (в наших экспериментах анализировалось содержание дофамина, поскольку синапсомы выделяли из ткани стриатума). В инкубационной среде анализировали активность m-кальпаина (рис. 5).

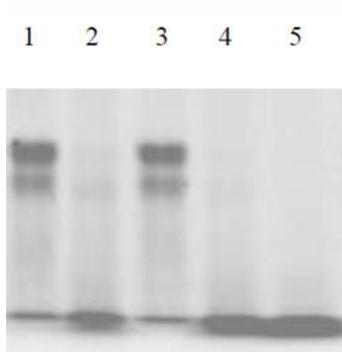


Рисунок 5 – Казеинограмма, отражающая влияние деполяризации синапсом на активность кальпаина в инкубационной среде. 1. Инкубация синапсом в растворе Рингера-Кребса, содержащем 1мМ ЭДТА; 2. Инкубация синапсом в растворе Рингера-Кребса, содержащем 1мМ CaCl₂; 3. Проба №1 после смены среды на «свежий» раствор Рингера-Кребса; 4. Проба №1 после смены среды на раствор D-Рингера-Кребса; 5. Проба №2 после смены среды на раствор D-Рингера-Кребса.

Таким образом, такой физиологический стимул как деполяризация, по-видимому, вызывает высвобождение/секрецию m-кальпаина из синапсом, что в совокупности с данными о зависимости этого процесса от содержания ионов кальция в среде позволяет предположить, что секреция происходит путем экзоцитоза.

Далее мы анализировали влияние выбранных ранее БАВ на высвобождение/секрецию m-кальпаина из синапсом. Для этого добавляли в инкубационную среду синапсом ЛПС (5 мкг/мл образца), 0,5 мМ МФТП, 2 мМ MnCl₂, 10 мМ 3-НПК. Отрицательным контролем служил образец, к которому добавляли 2мМ ЭДТА, а положительным – 1мМ CaCl₂. Во всех экспериментах содержание ЛДГ в инкубационной среде не превышало 3% от суммарного. Данные представлены на рис. 6.

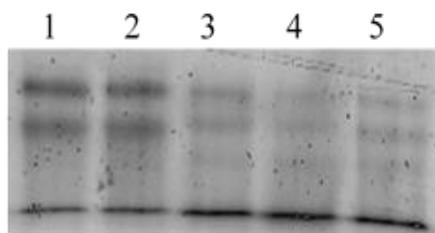


Рисунок 6 – Казеинограмма, отражающая влияние БАВ на содержание/активность кальпаина в инкубационной среде. Инкубация синапсом (30 мин) в растворе Рингера-Кребса, содержащем: 1. 2 мМ ЭДТА; 2. ЛПС (5 мкг/мл образца); 3. 0,5 мМ МФТП; 4. 2 мМ MnCl₂; 5. 1мМ CaCl₂.

Инкубация синапсом в присутствии 2 мМ MnCl₂, 0,5 мМ МФТП привела к высвобождению m-кальпаина в инкубационную среду, причем эффект был сопоставим с действием 1 мМ CaCl₂; при аппликации ЛПС такого эффекта не наблюдалось, что можно объяснить отсутствием рецепторов к ЛПС на мембране синапсом. При инкубации синапсом с 10 мМ 3-НПК в течение 30 минут и 60 минут мы не обнаружили активности m-кальпаина в среде (данные не показаны). Обобщая вышеизложенное можно предположить, что в физиологических условиях кальпаины локализуются внутриклеточно в свободной и/или мембрансвязанной форме; при развитии определенных форм патологии или при действии некоторых экологических факторов клетки приобретают способность секретировать или высвобождать кальпаин.

3. Выявление механизма высвобождения/секреции m-кальпаина из синапсом

С целью выявления в аминокислотной последовательности μ - и m-кальпаинов (для человека и крысы) сигнальных пептидов, определяющих секрецию белка из клетки по классическому пути, был проведен их поиск с помощью ресурса PrediSi, результаты приведены в табл. 1.

Таблица 1. Вероятность секреции кальпаинов по классическому пути.

Субъединица	Расчетный индекс [#]	Предполагаемый сайт отщепления [*]	Прогноз
NP_001185797.1 каталитическая субъединица μ -кальпаина человека	0,0870	60-61	-
NP_001739.31 каталитическая субъединица m-кальпаина человека	0,5228	122-123	+
NP_001289562.1 регуляторная субъединица кальпаинов человека	0,0000	-	-
NP_062025.1 каталитическая субъединица μ -кальпаина крысы	0,5228	122-123	+
EDL94875.1 каталитическая субъединица m-кальпаина крысы	0,5228	122-123	+
NP_058814.1 регуляторная субъединица кальпаинов крысы	0,4117	43-44	-

[#]- прогноз считается положительным, если расчетный индекс >0.500

^{*}- указаны номера аминокислотных остатков

Как видно из данных, представленных в табл.1, существуют варианты, при которых есть основания полагать, что каталитические субъединицы кальпаинов человека и крысы могут «секретироваться» из клетки по классическому пути. Однако отщепление предсказанного сигнального пептида (A122–R123, нумерация для изоформы 1 m-кальпаина человека) привело бы к нарушению формирования каталитической триады m-кальпаина, а мы обнаруживаем в инкубационной среде активный m-кальпаин.

Далее мы провели анализ аминокислотной последовательности кальпаинов с помощью сервиса SecretomeP 2.0 с целью вычисления вероятности секреции кальпаинов по неклассическому пути. Данные представлены в табл.2.

Таблица 2. Вероятность секреции кальпаинов по неклассическому пути.

Субъединица	Расчетный индекс [#]	Отношение шансов	Прогноз
NP_001185797.1 каталитическая субъединица μ -кальпаина человека	0,554	1,2	-
NP_001739.31 каталитическая субъединица m-кальпаина человека	0,506	1,0	-
NP_001289562.1 регуляторная субъединица кальпаинов человека	0,667	1,7	+
NP_062025.1 каталитическая субъединица μ -кальпаина крысы	0,572	1,3	-
EDL94875.1 каталитическая субъединица m-кальпаина крысы	0,477	0,9	-
NP_058814.1 регуляторная субъединица кальпаинов крысы	0,858	4,8	+

[#]- прогноз считается положительным, если расчетный индекс >0.600

Как видно из данных, представленных в табл.2, регуляторная субъединица кальпаинов человека и крысы может секретироваться по неклассическому пути. Известно, что некоторые белки высвобождаются во внеклеточное пространство, используя разные механизмы, в зависимости от функционального состояния клетки. Поскольку при деполяризации синапсом хлоридом калия мы наблюдали вторую «волну» выброса кальпаина во внесинапсомальную среду, то одним из возможных путей секреции кальпаина может быть экзоцитоз синаптических везикул. Чем обусловлено высвобождение кальпаина во внеклеточную среду в отсутствие деполяризации – не ясно. В работе Perez K. с коллегами (2016) удалось показать, что лимфоциты, выделенные из селезенки мыши, секретируют кальпаин по ABCA1-зависимому пути в составе микровезикул, которые во внеклеточной среде быстро разрушаются и высвобождают свое содержимое. Их гипотеза строится на том, что добавление в культуральную среду 100 мкМ глибенкламида (ингибитор ABCA1-транспортера) отменяло секрецию кальпаинов (μ - и m -кальпаина). В связи с этими данными был проведен эксперимент с добавлением глибенкламида в раствор Рингера-Кребса для инкубации синапсом. Результаты представлены на рис. 7.

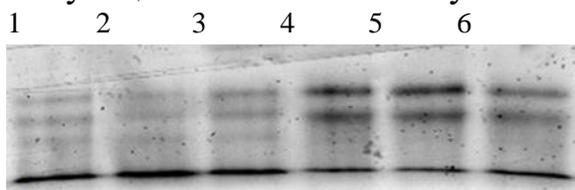


Рисунок 7 – Казеинограмма, отражающая влияние глибенкламида на активность (содержание) кальпаина в инкубационной среде. Инкубация синапсом (30 мин) в растворе Рингера-Кребса, содержащем:

1. 1 мМ CaCl₂; 2. 2 мМ CaCl₂; 3. 2 мМ MnCl₂; 4. 1 мМ CaCl₂ + 100 мкМ глибенкламида; 5. 2 мМ CaCl₂ + 100 мкМ глибенкламида; 6. 2 мМ MnCl₂ + 100 мкМ глибенкламида.

Оказалось, что добавление в инкубационную среду глибенкламида подавляло CaCl₂- и MnCl₂-индуцированное высвобождение кальпаина из синапсом. Таким образом, полученные данные позволяют выдвинуть гипотезу о существовании, как минимум, двух механизмов высвобождения/секреции кальпаина нервными окончаниями: при деполяризации синаптических окончаний и через ABCA1-транспортер.

С целью выявления функций «внеклеточных» кальпаинов в ЦНС, мы провели поиск потенциальных субстратов кальпаина среди внеклеточных и трансмембранных белков. Оказалось, что матриксная металлопротеаза 2 (MMP2) имеет три потенциальных сайта расщепления кальпаином: Pos. 551 - Score: 0,56 (p-val: < 9,3e-5); Pos. 426 - Score: 0,41 (p-val: < 1,3e-4); Pos. 55 - Score: 0,40 (p-val: < 1,3e-4). Матриксная металлопротеаза 9 (MMP9) – два: Pos. 641 - Score: 0,46 (p-val: < 1,3e-4) и Pos. 156 - Score: 0,45 (p-val: < 1,3e-4). Внеклеточный домен D(1A) рецептора дофамина - Pos. 164 - Score: 0.38 (p-val: < 1,3e-4) и один потенциальный сайт на внеклеточном домене D(4) - Pos. 13 - Score: 0,36 (p-val: < 6,2e-4). Кроме этого, было обнаружено три потенциальных сайта расщепления кальпаином у альфа-синуклеина: 1.Pos. 73 - Score: 0,90 (p-val: < 4,1e-5); 2.Pos. 74 - Score: 0,74 (p-val: < 9,3e-5); 3.Pos. 83 - Score: 0,49 (p-val: < 1,3e-4). Также потенциальным субстратом кальпаинов может быть

КОМТ (Pos. 108 - Score: 0,92 (p-val: < 4,1e-5)). Таким образом, принимая во внимание возможную внеклеточную локализацию кальпаинов, список потенциальных субстратов кальпаинов может быть существенно расширен.

4. Содержание и активность кальпаинов в мозге крыс после действия биологически активных веществ

Из четырех тестируемых в системе *in vitro* веществ для выявления их влияния на продукцию и активность кальпаинов *in vivo* было выбрано два – ЛПС (прямого эффекта на активность кальпаинов не оказывает, не стимулирует секрецию m-кальпаина из синапсом) и $MnCl_2$ (обладает прямым активирующим действием на μ -кальпаин, стимулирует высвобождение m-кальпаина из синапсом). Экспериментальным животным однократно внутрибрюшинно вводили субсептическую дозу ЛПС (1 мг/кг) или хронически интраназально вводили $MnCl_2$ (90 дней, 1 мг $MnCl_2$ в день). При выбранных схемах воздействия наблюдается длительный латентный период с неизбежным развитием нейродегенерации, что дает возможность «проследить» за компенсаторными реакциями мозга и их переходом в патологические.

Уже через час после инъекции ЛПС у животных наблюдалось повышение глубокой температуры тела в среднем на $2,0^{\circ}C$; максимальный подъем температуры на $2,4^{\circ}C$ был зафиксирован через два часа после введения ЛПС (до $39,8^{\circ}C$). Эффект сохранялся до 4 часов. Через 4 часа после инъекции ЛПС в тесте «Открытое поле» у всех экспериментальных животных было отмечено снижение общей активности (суммарное количество актов (шт): 100 ± 8 в экспериментальной группе против 180 ± 20 в контрольной группе, $p=0,03$). Эти изменения были обусловлены снижением количества локомоций и увеличением времени замираний (фризинга). При тестировании животных через 7 и 14 дней после введения ЛПС межгрупповых различий найдено не было. На 180 день после введения эндотоксина у 85% животных, получивших инъекцию ЛПС, при визуальном осмотре наблюдалось нарушение позы, тремор головы и передних конечностей, ригидность мышц передних и задних конечностей. Также у экспериментальных животных наблюдали снижение двигательной активности: пройденное расстояние (м) с $20,0 \pm 0,6$ в контрольной группе снизилось до $16,0 \pm 1,2$ в экспериментальной группе, $p=0,012$; время, проведенное в неподвижном состоянии (с), напротив, увеличилось с $73,0 \pm 2,1$ в контрольной группе до $87,7 \pm 3,5$ в экспериментальной группе, $p=0,004$.

Далее на различных сроках после введения ЛПС в клетках гиппокампа и стриатума анализировали содержание мРНК и активность μ -и m-кальпаина. Были выбраны эти две области мозга, поскольку именно они в первую очередь реагируют на воздействие любого рода, и в норме в клетках этих областей мозга μ - и m-кальпаины представлены в сопоставимом количестве. Поскольку введение ЛПС приводит к развитию дегенеративных изменений по типу болезни Паркинсона (Brown G.C., 2019 и мн. др.), в этих же структурах было

проанализировано содержание норадреналина, дофамина и его метаболитов. Для оценки выраженности нейровоспаления определяли уровни мРНК основных провоспалительных цитокинов (ИЛ-1 β , ФНО α) и маркера активации микроглии – белка IBA-1. Полученные данные суммированы в табл.3. и табл.4.

Таблица 3. Реакция клеток гиппокампа на однократное внутрибрюшинное введение крысам ЛПС в дозе 1 мг/кг в зависимости от времени после инъекции.

Показатель \ время после инъекции	4 ч	24 ч	7д	14д	30д	180 д
мРНК ИЛ-1 β	2,6 ± 0,2*	5,0 ± 0,2	1,1 ± 0,2	1,1 ± 0,2	1,1 ± 0,2	1,2 ± 0,3
мРНК ФНО α	3,5 ± 0,4	5,1 ± 0,3	1,8 ± 0,2	1,5 ± 0,1	1,5 ± 0,5	1,9 ± 0,2
мРНК IBA-1	0,9 ± 0,3	1,1 ± 0,3	1,0 ± 0,3	1,1 ± 0,2	1,1 ± 0,3	1,1 ± 0,3
ДА	0,7 ± 0,2	0,7 ± 0,1	0,5 ± 0,2	0,7 ± 0,0	1,1 ± 0,1	1,1 ± 0,4
ДОФУК	1,0 ± 0,1	0,8 ± 0,0	1,0 ± 0,1	0,9 ± 0,0	1,0 ± 0,0	1,2 ± 0,3
ГВК	1,0 ± 0,1	1,0 ± 0,1	0,9 ± 0,1	0,9 ± 0,1	1,0 ± 0,1	1,0 ± 0,2
НА	2,0 ± 0,2	2,1 ± 0,3	3,5 ± 0,5	3,9 ± 0,5	1,1 ± 0,2	0,9 ± 0,1
мРНК кальпаstatин	0,8 ± 0,3	1,2 ± 0,2	1,1 ± 0,3	0,9 ± 0,2	1,2 ± 0,4	1,0 ± 0,2
мРНК μ -кальпаин	1,2 ± 0,1	1,6 ± 0,2	2,4 ± 0,2	1,3 ± 0,2	1,0 ± 0,1	2,3 ± 0,1
мРНК m -кальпаин	0,9 ± 0,2	1,1 ± 0,2	1,6 ± 0,2	1,2 ± 0,2	1,2 ± 0,2	1,2 ± 0,1
μ -кальпаин	1,0 ± 0,1	1,8 ± 0,1	2,4 ± 0,3	2,8 ± 0,2	1,1 ± 0,1	1,7 ± 0,3
m -кальпаин	1,1 ± 0,1	2,3 ± 0,4	3,0 ± 0,5	3,5 ± 0,5	2,0 ± 0,1	0,9 ± 0,2

*- жирным шрифтом выделены показатели значимо отличающиеся от контрольной группы (уровень значимости $p < 0,05$); курсивом выделены показатели, значимо отличающиеся от точки 24 часа.

Таблица 4. Реакция клеток стриатума на однократное внутрибрюшинное введение крысам ЛПС в дозе 1 мг/кг в зависимости от времени после инъекции.

Показатель \ время после инъекции	4 ч	24 ч	7д	14д	30д	180 д
мРНК ИЛ-1 β	3,4 ± 0,1	2,3 ± 0,1	2,1 ± 0,1	2,0 ± 0,2	2,3 ± 0,3	1,6 ± 0,3
мРНК ФНО α	1,2 ± 0,2	1,8 ± 0,1	1,9 ± 0,1	2,0 ± 0,1	2,3 ± 0,2	2,5 ± 0,3
мРНК IBA-1	1,0 ± 0,1	2,0 ± 0,1	5,0 ± 0,2	5,6 ± 0,5	6,2 ± 0,6	12,3 ± 0,5
ДА	1,0 ± 0,1	0,8 ± 0,1	1,4 ± 0,1	1,4 ± 0,1	0,9 ± 0,1	0,6 ± 0,1
ДОФУК	1,0 ± 0,1	0,8 ± 0,1	1,6 ± 0,1	1,2 ± 0,1	1,0 ± 0,1	0,6 ± 0,1
ГВК	1,0 ± 0,1	0,8 ± 0,1	1,0 ± 0,0	0,9 ± 0,1	1,0 ± 0,1	3,1 ± 0,2
НА	1,1 ± 0,1	2,5 ± 0,2	2,8 ± 0,3	1,2 ± 0,2	1,0 ± 0,1	1,1 ± 0,1
мРНК кальпаstatин	1,3 ± 0,3	1,6 ± 0,2	2,1 ± 0,3	2,3 ± 0,2	1,2 ± 0,1	1,2 ± 0,2
мРНК μ -кальпаин	1,6 ± 0,1	2,3 ± 0,2	1,3 ± 0,1	1,2 ± 0,1	1,1 ± 0,1	4,2 ± 0,5
мРНК m -кальпаин	1,0 ± 0,2	1,2 ± 0,2	3,2 ± 0,2	3,1 ± 0,1	2,0 ± 0,2	4,8 ± 0,3
μ -кальпаин	0,9 ± 0,1	1,0 ± 0,1	0,7 ± 0,1	0,8 ± 0,2	0,9 ± 0,2	0,8 ± 0,1
m -кальпаин	0,9 ± 0,1	0,8 ± 0,1	0,8 ± 0,1	0,9 ± 0,3	0,9 ± 0,1	2,4 ± 0,2

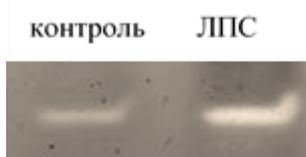
*- жирным шрифтом выделены показатели значимо отличающиеся от контрольной группы (уровень значимости $p < 0,05$); курсивом выделены показатели, значимо отличающиеся от точки 24 часа.

Внутрибрюшинное введение субсептической дозы ЛПС крысам в остром периоде вызвало в клетках гиппокампа усиление продукции мРНК основных провоспалительных цитокинов без признаков активации микроглии, снижение содержания дофамина и увеличение содержания норадреналина, сопровождаемое усилением продукции мРНК и активности μ - и m -кальпаина, с восстановлением почти всех показателей до уровня значений контрольной группы к 30-му дню (остается повышенной только активность m -кальпаина).

В отдаленном периоде в клетках гиппокампа наблюдалось усиление продукции мРНК ФНО α , сопровождаемое усилением продукции мРНК, белка и активности μ -кальпаина (но не m -кальпаина) при неизменном относительно контроле содержании и скорости метаболизма дофамина и норадреналина. В клетках стриатума в остром периоде наблюдается усиление продукции мРНК основных провоспалительных цитокинов и маркера активации микроглии ИВА-1, причем содержанием РНК ФНО α и ИВА-1 к 30-му дню после введения ЛПС все еще остается на повышенном уровне. Наблюдаемое увеличение содержания норадреналина и дофамина, а также усиление продукции мРНК μ -кальпаина нивелируется к 30-му дню, но со временем усиливается продукция мРНК m -кальпаина. В отдаленном периоде наблюдается усиление продукции мРНК ФНО α и мРНК маркера активации микроглии ИВА-1, снижение скорости синтеза дофамина, сопряженное с усилением продукции мРНК и активности m -кальпаина (но не μ -кальпаина).

Как видно из данных, приведенных в табл.4, содержание дофамина и его внутриклеточного метаболита ДОФУК в гомогенате клеток стриатума через 180 дней после введения ЛПС снизилось более чем в два раза, а внеклеточного метаболита ГВК – возросло в 5 раз. В совокупности эти данные позволяют предположить, что в дофаминергических нейронах черной субстанции, имеющих свои окончания в стриатуме, снижается продукция дофамина, например, вследствие гибели нейронов, а в «уцелевших» нервных окончаниях компенсаторно усиливается выброс дофамина, что приводит к многократному увеличению содержания ГВК; этот процесс сопровождается активацией m -кальпаина. В связи с этим, была проанализирована активность m -кальпаина в синаптических окончаниях нейронов экспериментальных животных, получивших 180 дней назад инъекцию ЛПС. Для этого из ткани стриатума контрольных и экспериментальных животных были выделены синаптосомы, и в них методом зимографии в геле определили активность m -кальпаина. Данные представлены на рис. 8.

А.



Б.

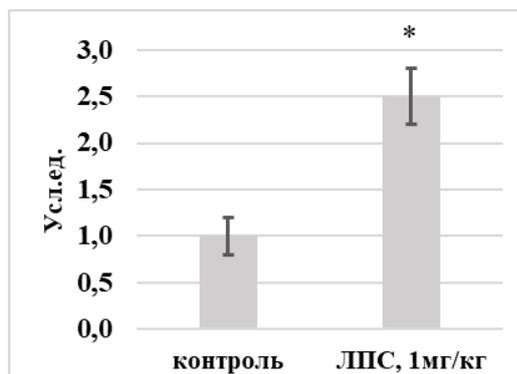


Рисунок 8 – Активность m -кальпаина в синаптосомах, выделенных из стриатумов крыс, получивших 180 дней назад инъекцию ЛПС в дозе 1 мг/кг.

А. Репрезентативная зимограмма. Б. Результаты измерения площадей обесцвеченных зон, $n=8$. Данные представлены как

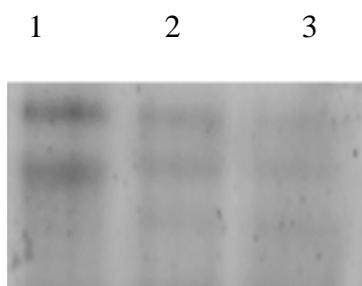
среднее \pm ошибка среднего; критерий Стьюдента для независимых выборок, * - $p < 0,05$ по сравнению с контролем.

Судя по данным, представленным на рис. 8, выявленное в гомогенате клеток стриатума повышение активности m -кальпаина характерно и для

синаптосомальной фракции. У этих же животных мы определили уровень синаптосомального дофамина. В контрольной группе он составлял $(5,5 \pm 0,2)$ нг/мкг белка синаптосом. У экспериментальных животных это значение было $(2,1 \pm 0,3)$ нг/мг белка синаптосом, что соответствует 2-х кратному снижению содержания нейромедиатора, $p=0,001$. Сопоставляя эти результаты с данными, представленными в табл.4, можно заметить, что выявленное снижение уровня дофамина в гомогенате клеток стриатума и в синаптосомальной фракции – сопоставимо. Принимая во внимание, что содержание ГВК в этих образцах было значимо выше, был проведен поиск вероятных сайтов расщепления кальпаинами у КОМТ и МАО-В. Оказалось, что в обоих ферментах катаболизма дофамина они выявляются: для КОМТ наиболее вероятный сайт расщепления Y255↓Q256 (для КОМТ крысы), а для МАО-В - R70↓L71 (для МАО-В крысы). Таким образом, m-кальпаин может напрямую модулировать катаболизм дофамина, например, расщепляя утилизирующие его ферменты. Однако расщепление КОМТ по этому сайту возможно только в случае внеклеточной локализации кальпаина, которая была продемонстрирована на модели выделенных нервных окончаний.

Поскольку в крови пациентов с БП и ЭТ обнаружено увеличение активности кальпаинов, этот параметр был проанализирован и в крови крыс через 180 дней после введения ЛПС, результаты приведены на рис. 9.

А.



Б.

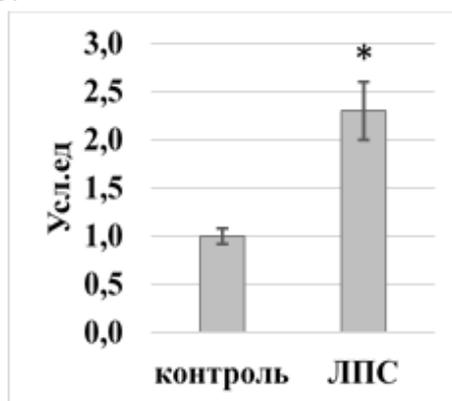


Рисунок 9– Казеинограмма, отражающая активность кальпаинов в плазме крови крыс через 180 дней после введения ЛПС, $n=5$. А. Вид типичной казеинограммы, где исходный FITC-казеин (1); FITC-казеин после инкубации с плазмой крови животных контрольной группы (2), FITC-казеин

после инкубации с плазмой крови животных группы ЛПС (3). Б. Результат денситометрирования зон, соответствующих фрагментам FITC-казеина. Средний показатель в контрольной группе принят за 1. Данные представлены как среднее \pm ошибка среднего; критерий Стьюдента для независимых выборок, * - $p < 0,02$ по сравнению с контрольной группой.

У крыс через 180 дней после интраперитонеального введения субсептической дозы ЛПС в плазме крови наблюдалось повышение активности кальпаинов. Для контрольной и экспериментальной группы сопоставили активность кальпаинов в плазме крови с активностью m-кальпаина в синаптосомах, выделенных из стриатума этих же животных. Результаты приведены на рис. 10.

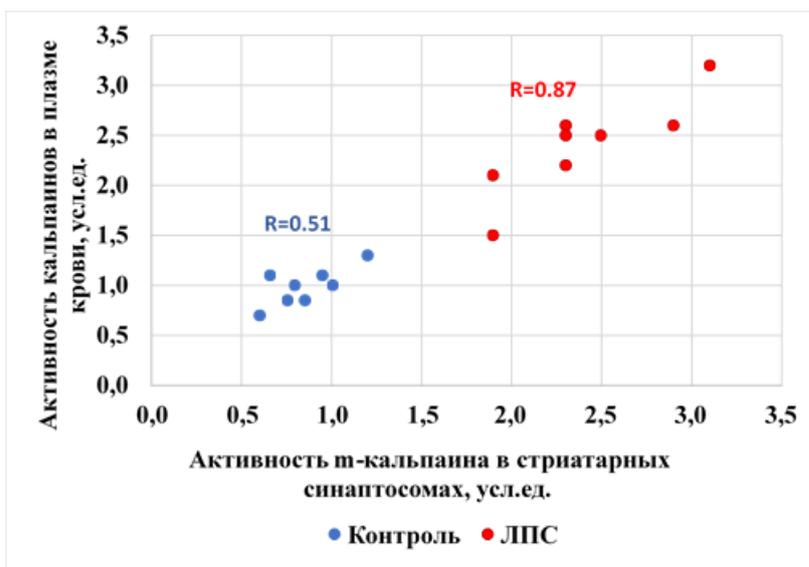
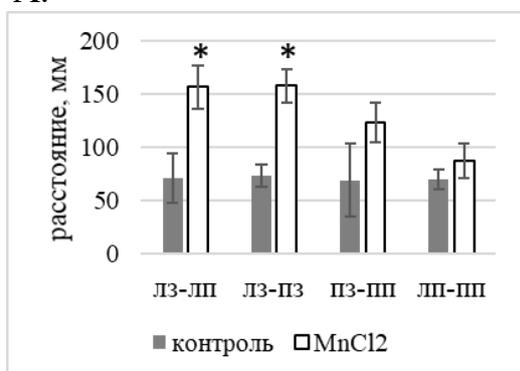


Рисунок 10 – Диаграмма рассеяния, отражающая зависимость между активностью кальпаинов в плазме крови и активностью m-кальпаина в синапсосамах, выделенных из ткани стриатумов. Данные представлены в условных единицах, рассчитанных относительно показателей одного животного из контрольной группы. Коэффициенты корреляции Спирмена приведены на графике, $p < 0,05$.

Из данных, приведенных на рис. 10 видно, что обнаруживается прямая корреляционная связь между активностью кальпаинов в плазме крови и активностью m-кальпаина в синапсосамах, выделенных из ткани стриатумов соответствующих животных, причем для контрольной группы выявляется связь средней силы ($R=0,51$), а для экспериментальной группы – сильная связь ($R=0,87$). Корреляционный анализ не позволяет установить причинно-следственные связи для выявленной закономерности, однако само наличие такой связи свидетельствует в пользу церебрального происхождения кальпаинов плазмы крови и/или о наличии механизма сопряжения активации m-кальпаина в нервных окончаниях и в плазме крови.

Последствия хронического интраназального введения $MnCl_2$ оценивали в двух временных точках: в дебюте развития моторной симптоматики и при появлении выраженных нарушений, детектируемых при визуальном осмотре. Анализировали походку животных по отпечаткам лап в тесте «Следы» (рис. 11) и двигательную активность в тесте «Открытое поле» (рис. 12).

А.



Б.

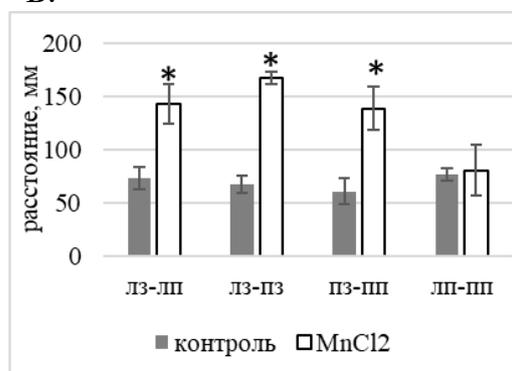
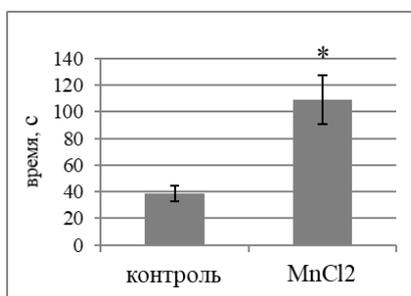


Рисунок 11 – Расстояния между соответствующими лапами в тесте «Следы» на 20 день эксперимента (А) и 60 день эксперимента (Б): лз-лп – расстояние между левой задней и левой передней лапой, пз-пп – расстояние между правой задней и правой передней лапой. Данные представлены как среднее \pm ошибка среднего ($n_1 = n_2 = 10$); критерий Стьюдента для независимых выборок; * $p < 0,05$ по сравнению с контрольной группой.

У животных, получающих хлорид марганца, к 20 дню введения наблюдалось увеличение ширины шага слева и расстояния между задними конечностями по сравнению с контролем. К 60-му дню эти изменения не только сохранялись, но развились и нарушения справа, а расстояние между постановкой передних лап осталось неизменным. Выявленные изменения свидетельствуют о выраженном нарушении походки у экспериментальных животных.

А.



Б.

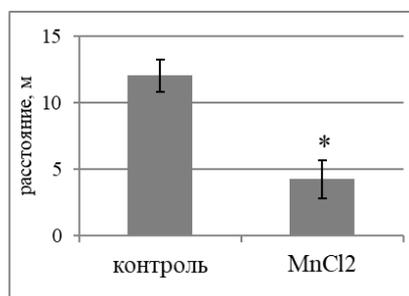
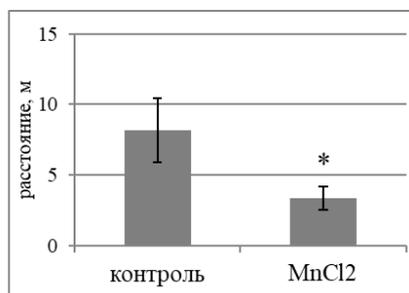
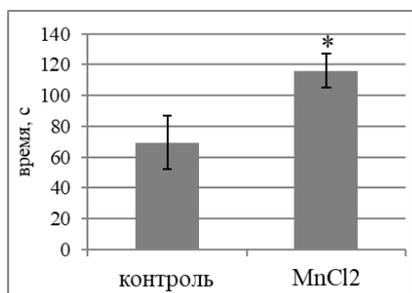


Рисунок 12 – Двигательная активность крыс при хроническом введении $MnCl_2$, оцененная в тесте «Открытое поле»: время нахождения в неподвижном состоянии на 30-й (А) и 90-й день эксперимента (В); пройденное расстояние на 30-й (Б) и 90-й день эксперимента (Г). Данные представлены как среднее \pm ошибка среднего ($n_1 = n_2 = 10$); критерий Стьюдента для независимых выборок; * $p < 0,05$ по сравнению с контролем.



На 30 день введения $MnCl_2$ у животных возросло время нахождения в неподвижном состоянии и уменьшилось пройденное ими расстояние по сравнению с контролем. К 90-му дню эти изменения сохранялись. Полученные результаты указывают на то, что уже через 30 дней после начала введения марганца и до конца эксперимента локомоторная активность у экспериментальных животных снижена.

С целью верификации накопления марганца в мозге, выявления признаков нейровоспаления и признаков дегенерации дофаминергических нейронов в гиппокампе и стриатуме животных на 30-й и 90-й день введения $MnCl_2$ определяли содержание марганца, уровни мРНК основных провоспалительных цитокинов (ИЛ-1 β , ФНО α), маркера активации микроглии – белка IBA-1, NF κ B, I κ B, содержание норадреналина, дофамина и его метаболитов. В этих же образцах определяли содержание мРНК кальпаинов, продукцию соответствующих белков и их активность. Полученные данные суммированы в табл.5.

Уже к 30-му дню после начала воздействия в клетках гиппокампа содержание марганца увеличилось в 1,7 раза, а в клетках стриатума – в 3,8 раз; к 90-му дню значимого изменения содержания марганца в анализируемых структурах мозга не наблюдалось.

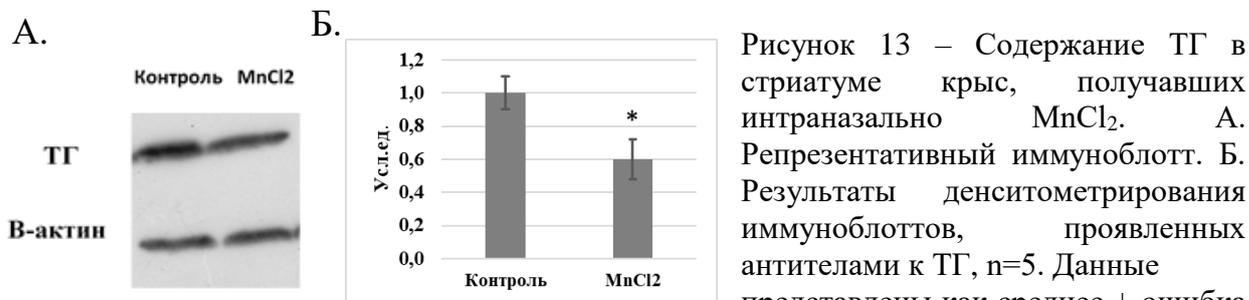
Таблица 5. Реакция клеток гиппокампа и стриатума на хроническое интраназальное введение $MnCl_2$ в дозе 1мг/животное в день в зависимости от времени после начала введения.

Структура Показатель \ время	Гиппокамп		Стриатум	
	30 д	90 д	30 д	90 д
Mn	1,7 ± 0,1	1,4 ± 0,2	3,9 ± 0,2	3,6 ± 0,7
мРНК ИЛ-1β	5,2 ± 0,3	<i>1,5 ± 0,1</i>	4,0 ± 0,2	5,8 ± 0,2
мРНК ФНОα	2,1 ± 0,1	2,0 ± 0,1	4,2 ± 0,1	<i>1,1 ± 0,4</i>
мРНК IBA-1	0,8 ± 0,2	<i>1,7 ± 0,3</i>	0,5 ± 0,1	2,9 ± 0,2
мРНК NFκB	2,8 ± 0,2	<i>1,2 ± 0,1</i>	2,4 ± 0,1	<i>1,8 ± 0,1</i>
мРНК IκB	1,2 ± 0,2	1,2 ± 0,4	0,5 ± 0,1	<i>0,2 ± 0,2</i>
ДА	3,1 ± 0,2	2,7 ± 0,3	0,5 ± 0,1	0,5 ± 0,1
ДОФУК	6,9 ± 0,2	2,5 ± 0,4	0,5 ± 0,1	0,5 ± 0,1
ГВК	2,0 ± 0,2	1,8 ± 0,3	0,7 ± 0,1	0,7 ± 0,1
НА	0,6 ± 0,1	<i>0,9 ± 0,1</i>	1,0 ± 0,1	0,7 ± 0,2
мРНК μ-кальпаин	0,3 ± 0,1	<i>1,6 ± 0,2</i>	0,5 ± 0,1	<i>0,9 ± 0,1</i>
мРНК m-кальпаин	0,4 ± 0,2	<i>1,5 ± 0,1</i>	0,5 ± 0,1	<i>2,1 ± 0,1</i>
μ-кальпаин	0,8 ± 0,2	<i>2,0 ± 0,1</i>	0,6 ± 0,1	0,8 ± 0,2
m-кальпаин	0,6 ± 0,1	<i>2,6 ± 0,1</i>	0,7 ± 0,2	4,0 ± 0,2
акт. μ-кальпаин	1,0 ± 0,1	<i>1,7 ± 0,3</i>	0,8 ± 0,2	0,9 ± 0,1
акт. m-кальпаин	0,8 ± 0,2	1,1 ± 0,3	0,9 ± 0,1	2,0 ± 0,2

*- жирным шрифтом выделены показатели значимо отличающиеся от контрольной группы (уровень значимости $p < 0,05$); курсивом выделены показатели, значимо отличающиеся от точки 30 дней.

В гиппокампе животных к 30-му дню эксперимента выявлено увеличение содержания мРНК ИЛ-1β, ФНОα, NFκB по сравнению с контрольными животными. Через 90 дней после начала введения $MnCl_2$ уровень мРНК ИЛ-1β снизился в 3,5 раза по сравнению с 30-м днем, а содержание мРНК NFκB уже не отличалось от контроля. Примечательно, что в клетках гиппокампа на 30-й день введения $MnCl_2$ не было обнаружено изменений содержания мРНК IBA-1, а к 90-му дню данный показатель уже в 1,7 раза превышал значения, характерные для контрольной группы. На 30-й день введения в клетках гиппокампа наблюдалось более выраженный, по сравнению с 90-м днем, подъем уровня дофамина и его метаболита ДОФУК, при этом содержание ГВК было в равной степени повышено на 30-й и 90-й день. На 30-й день введения $MnCl_2$ в клетках гиппокампа наблюдалось снижение продукции мРНК кальпаинов при неизменной относительно контроля активности обеих протеаз, однако к 90-му дню продукция мРНК и содержание μ- и m-кальпаина значимо возросло при увеличении активности исключительно μ-кальпаина. В клетках стриатума уровень мРНК ИЛ-1β в 4 и 6 раз превышал показатели контрольной группы на 30-й и 90-й день эксперимента соответственно; содержание мРНК ФНОα, напротив, снизилось с 4-х кратного превышения показателей контрольной группы на 30-й день, до нормы к 90-му дню. На 30-й день наблюдалось значимое относительно контроля снижение уровня мРНК IBA, а к 90-му дню уровень мРНК IBA-1 уже в 2,7 раза превышал показатели контрольной группы; уровень мРНК NFκB был повышен, а мРНК IκB – снижен на протяжении всего эксперимента. На 30-й и на 90-й день введения $MnCl_2$ выявлено сопоставимое по выраженности снижение содержания дофамина и его метаболитов. Несмотря на то, что на 30-

й день введения $MnCl_2$ содержание мРНК, белка и активность обоих кальпаинов были ниже или сопоставимы с показателями контрольной группы, к 90-у дню наблюдалось увеличение продукции мРНК, белка и активности т-кальпаина. Выявленные изменения косвенно свидетельствуют о гибели дофаминергических нейронов компактной части черной субстанции. Для подтверждения этого предположения в стриатуме определили содержание тирозингидроксилазы (ТГ). Данные приведены на рис. 13.



среднего, критерий Стьюдента для независимых выборок, *- $p < 0,05$ по сравнению с контролем.

Как и предполагалось, продукция ТГ значительно снизилась (в среднем на 40%). Этот факт является дополнительным подтверждением гибели дофаминергических нейронов.

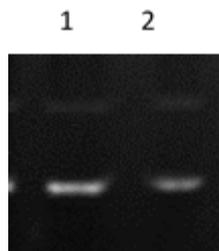
Таким образом, в ответ на хроническое интраназальное введение хлорида марганца крысам происходит его преимущественное накопление в стриатуме, что вызывает развитие нейровоспаления (сопровождаемого усилением продукции мРНК ИЛ-1 β , IBA-1, NF κ B), деструкцию дофаминергических нейронов с интенсификацией внеклеточного метаболизма дофамина, сопровождающееся увеличением продукции и активности т-кальпаина. В гиппокампе, где накопление марганца значительно менее выражено, наблюдаются признаки нейровоспаления (усиление продукции мРНК ИЛ-1 β , ФНО α , IBA-1, без изменений продукции мРНК NF κ B), усиление синтеза дофамина и повышение мРНК, белка и активности исключительно μ -кальпаина.

5. Последствия подавления активности кальпаинов при интраназальном введении $MnCl_2$ крысам

Существует около 30 различных ингибиторов кальпаина (Donkor I.O., 2015). Наиболее привлекательными для использования в терапевтических целях являются ингибиторы пептидной природы, аминокислотная последовательность которых соответствует ингибиторным доменам кальпастина (Fiorino F. et al., 2007). Исходя из полученных данных, с целью увеличения адаптационного потенциала клеток ЦНС целесообразно использовать ингибиторы, преимущественно подавляющие активность т-кальпаина. Таким ингибитором-кандидатом является пептид длиной в 27 аминокислотных остатков, соответствующий 184-210 аминокислоте в составе кальпастина человека (далее Cast (184-210)). Ингибирующее в отношении т-кальпаина действие Cast (184-210) было продемонстрировано в следующем

эксперименте. Десять самцов крыс Вистар были разделены на две группы: первая группа получала интраназально Cast (184-210) в дозе 50 мкг/кг, ежедневно в течение 5 дней; вторая группа – воду по такой же схеме. Через 10 дней животных декапитировали, извлекали мозг и анализировали активность кальпаинов в гомогенате клеток ЦНС. Данные представлены на рис. 14.

А.



Б.

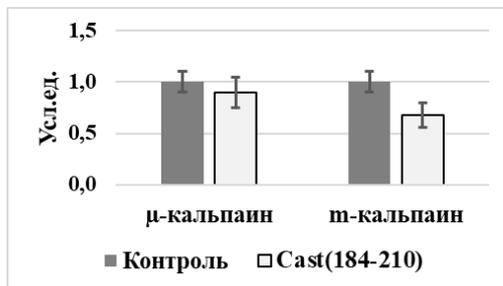


Рисунок 14 – Активность μ- и m-кальпаина в гомогенате клеток ЦНС крыс, получавших интраназально Cast (184-210) в дозе 50 мкг/кг в день, 5 дней. А. Репрезентативная зимограмма. Б. Результаты измерения площадей обесцвеченных зон,

выраженные в условных единицах, n=5. Данные представлены как среднее ± ошибка среднего, критерий Стьюдента для независимых выборок, *- p < 0,05 по сравнению с контролем.

Как видно из данных, приведенных на рис.14, применение ингибитора кальпаина Cast (184-210) вызывает снижение активности m-кальпаина и не влияет на активность μ-кальпаина. По результатам данного эксперимента для выявления последствий подавления активности кальпаинов при интраназальном введении MnCl₂ крысам был выбран Cast (184-210). Мы анализировали влияние введения ингибитора кальпаина на походку животных в тесте «Следы». Данные представлены на рис. 15.

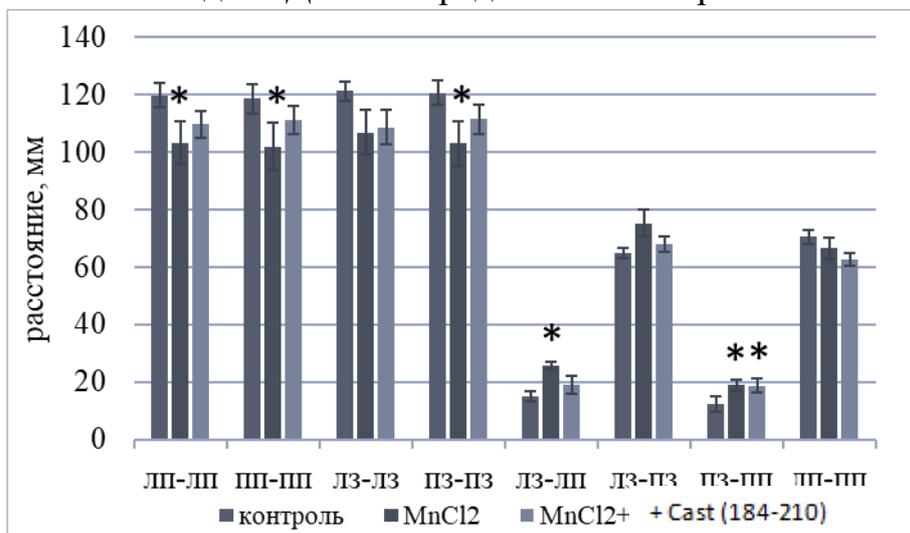


Рисунок 15 – Расстояния между соответствующими лапами в тесте «Следы» на 20 день эксперимента: лп-лп – расстояние между левой передней и левой передней лапой, пп-пп – расстояние между правой передней и правой передней лапой, лз-лз – расстояние между левой задней и левой

задней лапой и т.д. Данные представлены как среднее ± ошибка среднего (n1 = n2 = n3 = 10); дисперсионный анализ с последующим применением post hoc критерия Тьюки; * p < 0,05 по сравнению с контрольной группой.

Применение ингибитора кальпаина на фоне введения MnCl₂ привело к нормализации длины шага (например, расстояние между правой передней и правой передней лапой не отличалось от показателя контрольной группы); сохранялось лишь одно изменение – было увеличено расстояние между передней и задней лапами справа. Для анализа двигательной активности животных был применен тест «Открытое поле», данные приведены на рис. 16.

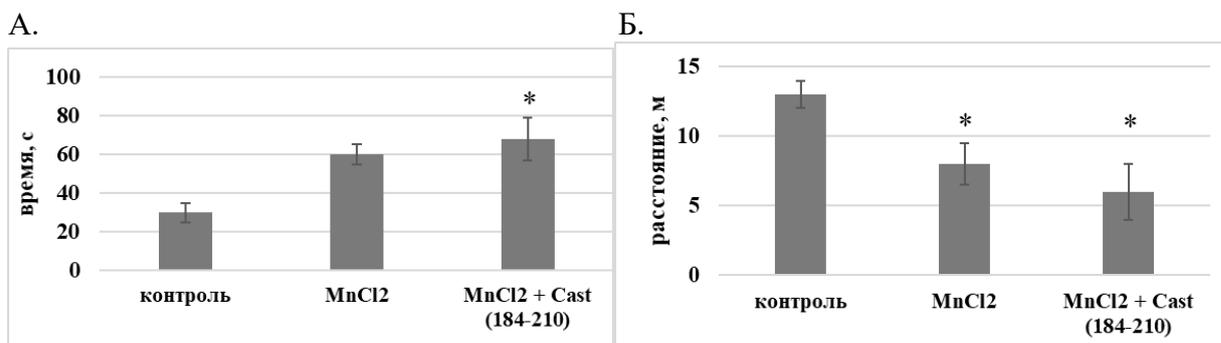


Рисунок 16 – Двигательная активность крыс, оцененная в тесте «Открытое поле» на 30-й день эксперимента: время нахождения в неподвижном состоянии (А) и пройденное расстояние (Б). Данные представлены как среднее \pm ошибка среднего ($n_1=n_2=n_3=10$); дисперсионный анализ с последующим применением post hoc критерия Тьюки; * $p < 0,05$ по сравнению с контролем.

На 30-й день введения препаратов у животных экспериментальных групп увеличилось время нахождения в неподвижном состоянии и уменьшилось пройденное ими расстояние по сравнению с контролем. Таким образом, введение ингибитора кальпаина Cast (184-210) приводит к частичной нормализации походки животных, но не восстанавливает двигательную активность крыс. Тем не менее, судя по частичному восстановлению походки, данный ингибитор оказывает нейропротективное действие, что может быть реализовано по одному из двух механизмов: ингибитор препятствует накоплению марганца в клетках ЦНС или же подавляет развитие нейродегенеративного процесса, запускающегося при накоплении марганца в клетках. С целью исключения первого варианта было определено содержание марганца в гиппокампе и стриатуме экспериментальных животных в сравнении с контрольными крысами и крысами, получающими только инъекции $MnCl_2$. Данные представлены на рис. 17.

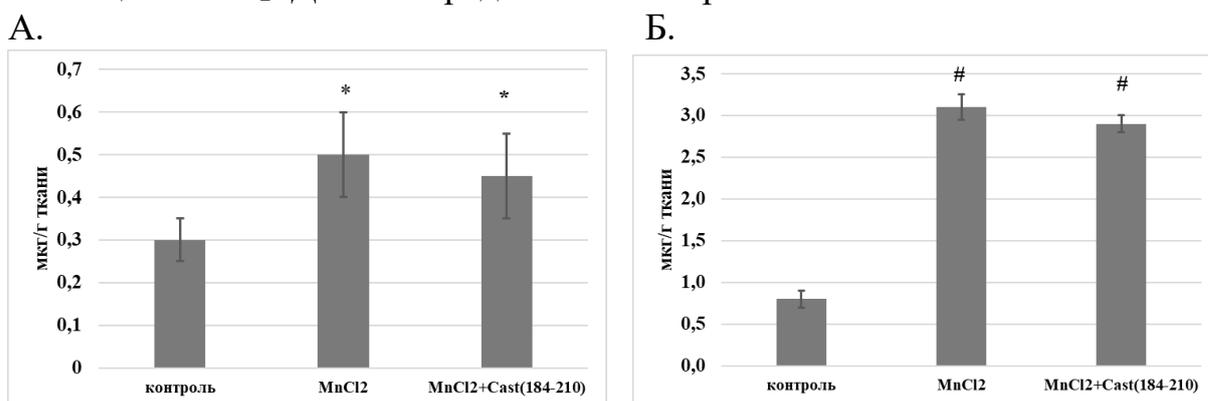


Рисунок 17 – Содержание марганца в гиппокампе (А) и в стриатуме (Б) крыс после хронического интраназального введения $MnCl_2$ и при подавлении активности кальпаинов с помощью Cast (184-210), ($n_1=n_2=n_3=10$); дисперсионный анализ с последующим применением post hoc критерия Тьюки; * $p < 0,05$ по сравнению с контролем, # $p < 0,001$ по сравнению с контролем.

Как видно из данных, приведенных на рис. 17, применение ингибитора кальпаина Cast (184-210) в выбранной дозе и по указанной выше схеме не приводит к снижению содержания марганца в анализируемых структурах

мозга. Следовательно, наблюдаемые эффекты могут объясняться снижением интенсивности нейродегенеративного процесса. Для выявления звеньев патогенеза, на которые повлияло введение ингибитора кальпаина в клетках гиппокампа и стриатума, было определено содержание мРНК основных провоспалительных цитокинов (ИЛ-1 β и ФНО α), маркера активации микроглии IBA-1, а также NF κ B и I κ B, содержание дофамина и его метаболитов. Полученные данные суммированы в табл. 6.

Таблица 6. Реакция клеток гиппокампа и стриатума на хроническое введение ингибитора кальпаина Cast (184-210) в условиях интоксикации MnCl₂.

Показатель	Гиппокамп		Стриатум	
	MnCl ₂	MnCl ₂ + Cast(184-210)	MnCl ₂	MnCl ₂ + Cast(184-210)
мРНК ИЛ-1 β	5,2 ± 0,3*	2,0 ± 0,2	4,0 ± 0,2	2,5 ± 0,2
мРНК ФНО α	2,1 ± 0,1	1,8 ± 0,1	4,2 ± 0,1	3,2 ± 0,2
мРНК IBA-1	0,8 ± 0,2	0,8 ± 0,1	0,5 ± 0,1	0,2 ± 0,1
мРНК NF κ B	2,8 ± 0,2	1,6 ± 0,1	2,4 ± 0,1	1,6 ± 0,2
мРНК I κ B	1,2 ± 0,2	1,2 ± 0,3	0,5 ± 0,1	0,9 ± 0,1
ДА	3,1 ± 0,2	1,1 ± 0,3	0,5 ± 0,1	0,8 ± 0,1
ДОФУК	6,9 ± 0,2	1,9 ± 0,1	0,5 ± 0,1	0,8 ± 0,1
ГВК	2,0 ± 0,2	1,1 ± 0,1	0,7 ± 0,1	0,8 ± 0,1

*- жирным шрифтом выделены показатели, значимо отличающиеся от контрольной группы (уровень значимости $p < 0,05$); курсивом выделены показатели, значимо отличающиеся от группы «MnCl₂», $p < 0,05$.

Введение ингибитора кальпаина Cast (184-210) привело к значимому снижению продукции мРНК ИЛ-1 β по сравнению с группой «MnCl₂», в клетках гиппокампа (в 2,6 раза) и стриатума (в 1,6 раза), а также снижению содержания мРНК ФНО α в стриатуме (в 1,7 раза); в обеих структурах значимо снизилось содержание мРНК NF κ B (в клетках гиппокампа в 1,8 раза, в клетках стриатума – в 1,5 раза). В клетках стриатума также наблюдалось снижение содержания мРНК IBA-1 (в 2,5 раза) и увеличение содержания мРНК I κ B (в 1,8 раза) по сравнению с группой «MnCl₂». Применение ингибитора кальпаина Cast (184-210) также вызвало снижение содержания дофамина и ГВК до нормы и значимому снижению ДОФУК в клетках гиппокампа; в клетках стриатума содержание дофамина и его метаболитов (ДОФУК и ГВК) на 60% превышало показатели группы «MnCl₂», но все еще оставалось значимо ниже контрольных значений. Как видно из данных, приведенных в табл. 7, в клетках стриатума наблюдалось пропорциональное снижение содержания дофамина и его метаболитов, что свидетельствуют о гибели дофаминергических нейронов. Если принять эту гипотезу, то, судя по приведенным выше результатам, ингибитор кальпаина должен предотвращать гибель дофаминергических нейронов при интоксикации солями марганца. Для проверки этого предположения в гомогенате клеток стриатума был определен уровень продукции ТГ. Данные приведены на рис. 18.

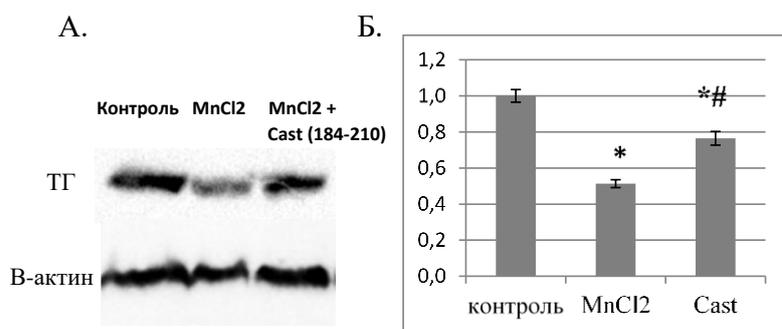


Рисунок 18 – Содержание ТГ в стриатуме крыс, получающих $MnCl_2$ или $MnCl_2+Cast$ (184-210). А. Типичный иммуноблотт. Б. Результаты денситометрирования иммуноблоттов, проявленных антителами к ТГ, $n=5$. Данные представлены как среднее \pm ошибка среднего,

дисперсионный анализ с последующим применением post hoc критерия Тьюки, * - $p < 0,05$ по сравнению с контролем, # - $p < 0,05$ по сравнению с группой $MnCl_2$.

Как видно из данных, приведенных на рис. 18, применение ингибитора кальпаина способствовало выживаемости дофаминергических нейронов, что отражается в значимом увеличении содержания ТГ по сравнению с группой « $MnCl_2$ ». Поскольку нигде не описано влияние Cast (184-210) на продукцию кальпаинов, было проанализировано содержание мРНК (рис. 19) и белка μ - и m -кальпаина (рис. 20) у животных, получающих Cast (184-210) + $MnCl_2$.

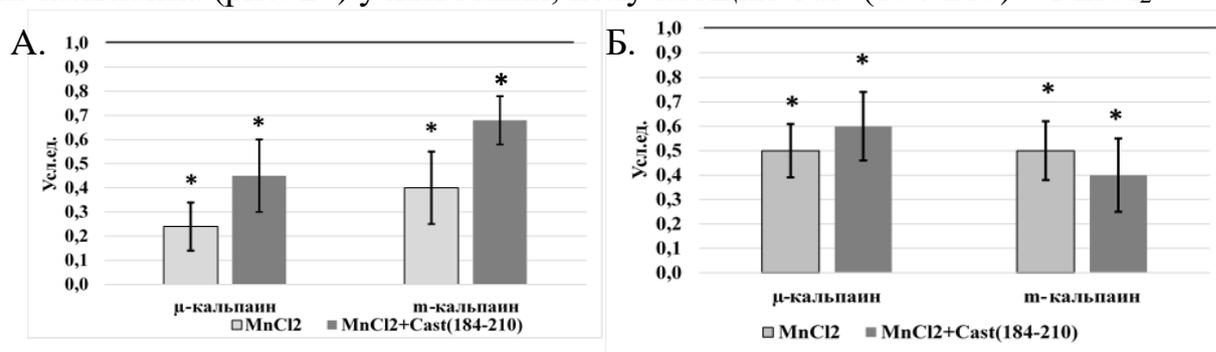


Рисунок 19 – Уровень мРНК μ - и m -кальпаина в гиппокампе (А) и стриатуме (Б) крыс через 30 дней интраназального введения $MnCl_2$ и при подавлении активности кальпаинов ингибитором Cast (184-210), $n=10$. Данные представлены как среднее \pm ошибка среднего, линией обозначен уровень контрольных значений, дисперсионный анализ с последующим применением post hoc критерия Тьюки, * - $p < 0,01$ по сравнению с контролем.

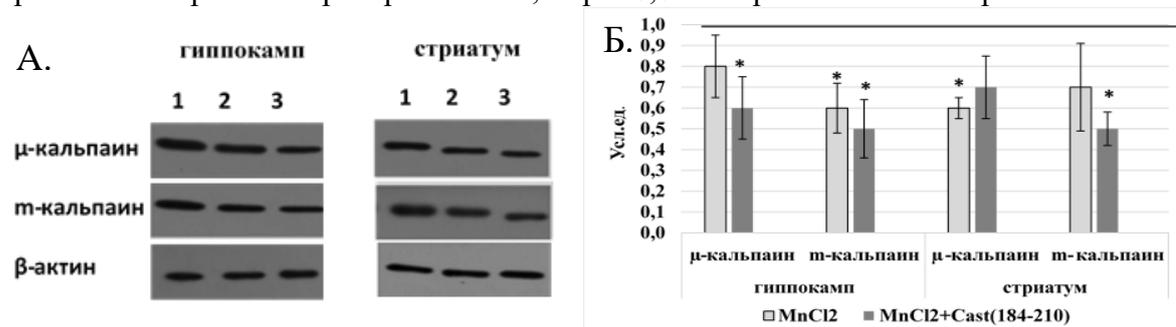


Рисунок 20 – Содержание μ - и m -кальпаина в гиппокампе и стриатуме крыс через 30 дней интраназального введения $MnCl_2$ и при подавлении активности кальпаинов ингибитором Cast (184-210), в каждой точке $n=5$. А. Репрезентативный иммуноблотт, где 1 – контроль, 2 – $MnCl_2$, 3 – $MnCl_2+Cast(184-210)$. Б. Результаты денситометрирования иммуноблоттов, проявленных антителами против μ - и m -кальпаина. Данные нормированы на содержание β -актина, показатель контрольной группы и представлены как среднее \pm ошибка среднего, линией обозначен уровень контрольных значений. Дисперсионный анализ с последующим применением post hoc критерия Тьюки, * - $p < 0,05$ по сравнению с контролем.

В клетках гиппокампа крыс, получавших 30 дней интраназально $MnCl_2$, наблюдалось снижение содержания m -кальпаина, а применение ингибитора Cast(184-210) приводило к значимому снижению продукции обеих протеаз относительно контрольной группы. В клетках стриатума введение $MnCl_2$, напротив, привело к снижению содержания μ -кальпаина, а применение ингибитора Cast(184-210) вызвало снижение содержания m -кальпаина, при этом уровень μ -кальпаина был не отличим от контроля. Таким образом, в обеих экспериментальных группах по исследуемым показателям наблюдались отличия только по сравнению с контрольной группой, между экспериментальными группами значимых различий выявлено не было, следовательно, применение ингибитора кальпаинов Cast(184-210) не приводит к изменению продукции μ - и m -кальпаина в гиппокампе и стриатуме крыс через 30 дней интраназального введения.

Далее нами была проанализирована активность кальпаинов в крови крыс через 30 дней после введения $MnCl_2$ и сочетанного введения $MnCl_2$ +Cast(184-210). Данные представлены на рис. 21.

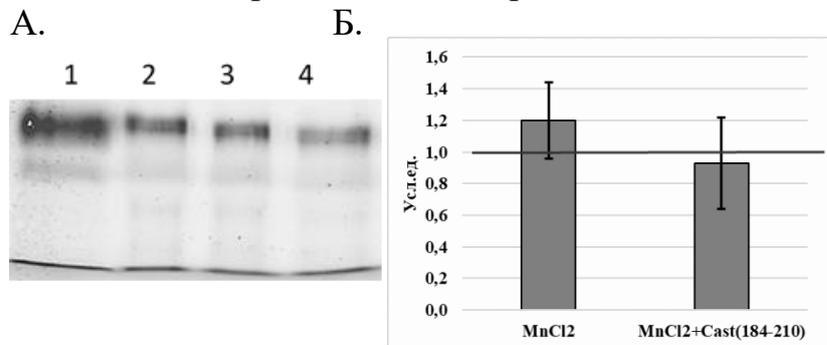


Рисунок 21 – Казеинограмма, отражающая активность кальпаинов в плазме крови крыс через 30 дней интраназального введения $MnCl_2$ и при подавлении активности кальпаинов ингибитором Cast (184-210), для каждой группы $n=3$. А.

Вид типичной казеинограммы, где исходный FITC-казеин (1); FITC-казеин после инкубации с плазмой крови животных контрольной группы (2), группы $MnCl_2$ (3), группы $MnCl_2$ + Cast (184-210) (4). Б. Результат денситометрирования зон, соответствующих фрагментам FITC-казеина, нормированный на показатель контрольной группы. Данные представлены как среднее \pm ошибка среднего, линией обозначен уровень контрольных значений; дисперсионный анализ.

Активность кальпаинов в плазме крови животных, подвергшихся воздействию $MnCl_2$, не была повышена; также нет оснований считать, что введение ингибитора кальпаина Cast(184-210) повлияло на данный показатель.

Таким образом, курсовое интраназальное введение Cast(184-210) в условиях интоксикации $MnCl_2$ частично нормализует походку животных, но не восстанавливает двигательную активность крыс; в клетках гиппокампа и стриатума снижает выраженность воспалительного процесса, что проявляется в уменьшении содержания мРНК основных провоспалительных цитокинов, NF κ B и ИВА-1; способствует выживаемости дофаминергических нейронов за счет нормализации содержания дофамина, его метаболитов, скорости внеклеточного метаболизма дофамина, в том числе вследствие увеличения содержания тирозингидроксилазы; не приводит к снижению содержания марганца в анализируемых структурах мозга и не влияет на содержание мРНК и белка μ -/ m -кальпаина.

6. Активность кальпаинов в плазме крови пациентов с заболеваниями экстрапирамидной системы

Для исследования были отобраны образцы крови пациентов с болезнью Паркинсона (БП) и с эссенциальным тремором (ЭТ), поскольку эти формы патологии ЦНС имеют разную этиологию, но сходны по симптоматике. В табл. 7 представлена клиничко-демографическая характеристика и биохимические показатели крови пациентов с БП, ЭТ и контрольной группы. Определение этих параметров было предусмотрено дизайном соответствующих клинических исследований.

Таблица 7. Клиничко-демографическая характеристика и биохимические показатели крови пациентов с БП, ЭТ и контрольной группы.

Параметр / группа	БП, n=12 Группа 1	ЭТ, n=12 Группа 2	контроль, n=12 Группа 3	p ₁₂ /p ₁₃ /p ₂₃ *
1	2	3	4	5
Возраст, годы	63 (60; 66)	62 (60; 65)	63 (58; 68)	0,985/0,875/0,863
Гендерный состав (м/ж)	6/6	6/6	6/6	1,0/1,0/1,0
Стадия БП по класс. Хен и Яра	2,25 (1,75; 2,50)	-	-	-
Оценка по шкале ФТМ, баллы	-	27 (22;38)	-	-
ИЛ-1β, пг/мл	6,0 ± 0,4	4,3 ± 0, 3	3,0 ± 0, 5	0,007/0,000/0,097
ИЛ-6, пг/мл	1,6 ± 0,3	1,1 ± 0, 2	0,8 ± 0, 2	0,304/0,099/0,915
ИЛ-10, пг/мл	4,5 ± 0,2	4,8 ± 0, 2	5,0 ± 0, 3	0,915/0,541/0,991
ФНО-α, пг/мл	2,4 ± 0,3	2,4 ± 0, 1	2,1 ± 0, 3	0,989/0,956/0,986
Пируват, мг/дл	0,96 ± 0,05	0, 62 ± 0, 01	0, 60 ± 0, 01	0,000/0,000/0,725
Лактат, мг/дл	14,0 ± 0,4	11,6 ± 0, 3	12,2 ± 0, 3	0,000/0,005/0,458
ЛДГ, Ед/л	190,2 ± 7,0	187,3 ± 5, 9	179,4 ± 3, 6	0,998/0,541/0,785
Активность кальпаинов плазмы крови, Ед/мл	4,6 ± 0,5	3,8 ± 0,2	0,9 ± 0,1	0,570/0,001/0,025

*р – уровень значимости при сравнении соответствующих групп, номера сравниваемых групп указаны как подстрочные индексы.

Как видно из данных, приведенных в табл.7, среди анализируемых биохимических показателей крови диагностическим потенциалом для дифференциальной диагностики ЭТ и БП обладает уровень ИЛ-1β в плазме крови, а также содержание лактата и пирувата в плазме крови (размер эффекта для всех установленных различий составил d=0,623 и выше). Показатель активности кальпаинов плазмы крови не может быть использован для дифференциальной диагностики БП и ЭТ (уровень значимости при сопоставлении группы БП и ЭТ составил p=0,570). Однако активность кальпаинов плазмы крови в обеих экспериментальных группах значимо выше контрольных значений (p=0,001 и p=0,025 по сравнению с контрольной группой для группы БП и ЭТ соответственно). В связи с выявленным фактом была проанализирована связь между активностью кальпаинов плазмы крови и стадией/тяжестью заболевания. Пациенты группы БП были разделены на две подгруппы в зависимости от стадии заболевания, в соответствии с классификацией Хен и Яра. В первую подгруппу вошли пациенты со стадией 1,0–2,0 (n=6) (подгруппа БП1), во вторую – со стадией 2,5–3,0 (n=6) (подгруппа БП2). Пациенты с ЭТ были разделены на две подгруппы по

степени выраженности тремора, оцененной по шкале FTM – с легким или умеренным тремором (амплитуда <2 см) (подгруппа ЭТ1) и с выраженным тремором (амплитуда ≥ 2 см) (подгруппа ЭТ2). Данные об активности кальпаинов в выделенных подгруппах пациентов представлены на рис. 22.

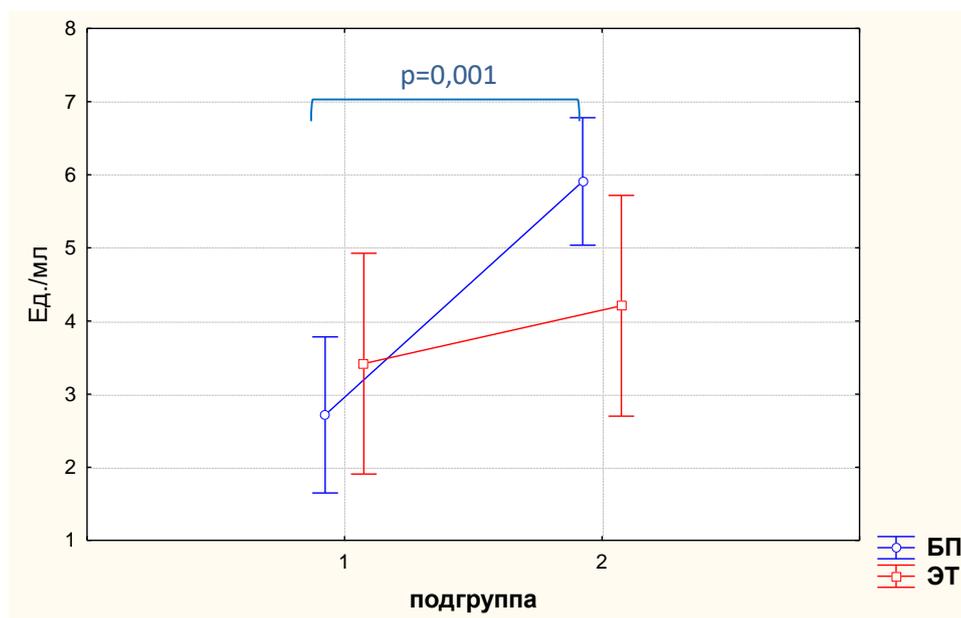


Рисунок 22 – Диаграмма, отражающая зависимость активности кальпаинов плазмы крови пациентов с БП и ЭТ в зависимости от стадии/тяжести заболевания (пояснения в тексте). Данные представлены как среднее \pm доверительный интервал, двухфакторный дисперсионный анализ (фактор 1 – нозология, фактор 2 – стадия/тяжесть) с последующим применением post hoc критерия Тьюки; при уровне значимости 5% размер наблюдаемого эффекта составил $d=0,541$, мощность 90%.

Значимых различий между уровнями активности кальпаинов в плазме крови пациентов групп БП1 и ЭТ1 выявлено не было ($p=0,853$). Следовательно, на ранних стадиях развития БП, как и при ЭТ с легким или умеренным тремором, активность кальпаинов в плазме крови значимо выше контрольных значений, но не различается между соответствующими группами. Однако на развернутых стадиях БП (подгруппа БП2) активность кальпаинов плазмы крови значимо превышает показатели группы БП1 ($p=0,001$), при этом данный показатель между группами БП2 и ЭТ2 не различается ($p=0,206$). Следовательно, увеличение активности кальпаинов в плазме крови при прогрессировании БП указывает на вовлечение кальпаинов в развитие заболевания. Для выявления вероятного звена патогенеза БП, в который могут быть вовлечены кальпаины, была сопоставлена активность кальпаинов с содержанием в крови лактата, пирувата, ИЛ-1 β . Между содержанием в крови пирувата и активностью кальпаинов корреляционной зависимости выявлено не было. Была обнаружена прямая корреляционная связь средней силы между активностью кальпаинов плазмы крови и концентрацией лактата в крови пациентов с БП ($R_{\text{tau}}=0,56$, $p=0,006$) и сильная прямая корреляционная связь между активностью кальпаинов плазмы крови и концентрацией ИЛ-1 β в крови пациентов с БП ($R_{\text{tau}}=0,78$, $p=0,001$). Проведение корреляционного анализа

между аналогичными показателями в крови пациентов с ЭТ не выявило значимых зависимостей. Ранее нами было показано, что содержание лактата и ИЛ-1 β в крови пациентов со стадией 3,0-4,0 (в соответствии с классификацией Хен и Яра) значимо выше по сравнению с соответствующими показателями у пациентов, находящихся на 1,0-2,0 стадии (Муружева З.М. и др., 2017; Karpenko M.N. et al., 2018). Следовательно, в совокупности эти показатели обладают прогностической силой. Для дифференциации вклада различных изоформ кальпаинов в общую активность кальпаинов плазмы крови пациентов с различной стадией БП была определена активность кальпаинов методом зимографии в геле. Данные приведены на рис. 23.

А.

Б.

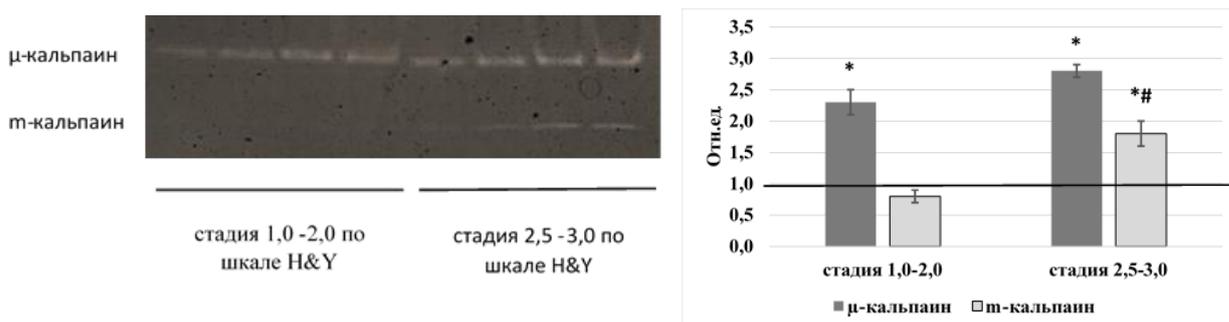


Рисунок 23 – Активность μ - и m -кальпаина в плазме крови пациентов, находящихся на различных стадиях БП. А. Репрезентативная зимограмма (контрольные образцы не приведены). Б. Результаты измерения площадей обесцвеченных зон, нормированные на контроль, $n=6$. Данные представлены как среднее \pm ошибка среднего, линией обозначен уровень контрольных значений. Дисперсионный анализ с последующим применением *post hoc* критерия Тьюки, * - $p<0,05$ по сравнению с контролем, # - $p<0,05$ по сравнению с группой «Стадия 1,0-2,0».

На ранних стадиях болезни в крови пациентов с БП повышение активности кальпаинов относительно контрольной группы определяется гиперактивацией или повышением содержания с последующей активацией исключительно μ -кальпаина; на развернутых стадиях заболевания дополнительное увеличение активности кальпаинов в плазме крови определяется уже увеличением активности или увеличением содержания и активности m -кальпаина. Эти данные указывают на дифференциальный вклад μ - и m -кальпаина в патогенез БП: повышение активности кальпаинов крови, вероятнее всего, является неспецифическим для БП и отражает универсальное для нейродегенеративных заболеваний звено патогенеза, увеличение активности m -кальпаина, наблюдаемое при БП – более специфический показатель, связанный с переходом с начальных на развернутые стадии заболевания. Однако более детальное изучение этого вопроса в рамках клинических исследований невозможно; все предположения требуют проверки в экспериментах в системе *in vitro* и на лабораторных животных.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В реализации адаптивных реакций мозга принимают участие различные нейрогуморальные факторы. Среди них особая роль принадлежит нейромедиаторным системам, цитокинам и протеолитическим ферментам (Kryzhanovskii G.N., 2002, 2006; Самойлов О.М., 1999; Gulyaeva N. V. et al., 2003; Gomazkov O.A., 2004 и мн. др.). Выявленное в данном исследовании включение кальпаиновой системы в механизмы регуляции ответа клеток ЦНС на действие повреждающих факторов различной природы дополняет представление о физиологических функциях кальпаинов и открывает новые мишени для фармакологического воздействия с целью повышения адаптационного потенциала клеток ЦНС.

Проведенные исследования показывают, что при действии на организм БАВ различной природы изменяется локализация, а также продукция мРНК/белка и активность внутриклеточных цистеиновых протеаз семейства кальпаинов, причем временная динамика и выраженность изменений данных показателей специфичны для каждого вида воздействия и для каждого отдела мозга. В ходе выполнения данного исследования было обнаружено, что после однократного интраперитонеального введения крысам субсептической дозы ЛПС в клетках стриатума наблюдается усиление продукции мРНК ИЛ-1 β , ФНО α и мРНК маркера активации микроглии IBA-1, причем со временем содержание мРНК IBA-1 увеличивается, что свидетельствует о все нарастающей активации микроглиальных клеток. Данные изменения сопровождаются повышением содержания дофамина, вызванным снижением скорости его внеклеточного метаболизма, что может быть следствием развития компенсаторных процессов, в том числе опосредованных действием кальпаинов. Действительно, несмотря на увеличение содержания мРНК обеих протеаз, активность m-кальпаина увеличена не была, а у μ -кальпаина была даже снижена (табл.4). Частично следствием такого снижения могло быть наблюдаемое на модели синапсом компенсаторное повышение уровня внеклеточного дофамина (см. п.2). Другая причина повышения содержания дофамина в стриатуме – выявленное повышение содержания норадреналина (табл.4), который, высвобождаясь в синаптическую щель, связывается со своими рецепторами на нейронах и клетках микроглии, и замедляет скорость развития нейровоспаления (Qian L. et al., 2011), тем самым способствуя «выживаемости» ДА-нейронов и повышению уровня дофамина. Однако обращает на себя внимание тот факт, что со временем в клетках стриатума усиливается продукция мРНК m-кальпаина, а продукция мРНК кальпастина, наоборот, снижается, следовательно, весьма велика вероятность повышения активности данной изоформы кальпаинов в отсроченном периоде. Действительно, через 180 дней после введения ЛПС в стриатуме более чем в четыре раза увеличивается содержание мРНК обеих протеаз, но продукция и активность повышается только у m-кальпаина (табл.4), причем именно в нервных окончаниях (рис. 10). Гиперактивация m-кальпаина приводит к интенсификации нейровоспаления, а именно: m-кальпаин, расщепляя белок-

ингибитор транскрипционного фактора NF- κ B, вызывает транслокацию NF- κ B в ядро, тем самым способствуя продукции провоспалительных медиаторов (Latour A. et al., 2019). Возможен еще один путь включения μ -кальпаина в реализацию ответа клеток ЦНС на введение ЛПС – через активацию каспаз-опосредованных проапоптотических путей (Liu S.H. et al., 2010). Так или иначе, процесс хронитизируется и распространяется, у животных начинают проявляться двигательные нарушения.

При хроническом интраназальном введении $MnCl_2$ крысам в стриатуме процесс перехода физиологической реакции клеток ЦНС в патологическую протекает по похожей схеме, однако в этом случае длительность латентного периода значительно короче. Попадая в организм, марганец преимущественно накапливается в клетках стриопаллидарной системы (табл.5), причем, согласно данным (Morello M. et al., 2008), в большей степени секвестрируется астроцитами, чем нейронами. Накопление марганца в астроцитах приводит к их активации, повышению продукции и секреции ими провоспалительных цитокинов (табл.5), а также вызывает непосредственную активацию μ -кальпаина (рис.1), который, в свою очередь, расщепляет PHLPP1 фосфатазу (leucine-rich repeat Protein Phosphatase 1) и снимает блок с Akt- и ERK1/2-зависимых сигнальных путей, определяющих выживание астроцитов (Baudry M. and Bi X., 2016; Jackson T.C. et al., 2013). Таким образом, прямая активация астроцитарного μ -кальпаина марганцем стимулирует их выживание, обеспечивая поддержание воспалительной реакции в мозге, выполняющей изначально защитную функцию. Следует обратить внимание, что при введении ЛПС таких изменений не происходит, активность μ -кальпаина не только не увеличивается, но даже снижается. Со временем продукция цитокинов и других медиаторов воспаления усиливается (табл.5), в том числе за счет увеличения продукции транскрипционного фактора NF κ B (и снижения I κ B), под контролем которого находится экспрессия многих генов, вовлечённых в регуляцию воспалительного ответа (Lee M., 2013). Вероятнее всего, на начальном этапе интоксикации марганцем провоспалительные агенты продуцируются клетками астроглии, а позже (в период с 30-го по 90-й день введения $MnCl_2$) определяющую роль играет активация микроглиальных клеток, которые вносят дополнительный вклад в продукцию провоспалительных агентов. В пользу этого предположения свидетельствует тот факт, что на 30-й день воздействия уровень мРНК IBA1 (маркер активированной микроглии) в стриатуме экспериментальных животных ниже показателей контрольной группы, а к 90-му дню воздействия уже в несколько раз превышает норму (табл.5). При введении ЛПС активация микроглии происходит почти сразу (содержание мРНК IBA-1 увеличивается, начиная с первых суток после введения токсина) и продолжает усиливаться со временем (к 180-му дню уже в 12 раз превышает показатели контрольной группы) (табл.4). В совокупности эти данные свидетельствуют о развитии адаптивных/компенсаторных процессов в первый месяц введения $MnCl_2$, однако в условиях хронического токсического воздействия, вероятно,

происходит истощение физиологических резервов и нарушение взаимодействия метаболических механизмов адаптации, что приводит к неконтролируемому развитию воспалительного процесса (в случае введения ЛПС процесс развивается значительно быстрее). Со временем марганец начинает накапливаться не только астроцитами, но и нейронами, что приводит к активации m-кальпаина в нервных окончаниях (табл.5). С одной стороны, активированный m-кальпаин может расщеплять белок p35 с образованием p25; в результате образуется комплекс Cdk5-p25, который инактивирует белок MEF (myocyte enhancer factor), важнейший для выживаемости дофаминергических нейронов фактор (Zhang Q. et al., 2016), и усиливает продукцию белка p53, способствуя активации каспазы-3 (Alvira D. et al., 2008). Следовательно, активация m-кальпаина в нервных окончаниях способствует гибели преимущественно ДА-нейронов, которые особо чувствительны к повышению содержания в них марганца (Nelson M. et al., 2018). С другой стороны, активированный m-кальпаин в условиях избытка марганца в среде высвобождается нервными окончаниями в интерстициальную жидкость (рис. 8), где он сохраняет свою протеолитическую активность и может расщеплять ряд внеклеточных и/или трансмембранных белков, модулируя их функции. Например, с высокой вероятностью, субстратом m-кальпаина может быть мембранная форма катехол-О-метилтрансферазы (КОМТ). После расщепления кальпаином, судя по положению предсказанного сайта расщепления, КОМТ утратит свою ферментативную активность, скорость катаболизма дофамина снизится, его содержание в синаптической щели увеличится. В условиях марганцевой интоксикации, когда ДА-нейроны черной субстанции погибают, что выражается общим снижением содержания дофамина, его метаболитов и ТГ в стриатуме (табл.5 и рис. 13), внеклеточный m-кальпаин может способствовать частичной компенсации утрачиваемых функций за счет предотвращения метилирования дофамина. Таким образом, в клетках стриатума, при действии на организм ЛПС или $MnCl_2$, переходное состояние от нормы к патологии характеризуется фактор-специфичным вовлечением различных изоформ кальпаинов; при развитии нейродегенеративного процесса, вне зависимости от типа повреждающего действия, происходит гиперактивация исключительно m-кальпаина.

В ответ на введение крысам субсептической дозы ЛПС в клетках гиппокампа наблюдается усиление продукции основных провоспалительных цитокинов без признаков активации микроглии, снижение содержания дофамина и увеличение содержания норадреналина, сопровождаемое усилением продукции мРНК и активности μ - и m-кальпаина (табл.3), которые, расщепляя свои субстраты, оказывают на клетки гиппокампа модулирующее действие: инициируют синаптические перестройки, подавляют активность NMDA рецепторов глутамата, предотвращая развитие эксайтотоксичности (Guttmann R.P., 2002). Действительно, подавление активности кальпаинов, в особенности μ -кальпаина, приводит к предотвращению индукции LTP, нарушению гиппокамп-зависимой пространственной памяти, обусловленное

неспособностью нейронов в отсутствие кальпаинов к функциональной и морфологической реорганизации синаптических контактов (Amini M. et al., 2013). В отдаленном периоде (180 дней после введения ЛПС) наблюдается усиление продукции мРНК, белка и активности исключительно μ -кальпаина (табл.3), что приводит к активации сигнальных путей, определяющих выживание клетки.

В гиппокампе крыс, хронически получающих $MnCl_2$, детектируются несколько другие изменения. Накопление марганца в клетках гиппокампа значительно менее выражено по сравнению с клетками стриатума (табл.5), однако, мы полагаем, что содержание марганца 0,5 мкг/г ткани достаточно для активации μ -кальпаина со всеми описанными выше последствиями. Действительно, через 30 дней введения токсина, также как и в клетках стриатума, видим в гиппокампе признаки развития воспалительной реакции (табл.5), при этом продукция мРНК μ - и m -кальпаина снижается, а на уровне белка детектируется компенсаторное снижение содержания m -кальпаина при неизменном относительно контроля уровне μ -кальпаина (табл.5) (в отличие от клеток стриатума, где на уровне контроля поддерживается содержание m -кальпаина, а уровень μ -кальпаина снижается, а также в отличие от последствий введения ЛПС, когда наблюдается увеличение продукции и активности обоих кальпаинов). Любопытно, что в клетках гиппокампа наблюдается повышение содержания дофамина и его метаболитов (а не снижение, как в случае введения ЛПС), что свидетельствует об интенсификации его синтеза, например, клетками голубого пятна, имеющими окончания в гиппокампе, из-за нарушения функционирования β -дофамингидроксилазы (табл.5). Поскольку данные изменения частично купировались введением ингибитора кальпаина Cast(184-210) (табл.6), вероятно, они были вызваны именно усилением активности кальпаинов. К 90-му дню введения $MnCl_2$ в клетках гиппокампа, в отличие от клеток стриатума, выраженность всех выявленных ранее изменений снижалась (табл.5), кроме продукции мРНК ФНО α , которая со временем в клетках гиппокампа не изменилась. Вероятно, это связано с репаративной функцией данного цитокина (Dolga A.M. et al., 2008).

Применение ингибитора кальпаина вызывало снижение содержания дофамина в клетках гиппокампа до нормы (табл.6). Принимая во внимание прокогнитивное действие ингибитора кальпаина A-705253, реализующееся за счет повышения экспрессии транспортера ABCA1 (Medeiros R. Et al., 2012), через который m -кальпаин может высвобождаться из клетки (рис. 7), протективная роль ингибиторов кальпаина может быть связана с перераспределением под его влиянием пула внутри-/внеклеточного m -кальпаина. Действительно, в клетках гиппокампа активация внесинаптических NMDA рецепторов приводит к активации внутриклеточного m -кальпаина, расщеплению им STEP-фосфатазы (striatal-enriched protein tyrosine phosphatase) и, как следствие, к смерти нервной клетки (Wang Y. et al., 2013), а внеклеточный m -кальпаин лишается такой активности.

Обращает на себя внимание еще и тот факт, что при более длительном воздействии $MnCl_2$ в клетках гиппокампа увеличивается продукция обоих кальпаинов, а активность – только у μ -кальпаина. Вероятно, благодаря гиперактивации μ -кальпаина, дегенеративный процесс в гиппокампе развивается с меньшей интенсивностью.

Нейропротективное действие различных ингибиторов кальпаина было продемонстрировано на множестве клеточных и животных моделей нейродегенеративных заболеваний (Ennes-Vidal V. et al., 2016; Knaryan V.H., 2014; Ray S.K. and Banik N.L. 2003 и мн. др.). На основании полученных данных, при разработке схем протективной терапии, направленной на подавление активности кальпаинов, следует обратить особое внимание на ингибиторы, обладающие преимущественным действием на m -кальпаин, к которым можно отнести Cast(184-210) (рис.14). При определении активности кальпаинов в плазме крови пациентов с БП и ЭТ оказалось, что развитие БП и ЭТ характеризуется повышением активности кальпаинов в плазме крови (табл.7). При БП повышение активности кальпаинов в плазме крови возрастает при переходе от ранних к развернутым стадиям заболевания: на ранних стадиях развития БП повышение активности кальпаинов плазмы крови определяется вкладом μ -кальпаина, а на развернутых стадиях заболевания – m -кальпаином (рис.22 и рис.23). Поскольку была обнаружена положительная корреляционная зависимость между активностью кальпаинов в плазме крови и содержанием лактата, а также ИЛ-1 β , весьма вероятно, что увеличение активности кальпаинов в плазме крови вызвано развитием метаболических нарушений, наблюдающихся при БП (в патогенезе нейродегенеративного процесса при БП основное значение имеет нарушение протеолитической деградации белков, в частности, α -синуклеина; развитие нейровоспаления; нарушение работы митохондрий) (Han D. et al., 2020; Tang B.L., 2020). Мы полагаем, что в области повреждения активированные микроглиальные клетки секретируют провоспалительные факторы (например, ИЛ-1 β) и, вероятно, μ -/ m -кальпаины, которые способны инициировать нейродегенеративный процесс. ИЛ-1 β , а возможно и кальпаины, проходят сквозь нарушенный ГЭБ (Gutierrez E.G. et al., 1994), попадают в кровоток, где подвергаются деградации. Однако периферический пул цитокинов/кальпаинов постоянно пополняется, обеспечивая повышение их содержания в крови. В пользу данного предположения свидетельствует тот факт, что в плазме крови животных с ЛПС-индуцированной нейродегенерацией (животная модель БП (Burguillos M.A. et al., 2011) также было обнаружено повышение активности кальпаинов (рис. 9), которое было пропорционально увеличению активности m -кальпаина в стриатарных нервных окончаниях (рис. 10).

Полученные данные указывают на дифференциальный вклад внутриклеточных μ - и m -кальпаина в регуляцию повреждающих и защитных процессов, развивающихся в ЦНС в ответ на действие БАВ различной природы. Высвобождение кальпаинов во внеклеточную среду приводит к

изменению спектра доступных им субстратов и, как следствие, вклад обеих форм кальпаинов в регуляцию адаптивных реакций клеток ЦНС, опосредуемый их способностью к ограниченному протеолизу, изменяется, в некоторых случаях даже на противоположный.

ВЫВОДЫ

1. Кальпаины вовлечены в регуляцию ответа клеток ЦНС на действие повреждающих факторов бактериальной и химической природы.
2. Хлорид марганца в концентрации 2 мМ и выше обладает прямым активирующим действием на μ -кальпаин; хлорид марганца (2 мМ), МФТП (0,5 мМ), 3-НПК (1 мМ) вызывают активацию m -кальпаина в нервных окончаниях (синапсосомах), ЛПС (5 мкг/мл) такого эффекта не оказывает. Подавление активности синапсосомального m -кальпаина вызывает увеличение уровня внеклеточного дофамина.
3. m -кальпаин высвобождается из нервных окончаний (синапсосом) в активной или в способной к активации форме, данный процесс является кальций-зависимым; хлорид марганца (2 мМ), МФТП (0,5 мМ) способствуют, а глибенкламид (100 мкМ) подавляет высвобождение m -кальпаина из синапсосом. Среди внеклеточных и трансмембранных белков есть потенциальные субстраты кальпаинов (матриксная металлопротеаза 2, матриксная металлопротеаза 9, внеклеточный домен D(1A) рецептора дофамина, КОМТ, MAO-B).
4. В ответ на однократное внутрибрюшинное введение крысам субсептической дозы ЛПС клетки гиппокампа и стриатума реагируют по-разному: для клеток гиппокампа характерно отсутствие «перестроек» метаболизма дофамина и повышение продукции мРНК ФНО α , сопряженное с повышением содержания и активности μ -кальпаина; в клетках стриатума наблюдаются признаки активации микроглиацитов, повышение продукции мРНК ФНО α , признаки деструкции нейронов черной субстанции, повышение содержания и активности m -кальпаина в нервных окончаниях.
5. В ответ на хроническое интраназальное введение хлорида марганца крысам происходит его преимущественное накопление в стриатуме, что вызывает развитие нейровоспаления (сопровождаемого усилением продукции мРНК ИЛ-1 β , IBA-1, NF κ B), деструкцию дофаминергических нейронов с интенсификацией внеклеточного метаболизма дофамина, сопровождающееся увеличением продукции и активности m -кальпаина. В гиппокампе, где накопление марганца значительно менее выражено, наблюдаются признаки нейровоспаления (усиление продукции мРНК ИЛ-1 β , ФНО α , IBA-1, без изменений продукции мРНК NF κ B), усиление синтеза дофамина и повышение мРНК, белка и активности исключительно μ -кальпаина.
6. На фоне интоксикации MnCl $_2$ курсовое интраназальное введение Cast (184-210) в дозе 50 мкг/кг в день нормализует походку животных, но не восстанавливает двигательную активность крыс. Защитный эффект Cast (184-210) реализуется через:

- а) снижение выраженности воспалительного процесса в клетках гиппокампа и стриатума, что проявляется в уменьшении содержания мРНК основных провоспалительных цитокинов, NFκB и IBA-1;
- б) нормализацию содержания дофамина и его метаболитов за счет снижения скорости внеклеточного метаболизма дофамина и увеличения содержания тирозингидроксилазы.
7. Развитие БП и ЭТ характеризуется повышением активности кальпаинов в плазме крови; при БП активность кальпаинов в плазме крови возрастает при переходе от ранних к развернутым стадиям заболевания: на ранних стадиях БП повышение активности кальпаинов плазмы крови определяется вкладом μ -кальпаина, а на развернутых - m -кальпаина.

ПУБЛИКАЦИИ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Muruzheva, Z.M. Calpain activity in plasma of patients with essential tremor and Parkinson's disease: a pilot study / Z.M. Muruzheva, D.S. Traktirov, A.S. Zubov, N.S. Pestereva, M.S. Tikhomirova, **M.N. Karpenko** // Neurological Research. – 2021. – V. 43. – № 4. – P. 314-320. <https://doi.org/10.1080/01616412.2020.1854004>
2. Муружева, З.М. Особенности энергетического обмена у пациентов с эссенциальным тремором и болезнью Паркинсона / З.М. Муружева, **М.Н. Карпенко**, И.С. Обламская, Д.В. Крицкая, В.М. Клименко // Неврологический журнал. – 2017. – №6. – С. 314-318. <https://doi.org/10.18821/1560-9545-2017-22-6-313-317>
3. **Karpenko, M.N.** Interleukin-1 β , interleukin-1 receptor antagonist, interleukin-6, interleukin-10, and tumor necrosis factor- α levels in CSF and serum in relation to the clinical diversity of Parkinson's disease / **M.N. Karpenko**, A.A. Vasilishina, E.A. Gromova, Z.M. Muruzheva, A. Bernadotte // Cellular Immunology. – 2018. – V. 327. – P. 77-82. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2018.02.011>
4. Muruzheva, Z.M. The relationship between serum interleukin-1 β , interleukin-6, interleukin-8, interleukin-10, tumor necrosis factor- α levels and clinical features in essential tremor / Z.M. Muruzheva, I.S. Ivleva, D.S. Traktirov, A.S. Zubov, **M.N. Karpenko** // The International journal of neuroscience. – 2021. – Published online: 02 Jan 2021. – P. 1-10. <https://doi.org/10.1080/00207454.2020.1865952>
5. **Карпенко, М.Н.** Роль кальпаинов в регуляции синаптической передачи / **М.Н. Карпенко**, М.С. Тихомирова // Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова. – 2014. – Т. 100. – № 4. – С. 385-393. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25272450>
6. **Карпенко, М.Н.** Связь между степенью активации кальпаинов и уровнем внесинапсосомального дофамина / **М.Н. Карпенко**, Н.С. Пестерева, И.С. Обламская, В.А. Щукина // Нейрокомпьютеры: разработка, применение. – 2016. – № 2. – С.56-59.
7. Pestereva, N. m -Calpain is released from striatal synaptosomes / N. Pestereva, I. Ivleva, A. Zubov, M. Tikhomirova, **M. Karpenko** // The International journal of neuroscience.

- 2021. – Published online: Mar 10 2021. – P. 1-9. <https://doi.org/10.1080/00207454.2021.1901697>
8. Zubov, A. Glibenclamide as a neuroprotective antimentia drug / A. Zubov, Z. Muruzheva, M. Tikhomirova, **M. Karpenko** // Archives of Physiology and Biochemistry. – 2020. – Published online: Jul 11 2020. – P. 1-4. <https://doi.org/10.1080/13813455.2020.1789170>.
 9. **Карпенко, М.Н.** Инфекционная гипотеза болезни Паркинсона / **М.Н. Карпенко**, З.М. Муружева, Н.С. Пестерева, И.В. Екимова // Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова. – 2017. – Т.103. №8. – С.841-853.
 10. Ивлева, И.С. Активация кальпаинов в стриатуме после интраназального введения хлорида марганца / И.С. Ивлева, Н.С. Пестерева, З.М. Муружева, М.С. Тихомирова, **М.Н. Карпенко** // Микроэлементы в медицине. – 2018. – Т. 19 – № 4. – С. 16-19. <https://doi.org/10.19112/2413-6174-2018-19-4-16-19>
 11. Ivleva, I. Intranasal exposure of manganese induces neuroinflammation and disrupts dopamine metabolism in the striatum and hippocampus / I. Ivleva, N. Pestereva, A. Zubov, **M. Karpenko** // Neuroscience Letters. – 2020. – V. 738, 135344. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2020.135344>
 12. Обламская, И.С. Признаки нейровоспаления у крыс с марганцевой токсической энцефалопатией / И.С. Обламская, Н.С. Пестерева, Е.А. Скоморохова, **М.Н. Карпенко** // Медицинский академический журнал. – 2016. – Т.16 – № 4. – С. 32-33.
 13. Пестерева, Н.С. М-кальпаин как внеклеточная протеаза / Н.С. Пестерева, И.С. Обламская, **М.Н. Карпенко** // Медицинский академический журнал. – 2016. – Т.16 – № 4. – С. 131-132.
 14. Maystrenko, V. Changes in activity of μ - and m-calpains and signs of neuroinflammation in the hippocampus and striatum of rats after single intraperitoneal injection of subseptic dose of endotoxin / V. Maystrenko, I. Ivleva, D. Krytskaya, A. Zubov, A. Ivlev, **M. Karpenko** // Metabolic brain disease. – 2021. – V. 36 – № 7. – P. 1917-1928. <https://doi.org/10.1007/s11011-021-00755-y>

Публикации в материалах научных конференций, симпозиумов и т.п.:

1. Muruzheva, Z.M. Features of energy metabolism in patients with essential tremor / Z.M. Muruzheva, I.S. Oblamskaya, **M.N. Karpenko** // FEBS Open Bio. – 2018. – 8(S1). – P. 287.
2. Ивлева, И.С. Подавление активности кальпаинов как подход к терапии марганцевой энцефалопатии / И.С. Ивлева, Т.В. Тютюнник, **М.Н. Карпенко** // VI Междисциплинарная конференция «Молекулярные и Биологические аспекты Химии, Фармацевтики и Фармакологии». Сборник тезисов. – 2020. – С. 40.
3. Ivleva, I.S. Manganese induced neurotransmission remodeling / I.S. Ivleva, T.V. Tyutyunnik, V.A. Maystrenko, **M.N. Karpenko**, V.M. Klimenko. // 27-rd Multidisciplinary International Neuroscience and Biological Psychiatry Conference “Stress and Behavior”. – 2020. – P. 22.
4. Ивлева, И.С. Терапевтический потенциал кальпастина при марганцевой энцефалопатии / И.С. Ивлева, Т.В. Тютюнник, А.З. Маршак, **М.Н. Карпенко** //

- VI Съезд физиологов СНГ с международным участием. Сборник тезисов. – 2019. – С. 134.
5. Майстренко, В.А. Экспериментальная эндотоксинемия как индуктор дегенерации дофаминергических нейронов / В.А. Майстренко, И.С. Ивлева, Н.С. Пестерева, З.М. Муружева, **М.Н. Карпенко** // VI съезд физиологов СНГ с международным участием. Сборник тезисов. – 2019. – С. 156.
 6. Муружева, З.М. Провоспалительные цитокины в крови пациентов с эссенциальным тремором / З.М. Муружева, В.А. Майстренко, И.С. Обламская, Э.М. Мальсагова, **М.Н. Карпенко** // Юбилейный конгресс с международным участием. XX Давиденковские чтения. Сборник трудов. – 2018. – С. 276-277.
 7. **Карпенко, М.Н.** Кальпаины в регуляции дофаминергической передачи / **М.Н. Карпенко**, Н.С. Пестерева, И.С. Обламская, Е.А. Скоморохова // XXIII Съезд Физиологического общества им. И.П. Павлова. – 2017. – С. 1969-1971.
 8. **Karpenko, M.N.** Intranasal exposure to manganese induces inflammation, oxidative stress and activation of calpains in rat brain / **M.N. Karpenko**, I.S. Oblamskaya, E.A. Skomorokhova, N.S. Pestereva // ТЕМА-2017. – Journal of Trace Elements in Medicine and Biology. – 2017. – 41S1. – P. 13.
 9. Крицкая, Д.В. Уровень дофамина и его метаболитов в стриатуме и гиппокампе крыс при эндотоксинемии / Д.В. Крицкая, И.С. Обламская, Н.С. Пестерева, А.П. Шварц, **М.Н. Карпенко** // Международная научная конференция Научного Парка СПбГУ «Трансляционная биомедицина: современные методы междисциплинарных исследований в аспекте внедрения в практическую медицину». Сборник тезисов. – 2015. – С. 47.
 10. Майстренко, В.А. Отсроченные эффекты введения субсептических доз ЛПС крысам / В.А. Майстренко, Д.О. Шолохова, **М.Н. Карпенко** // XXI зимняя молодежная школа ПИЯФ по биофизике и молекулярной биологии. Сборник тезисов. – 2020. – С. 153-154.
 11. Пестерева, Н.С. Марганец как активатор кальпаина / Н.С. Пестерева, **М.Н. Карпенко**, И.С. Обламская, Е.А. Скоморохова, Б.С. Подольный // XIII международный междисциплинарный конгресс «Нейронаука для медицины и психологии». Сборник трудов. – 2017. – С. 324-325.
 12. Пестерева, Н.С. Механизм секреции m-кальпаина из синапсом / Н.С. Пестерева, **Карпенко М.Н.** // XIX Зимняя молодежная школа по биофизике и молекулярной биологии. Сборник тезисов. – 2018. – С. 132.
 13. Щукина, В.А. Реакция клеток ЦНС на интраназальное введение липополисахарида крысам / В.А. Щукина, **М.Н. Карпенко** // II Всероссийская научная конференция молодых ученых «Проблемы биомедицинской науки третьего тысячелетия». Сборник тезисов. – 2012. – С. 109-110.
 14. Маршак, А.З. Влияние 3-нитропропионовой кислоты на активность кальпаинов / А.З. Маршак, Н.С. Пестерева, **М.Н. Карпенко** // III всероссийская молодежная школа-конференция с международным участием «Молекулярные механизмы регуляции физиологических функций». – 2019. – С. 42-43.

СПИСОК ОСНОВНЫХ СОКРАЩЕНИЙ

3-НПК –	3-нитропропионовая кислота	ОТ-ПЦР-	обратная транскрипция, сопряженная с полимеразной цепной реакцией
БАВ –	биологически активное вещество	ПААГ–	полиакриламидный гель
БП –	болезнь Паркинсона	ТГ –	тирозингидроксилаза
ВЭЖХ –	высокоэффективная жидкостная хроматография	ФНО- α –	фактор некроза опухоли α
ГАМК –	гамма-аминомасляная кислота	ЦНС –	центральная нервная система
ГВК –	гомованилиновая кислота	ЭДТА–	этилендиаминтетрауксусная кислота
ГЭБ –	гематоэнцефалический барьер	ЭТ –	эссенциальный тремор
ДА –	дофамин	FITC –	fluorescein isothiocyanate
ДОФУК	3,4-диоксифенилуксусная кислота	FTM –	Fahn-Tolosa-Marin - шкала оценки тяжести тремора
ИЛ-1 β –	интерлейкин -1 β	IkB –	inhibitor of NF κ B
КОМТ–	катехол-О-метилтрансфераза	NF κ B –	nuclear factor κ B
ЛДГ –	лактатдегидрогеназа	SEM –	standard error mean (ошибка среднего)
ЛПС –	липополисахарид	FITC –	fluorescein isothiocyanate
МАО-В–	моноаминоксидаза типа В	FTM –	Fahn-Tolosa-Marin - шкала оценки тяжести тремора
МФТП –	1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридин		