

БЕЛОК ТЕПЛООВОГО ШОКА HSP70 МОДУЛИРУЕТ НЕЙРОДЕГЕНЕРАТИВНЫЙ ПРОЦЕСС В ТРАНСГЕННОЙ МОДЕЛИ ПРОТЕИНОПАТИИ

М.М. ЧИЧЁВА¹✉, Е.А. ВИХАРЕВА¹, Ю.Б. ВИХАРЕВ¹, Г.В. МАЛЕЕВ², Е.В. БОВИНА¹, А.В. МАЛЬЦЕВ¹, А.А. УСТЮГОВ¹

¹Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт физиологически активных веществ Российской академии наук, Черноголовка, Московская область, Россия

²Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биологии развития им. Н.К.Кольцова Российской академии наук, Москва, Россия

Боковой амиотрофический склероз (БАС) – нейродегенеративное заболевание, имеющее относительно ранний возраст манифестации (до 50 лет) с частотой встречаемости от 1,5 до 5 на 100 000 населения. В основе патологии лежит агрегация белков, что ведёт к формированию характерных внутриклеточных включений и, как следствие, гибели нейронов. Наше исследование посвящено изучению влияния белка теплового шока с молекулярной массой 70 кДа (HSP70) на развитие протеинопатии у трансгенных животных с сверхэкспрессией мутантной формы белка FUS человека и моделирующих патологию БАС. В течение 86 дней когортам трансгенных животных производилось ежедневное интраназальное введение рекомбинантного HSP70 в дозе 0,133 мкг/кг в день (примерно 4 мкг/день/мышь) с измерением массы тела животных. В результате при прогрессии протеинопатии было выявлено снижение общей массы тела животного с момента появления первых симптомов заболевания, а также зафиксировано незначительное увеличение продолжительности жизни экспериментальной группы животных. Интраназальное введение рекомбинантной формы HSP70 влияет на течение патологии у мышей линии Fus(1-359) в случае, когда животные получали препарат на ранней (досимптоматической) фазе развития патологии. При этом было выявлено, что введение HSP70 на досимптоматической фазе увеличивало среднюю продолжительность жизни у самок. В целом, было подтверждено использование трансгенной модели в качестве инструмента для изучения функции HSP70 *in vivo*.

Ключевые слова: Белок теплового шока 70 кДа, боковой амиотрофический склероз, FUS, трансгенные животные.

Цитирование: Чичёва М.М. и др. Белок теплового шока HSP70 модулирует нейродегенеративный процесс в трансгенной модели протеинопатии. *Russian Scientist*. 2018. т.2 №1: 3-12

Citing: Chicheva MM et al. The heat shock protein HSP70 modulates the neurodegenerative process in the transgenic model of proteinopathy. *Russian Scientist*. 2018.v.2 №1: 3-12

✉ chicheva.mariya@gmail.com

Материал прошёл двойное слепое рецензирование.

The manuscript took a double-blind peer review.

THE HEAT SHOCK PROTEIN HSP70 MODULATES THE NEURODEGENERATIVE PROCESS IN THE TRANSGENIC MODEL OF PROTEINOPATHY

M.M. CHICHEVA¹✉, E.A. VIKHAREVA¹, YU.B. VIKHAREV¹, G.V. MALEEV², E.V. BOVINA¹, A.V. MALTSEV¹, A.A. USTYUGOV¹

¹Institute of Physiologically Active Compounds of the Russian Academy of Sciences, Chernogolovka, Moscow region, Russia

²Koltzov Institute of Developmental Biology of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is a neurodegenerative disease that has a relatively early age of onset (below 50 years) with an incidence rate of 1.5 to 5 per 100000. Aggregation of proteins leads to the formation of characteristic intracellular inclusions resulting in a subsequent loss of motor neurons which is attributed as the major causal factors of the pathology. Our study is devoted to the effects of the heat shock protein 70 kDa (HSP70) on the development of proteinopathy in the transgenic animals of ALS with overexpression of the mutant form of human FUS protein. HSP70 was intranasally administered at a dose of 0.133µg/kg daily (which is equivalent of 4 µg/day per mouse) for 86 days paired with the measurement of animal body weight. As a result, we found that animals in the transgenic control and treatment groups both showed loss of body mass from the time of the onset of the first symptoms of the disease. Also, we detected an insignificant increase in the lifespan of the experimental treated group of animals compared to the untreated controls. The intranasal administration of the recombinant HSP70 affects the course of pathology in transgenic FUS (1-359) mice only in the groups that received the drug at the early (pre-symptomatic) phase of the pathology. It was found that the administration of HSP70 on the pre-symptomatic phase increased the average lifespan in females. In general, the use of the transgenic model as a tool for studying the function of HSP70 *in vivo* was confirmed.

Keywords: Heat shock protein 70 kDa, amyotrophic lateral sclerosis, FUS, transgenic animals.

Введение

Нейродегенеративные патологии представляют собой группу заболеваний, вносящих существенный вклад в структуру инвалидизации населения. Боковой амиотрофический склероз относится к классу нейродегенеративных заболеваний с относительно ранней манифестацией (до 50 лет). Патология характеризуется постепенным атрофированием мотонейронов в передних рогах спинного мозга, что приводит к появлению парезов и паралича конечностей, а на финальных стадиях – к остановке дыхательных мышц [1]. На данный момент в терапии отсутствует адекватная система оценки предрасположенности к заболеванию, а также применяется только один препарат – Рилузол [2, 3], продлевающий симптоматический период на короткое время. Недавно вышедший новый препарат Эдаравон (Edaravone) пока не зарекомендовал себя в качестве надёжного средства [4]. Терапия, позволяющая отсрочить момент манифестации симптоматики, в настоящее время отсутствует, поэтому остро стоит вопрос о поиске потенциальных лекарственных средств, способных воздействовать на ключевые процессы, определяющие развитие патологии [5].

Одним из потенциальных препаратов в терапии нейродегенеративных заболеваний является представитель семейства белков-шаперонов – белок теплового шока с массой 70 кДа (Hsp70) [6-8]. Данный белок экспрессируется повсеместно, а в его функции входит защита клеточных белков от повреждения при различных стрессирующих воздействиях внешней среды [9-11], а также при старении [12]. Ранее было показано, что индукция Hsp70 или его экспериментальное введение оказывают защитное действие на различных животных и клеточных моделях нейродегенерации [6, 7, 13]. В литературе имеются данные о том, что повышение уровня экспрессии Hsp70 может увеличивать продолжительность жизни дрозофилы, нематод и некоторых видов позвоночных. Так, например, в случае с дрозофилами было установлено, что при воздействии лёгким стрессорным фактором (гипербарической нормоксией) в пренатальном периоде продолжительность жизни увеличивалась на 12 % у самцов и на 14 % у самок [14, 15]. В дополнение также была увеличена устой-

чивость к окислительному и тепловому стрессам у взрослых особей, которые подверглись стрессу в пренатальном периоде, по сравнению с контрольной группой без стрессирующего стимула. У червей увеличенная продолжительность жизни была зафиксирована при введении дополнительной копии белка теплового шока (Hsp16) [16], тогда как у позвоночных животных удалось добиться эффекта путём интраназального введения экзогенного рекомбинантного Hsp70 трансгенным модельным животным [17]. Более того, при межвидовом сравнении трёх типов тканей высокие уровни экспрессии Hsp70 характерны для долгоживущих видов [18].

Ряд работ посвящён механизмам действия белка Hsp70, которые имеют отношение к нейродегенеративной патологии. Механизм развития протеинопатий связан с внутриклеточной агрегацией белков. В работе Rampelt H et al исследована противоагрегационная активность комплекса белков Hsp70-Hsp110, за счёт которой они способны выполнять свою основную функцию – защищать организм от последствий теплового шока в результате потери структуры белками клетки [19]. Схожие механизмы действия работают и при патологической агрегации белков в процессе развития протеинопатии. Группа учёных установила, что морталин (шаперон семейства Hsp70, работающий внутри митохондрий) встречается в повышенной концентрации при раковых опухолях, а при возрастных изменениях нервной системы – в пониженной, что обосновывает использование данного препарата для перспективной терапии обеих патологий [20]. Кроме того, работы многих исследователей демонстрируют перспективность дальнейшего углубления в изучение механизмов действия Hsp70 при нейропатологиях с использованием в исследованиях *in vivo* модели. Было показано, что белок Hsp70 участвует в ответе нейронов головного мозга и клеток глии крыс на тепловое воздействие, а также на искусственно вызванную циановой кислотой эпилепсию [21]. Другая группа учёных из Сан-Франциско занималась влиянием Hsp70 на восстановление после ишемического стресса, вызванного внутрипросветной блокадой средней мозговой артерии, на трансгенной линии мышей. У группы мышей, оверэкспрессирующих Hsp70, восстановление

шло быстрее и эффективнее, чем у животных дикого типа [22]. Исследователи из Пекинского университета получили результаты по влиянию АМФ-активируемой протеинкиназы на течение БАС в трансгенной модели, основанной на нокауте гена SOD1. По их данным, это влияние опосредовано регуляцией именно через белок Hsp70 [23]. Работая на той же модельной линии животных и внедрив в геном дополнительную кассету с экспрессией гена SIRT1, группа японских учёных показала, что замедление течения патологии происходит опосредованно через активацию Hsp70 [24].

Предпосылкой к нашему исследованию послужила работа Бобковой и соавт., которые показали, что введение рекомбинантного человеческого Hsp70 животным, моделирующим болезнь Альцгеймера (5xFAD), способно уменьшать клинические проявления моделируемой патологии [8]. Также был показан позитивный эффект Hsp70 на сохранение когнитивных функций при старении [17]. Интраназальное введение Hsp70 в дозах, сходных с предложенными для нашего исследования, улучшало обучаемость и память в группах трансгенных возрастных мышей линии 5xFAD [25]. В связи с этим целью данной работы является изучение влияния Hsp70 на развитие патологического нейродегенеративного процесса, вызванного суперэкспрессией мутантной формы белка FUS (*Fused in Sarcoma*) в нервных тканях трансгенной модели. В качестве модельных линий животных по изучению роли Hsp70 была ис-

пользована трансгенная линия животных с Fus(1-359), моделирующей процесс агрегации белка в нейрональных тканях путём синтеза aberrантной формы белка FUS под пан-нейрональным промотером, приводящая к интенсивному формированию патогистологических включений, подобных структурам, обнаруживаемым в аутопсийном материале больных боковым амиотрофическим склерозом [26, 27].

Материалы и методы

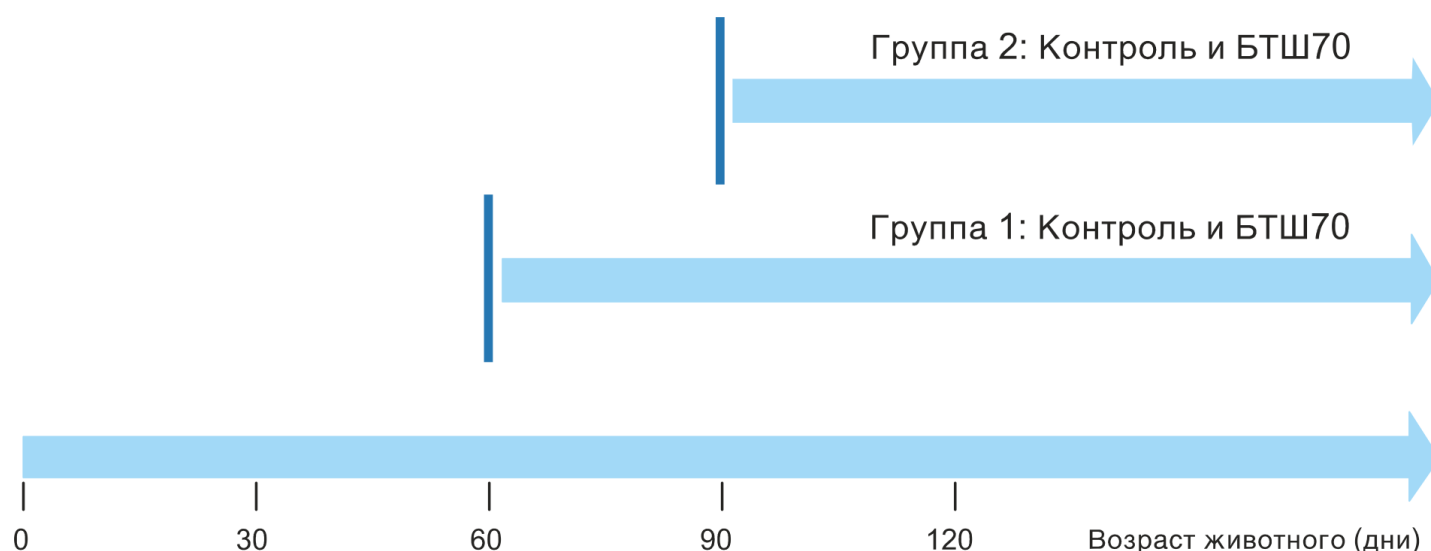
Трансгенные животные

Для исследования были отобраны экспериментальные и контрольные группы мышей линии Fus(1-359) на генетическом фоне CD1, воспроизводящих патологию болезни двигательного нейрона [27]. Трансгенная линия Fus(1-359) была получена с помощью вставки фрагмента человеческой ДНК, кодирующей белок FUS в геном мышей [26]. Кодирующий конструкт укороченного гена *FUS* человека с удалённым сигналом ядерной локализации был введён в геном методом микроинъекции трансгенной кассеты на стадии пронуклеуса. Полученные животные характеризовались развитием моторных дисфункций в течение первых месяцев жизни, фенотип трансгенных мышей в целом отражал симптомы, характерные для бокового амиотрофического склероза [27].

Всего в эксперименте участвовало 43 трансгенных мыши (20 самцов и 23 самки, так как, по нашим данным, протекание патологии у животных данной линии существенно не отличается).

Рис. 1. Схема эксперимента по хроническому интраназальному введению HSP70

Fig. 1. Intranasal administration of HSP70 scheme.



На основании уже имеющейся характеристики линии Fus(1-359) были определены основные фазы протекания патологического процесса и разработана схема ежедневного интраназального введения Hsp70 (рис. 1). Возраст начала введения рекомбинантного белка для одной группы животных – 63-71 день (21 животное) – совпадает с началом досимптоматического периода, когда признаки патологических изменений не детектируются, а возраст второй группы – 91-96 дней (22 животных) – совпадает со входом в симптоматическую стадию модельного заболевания. Возраст начала введения Hsp70/физиологического раствора и половой состав групп экспериментальных животных представлен в табл. 1. Введение проводилось ежедневно и продолжалось в течение 86 дней. На протяжении всего эксперимента проводилась регистрация массы тела в качестве интегрального показателя общего состояния животных, а изменение массы тела более чем на 10 % является одним из критических биометрических параметров оценки благосостояния животного, включая способность животных к потреблению пищи, общей активности, размножению и прочие показатели [28]. Кроме того, было замечено, что для имеющейся у нас модели характерно резкое снижение веса животного за 2-3 дня до момента манифестации видимых симптомов моторного заболевания (неопубликованные данные). Все животные находились в свободном доступе к воде и пище и поддерживались в постоянном 12-часовом световом цикле в температурном режиме от 19 до 22°C.

Все описанные далее работы и манипуляции с животными проводили в соответствии с «Правилами лабораторной практики в Российской Федерации» от 2003 г. Протокол заседания комиссии по биоэтике ИФАВ РАН №12 от 10 мая 2016 года.

Получение и введение рекомбинантного белка Hsp70

По результатам предварительных исследований была выбрана модифицированная форма Hsp70 с мутациями во всех сайтах гликозилирования, полученная из бактерий как наиболее чистая и стабильная изоформа, проявляющая максимальные защитные свойства при анализе по понижению уровня активных форм кислорода [29]. Рекомбинантная изоформа Hsp70 была синтезирована в Институте биологии гена Российской академии наук, лаборатории Регуляции генетических процессов с использованием методики, указанной в статье [30]. Далее белок был растворён в 0,9 %-ном растворе NaCl в воде (физиологический раствор). Введение Hsp70 экспериментальным животным проводилось ежедневно в дозе 0,133 мкг/кг в день (примерно 4 мкг/день на мышь). Животным из контрольных групп вводили по 2 мкл растворителя (физ. раствор) в каждую ноздрю согласно ранее описанной методике [17].

Генотипирование животных

Для определения генотипа животных забиралась биопсия уха. Геномную ДНК из биопсий уха выделяли с использованием лизирующего буфера, содержащего 100 мМ NaCl, 50 мМ Трис-HCl, 2 мМ EDTA и протеиназу К в концентрации 0,5 мг/мл. Образцы инкубировали в течение 18 часов при 55°C, после чего инактивировали протеиназу К при 85°C в течение 45 мин. Детекцию трансгенной кассеты в геномной ДНК проводили методом ПЦР на амплификаторе Mastercycler Nexus (Eppendorf AG, Германия). Реакцию проводили с пары праймеров: 5'-AGAAGCAAGACCTCTGCAGAG-3' (находится в векторной части трансгенной кассеты) и 5'-TCTTTGTGCAAGGCCTGGGT-3' (расположен

Таблица 1. Экспериментальные группы животных, которым вводили HSP70 или физиологический раствор (контроль).

Table 1 Experimental groups of animals treated with HSP70 or saline solution (control).

Возраст введения	Самцы		Самки	
	HSP70	Физ. раствор (контроль)	HSP70	Физ. раствор (контроль)
60 дней	4	4	9	4
90 дней	7	5	7	3

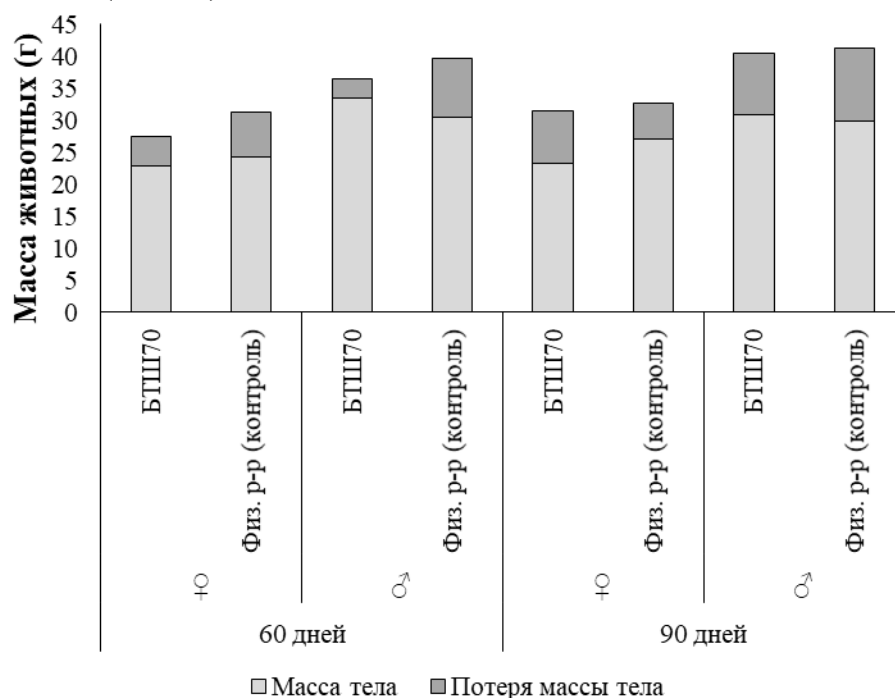
в клонированном первом экзоне гена FUS человека) в объёме 25 мкл в буфере, содержащем 300 мМ Трис-НСl рН 8,0, 166 мМ (NH₄)₂SO₄, 25 мМ MgCl₂ и dNTP в концентрации 0,2 мМ. Конечная концентрация каждого праймера составляла 0,5 мкМ. В качестве матрицы использовали 1 мкл лизата, содержащего геномную ДНК. В реакционную смесь добавляли 1,25 ед. Таq-поли-меразы (Fermentas, США). Программа для ПЦР включала первичную денатурацию (2 мин при 95°C), затем 30 циклов: 15 сек при 95°C, 30 сек при 58°C и 40 сек при 72°C. Далее проводили досинтез комплементарных цепей – 2 мин при 72°C. В результате детектировали фрагмент размером 255 п.о.

Результаты и обсуждение

Средняя масса тела животных на момент начала эксперимента составила 39,4 граммов для

Рис. 2. Средние показатели массы тела и потери массы тела трансгенных животных линии Fus(1-359) при введении HSP70 и физ. раствора, взятого в качестве контроля.

Fig. 2. Average body weight and body weight loss of Fus(1-359) transgenic animals after intranasal treatment with HSP70 or saline solution (control).



самцов и 30,7 граммов для самок, что соответствует физиологической норме для данной линии мышей (рис. 2). Для большей части животных введение продолжалось до момента финальной

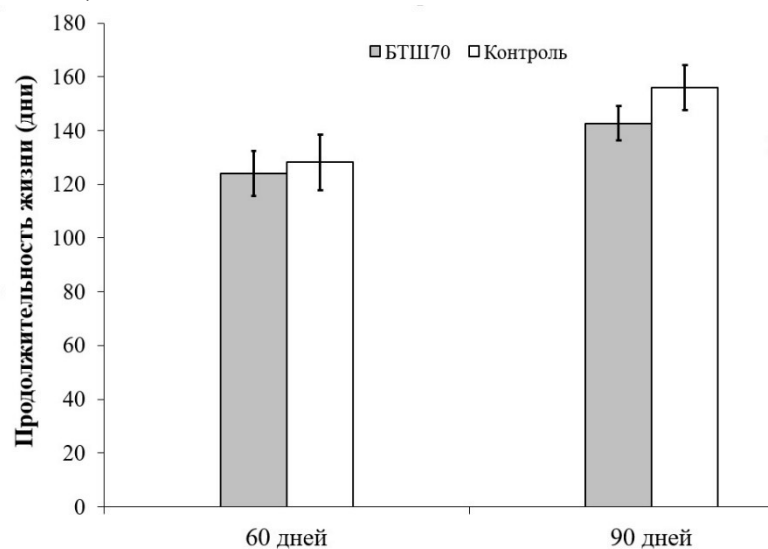
Таблица 2. Средние показатели потери массы тела трансгенных животных линии Fus(1-359) при введении HSP70 и физиологического раствора, взятого в качестве контроля.

Table 2. Average body weight loss of FUS(1-359) animals with the administration of HSP70 and saline taken as a control.

Возраст начала введения вещества	Пол	Группа введения	Средняя начальная масса тела (г)	Средняя потеря массы тела (%)	Средняя продолжительность жизни (дни)
60 дней	♀	HSP70	27,5	16,6	136
		Физ. р-р (контроль)	31,2	22,1	125
	♂	HSP70	36,4	8,0	107
		Физ. р-р (контроль)	39,65	23,4	136
90 дней	♀	HSP70	31,4	25,6	152
		Физ. р-р (контроль)	32,7	17,4	159
	♂	HSP70	40,43	23,7	146
		Физ. р-р (контроль)	41,23	27,4	152

Рис. 3. Средняя продолжительность жизни животных различных групп введения HSP70/физиологического раствора и возрастных когорт с указанием разброса (без разделения по половому признаку).

Fig. 3. Average life expectancy of animals of different groups of HSP70/saline administration and age cohorts (all genders combined).



стадии симптоматики. В группе животных «60 дней»: 10 особей были выведены из эксперимента из-за прогрессирующей протеинопатии для соблюдения правил работы с животными в соответствии с лабораторными практиками в Российской Федерации (Приказ Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации № 08 от 23.08.2010). Средний возраст животных на момент смерти для группы введения Hsp70 составил 118 дней, а для контрольной груп-

пы с введением физиологического раствора – 117 дней. На момент окончания введения Hsp70 (через 86 дней ежедневного введения) в живых осталось 6 животных, из них в экспериментальной группе было 4, а в контрольной – 2, все они были самками и не демонстрировали симптомов протеинопатии. Их возраст на момент окончания эксперимента составил от 150 до 158 дней (рис. 3).

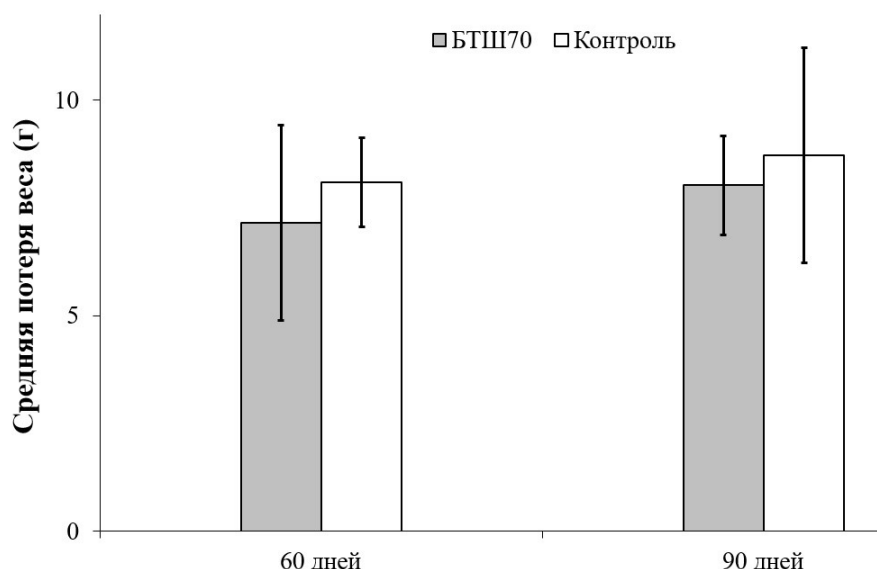
В группе животных «90 дней», что соответ-

ствует ранней симптоматической фазе, 12 животных были выведены из эксперимента из-за прогрессирующей протеинопатии до наступления естественной смерти для соблюдения правил работы с животными. Средний возраст составил 131 день в экспериментальной группе и 134 – в контрольной группе. На момент окончания эксперимента в живых осталось 8 животных: в экспериментальной и контрольной группах было по 2 самца и 2 самки. Их возраст на момент окончания эксперимента составил от 172 до 180 дней. Постепенная потеря массы тела нарастала в течение 14-34 дней в обеих группах животных. Средняя продолжительность жизни животных в результате появления симптомов была одинаковой для экспериментальной группы и составила 126 дней.

Для животных группы «60 дней» общий процент потери массы тела в группе введения Hsp70 составил 16,6 % среди самок и 8 % среди самцов, а в группе контроля – 22,1 % среди самок и 23,4 % среди самцов. Из этих данных можно сделать вывод о том, что животные, получавшие препарат на досимптоматической стадии, были в

Рис. 4. Средняя потеря массы тела животными различных групп введения и когорт с указанием разброса данных (без разделения по половому признаку).

Fig. 4. Average loss of body weight of animals of different groups of HSP70/saline administration and age cohorts (all genders combined).



меньшей степени истощены к моменту выхода из эксперимента вне зависимости от пола (рис. 4). Данная закономерность не распространяется на группу животных, которым начали вводить Hsp70 на ранней симптоматической стадии: для мышей из группы «90 дней» процент потери веса в группе введения белка составил 25,6 % для самок и 23,7 % для самцов, а в группе контроля – 17,4 % для самок и 27,4 % для самцов (см. табл. 2, рис. 2).

С целью анализа действия препарата животные были разделены на группы по возрасту и полу (см. табл. 1). В каждой из групп были животные, которым вводили Hsp70 и физ. раствор (растворитель), в результате между этими двумя когортами было проведено сравнение по двум параметрам: возраст смерти/вывода из эксперимента и процент потери массы. Степень достоверности отличий оценивалась с помощью теста Вилкоксона и парного двухвыборочного t-теста для средних (табл. 3), однако ни одно из сравнений не выявило статистически достоверных корреляций. Различия между средним возрастом смерти жи-

вотных из экспериментальной и контрольной групп без учёта пола со статистической точки зрения также не являются достоверными ни в одной из групп начала введения (по t-тесту $p = 0,57$, при этом отдельно для 60-дневных $p = 0,91$, а для 90-дневных $p = 0,60$), см рис. 3. Однако было замечено, что животные экспериментальной группы погибали в более раннем возрасте. Интересно, что сравнение возрастов выхода животных из эксперимента для более молодой группы начала введения («60 дней») между самцами и самками внутри экспериментальной группы показало достоверные отличия (см. табл. 4, рис. 5), из чего можно сделать вывод, что при хроническом интраназальном введении, начиная с досимптоматической фазы, препарат Hsp70 оказывал влияние на самок, но не действовал на самцов. Такой эффект можно объяснить тем, что патология БАС в принципе более активно развивается у самцов, что подтверждено литературными данными [31]. При этом в контрольных группах животных таких отличий выявлено не было. Возможно, эти результаты отражают совместное влияние введения Hsp70 и еже-

Таблица 3. Достоверность отличий между группами введения HSP70 и физиологического раствора в различных половых и возрастных когортах трансгенных животных линии Fus(1-359).

Table 3. Statistical confidence intervals in groups treated with HSP70 and saline in different sex and age cohorts of Fus(1-359) transgenic animals.

Возраст начала введения HSP70	Пол	Потеря массы тела		Продолжительность жизни	
		T-тест	Вилкоксон-тест	T-тест	Вилкоксон-тест
60 дней	♀	$p = 0,29$	$p = 1$	$p = 0,54$	$p = 0,91$
	♂	$p = 0,19$	$p = 0,98$	$p = 0,21$	$p = 0,95$
90 дней	♀	$p = 0,33$	$p = 1$	$p = 0,72$	$p = 1$
	♂	$p = 0,82$	$p = 1$	$p = 0,96$	$p = 0,72$

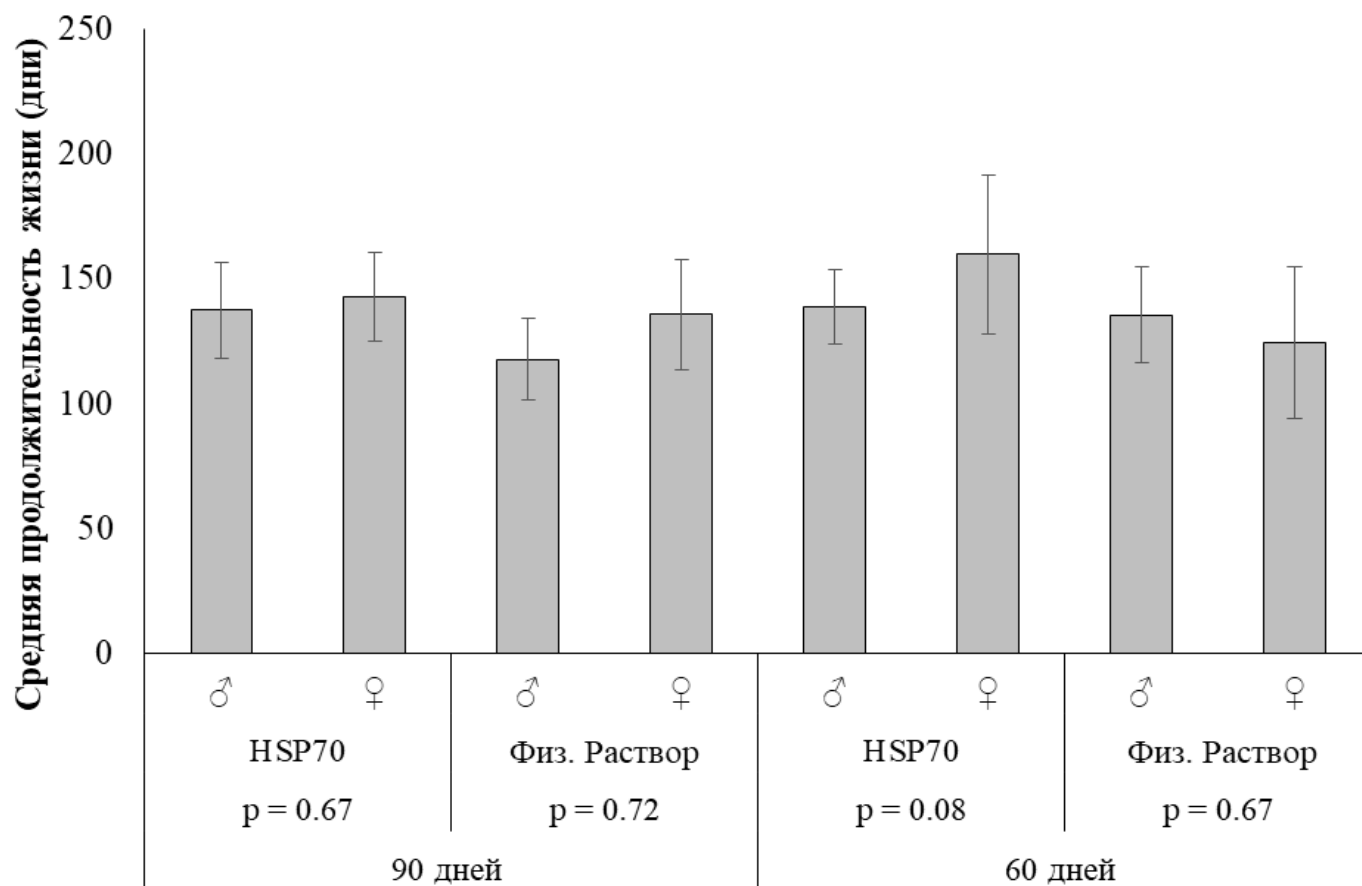
Таблица 4. Достоверность отличий между группами самок и самцов в различных возрастных когортах и группах введения HSP70/физ. раствора трансгенных животных линии Fus(1-359).

Table 4. Statistical confidence intervals in groups of females and males of different age cohorts and HSP70/saline treatment groups of Fus(1-359) transgenic animals.

Возраст начала введения HSP70	Группа введения	Потеря массы тела		Продолжительность жизни	
		T-тест	Вилкоксон-тест	T-тест	Вилкоксон-тест
60 дней	HSP70	$p = 0,46$	$p = 0,79$	$p = 0,08$	$p = 4,57E-09$
	Физ. р-р (контроль)	$p = 0,8$	$p = 0,25$	$p = 0,67$	$p = 1,00$
90 дней	HSP70	$p = 0,83$	$p = 0,57$	$p = 0,67$	$p = 1$
	Физ. р-р (контроль)	$p = 0,52$	$p = 0,31$	$p = 0,72$	$p = 7,6E-08$

Рис. 5. Отличия между средней продолжительностью жизни групп самок и самцов в различных возрастных когортах и группах введения HSP70/физ. раствора трансгенных животных линии Fus(1-359) с указанием разброса данных и достоверности по т-тесту.

Fig. 5. Differences of average life expectancy in groups of females and males animals of different age cohorts and HSP70/saline treatments groups of Fus(1-359) mice with statistical confidence intervals.



дневного стресса при интраназальном введении, однако эти выводы требуют дальнейших исследований. Сравнение процента потери массы тела и периода начала введения Hsp70 не дало достоверных отличий ни в одном из случаев (см. табл. 3) как между самцами и самками, так и внутри экспериментальной и контрольной групп.

В результате проведённого исследования можно заключить, что хроническое интраназальное введение рекомбинантной формы Hsp70 влияет на течение патологии у мышей линии Fus(1-359), если животные получают препарат на ранней (досимптоматической) фазе развития патологии. При этом средняя продолжительность жизни в экспериментальной и контрольной группах статистически не отличалась. Введение Hsp70 на ранней фазе патологии увеличивало среднюю продолжительность жизни самок, но не увеличивало среднюю продолжительность жизни самцов. При прогрессии протеинопатии было выявлено снижение общей массы тела животного с момента появления первых симптомов заболевания.

Признательность

Исследование поддержано грантом РФФИ (№ 16-04-01089), содержание животных обеспечено программой поддержки биоресурсных коллекций ИФАВ РАН (ФАНО №0090-2017-0016). Работа проведена на оборудовании ЦКП ИФАВ РАН.

Список литературы

1. Dyck, P.J., J.C. Stevens, D.W. Mulder R.E. Espinosa. Frequency of nerve fiber degeneration of peripheral motor and sensory neurons in amyotrophic lateral sclerosis. Morphometry of deep and superficial peroneal nerves. *Neurology*, 1975. 25(8): p. 781-5. PMID: 1171412.
2. Miller, R.G., J.D. Mitchell, M. Lyon D.H. Moore. Riluzole for amyotrophic lateral sclerosis (ALS)/motor neuron disease (MND). *Cochrane Database Syst Rev*, 2007(1): p. CD001447. PMID: 17253460.
3. Onesti, E., I. Schettino, M.C. Gori, V. Frasca, M. Ciccanti, C. Cambieri, et al. Dysphagia in Amyotrophic Lateral Sclerosis: Impact on Patient Behavior, Diet Adaptation, and Riluzole Management. *Front Neurol*,

2017. 8: p. 94. PMID: 28377742.
4. Rothstein, J.D. Edaravone: A new drug approved for ALS. *Cell*, 2017. 171(4): p. 725. PMID: 29100067.
 5. Petrov, D., C. Mansfield, A. MoussyO. Hermine. ALS Clinical Trials Review: 20 Years of Failure. Are We Any Closer to Registering a New Treatment? *Front Aging Neurosci*, 2017. 9: p. 68. PMID: 28382000.
 6. Latchman, D.S. Protective effect of heat shock proteins in the nervous system. *Curr Neurovasc Res*, 2004. 1(1): p. 21-7. PMID: 16181063.
 7. Leak, R.K. Heat shock proteins in neurodegenerative disorders and aging. *J Cell Commun Signal*, 2014. 8(4): p. 293-310. PMID: 25208934.
 8. Evgen'ev, M.B., G.S. Krasnov, I.V. Nesterova, D.G. Garbuz, V.L. Karpov, A.V. Morozov, et al. Molecular Mechanisms Underlying Neuroprotective Effect of Intranasal Administration of Human Hsp70 in Mouse Model of Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis*, 2017. 59(4): p. 1415-1426. PMID: 28759972.
 9. Astakhova, L.N., O.G. Zatsepina, M.B. Evgen'evD.G. Garbuz. [Comparative analysis of heat shock promoters efficiency in two diptera species]. *Mol Biol (Mosk)*, 2014. 48(3): p. 436-43. PMID: 25831893.
 10. Krebs, R.A.M.E. Feder. Tissue-specific variation in Hsp70 expression and thermal damage in *Drosophila melanogaster* larvae. *J Exp Biol*, 1997. 200(Pt 14): p. 2007-15. PMID: 9246784.
 11. Lindquist, S. Varying patterns of protein synthesis in *Drosophila* during heat shock: implications for regulation. *Dev Biol*, 1980. 77(2): p. 463-79. PMID: 7399133.
 12. Morimoto, R.I.A.M. Cuervo. Proteostasis and the aging proteome in health and disease. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 2016. 69 Suppl 1: p. S33-8. PMID: 24833584.
 13. Rozhkova, E., M. Yurinskaya, O. Zatsepina, D. Garbuz, V. Karpov, S. Surkov, et al. Exogenous mammalian extracellular HSP70 reduces endotoxin manifestations at the cellular and organism levels. *Ann N Y Acad Sci*. 1197: p. 94-107. PMID: 20536838.
 14. Yu, S., E. Lee, B. Tsogbadrakh, G.I. SonM. Kim. Prenatal hyperbaric normoxia treatment improves healthspan and regulates chitin metabolic genes in *Drosophila melanogaster*. *Aging (Albany NY)*, 2016. 8(10): p. 2538-2550. PMID: 27777382.
 15. Vos, M.J., S. Carra, B. Kanon, F. Bosveld, K. Klauke, O.C. Sibon, et al. Specific protein homeostatic functions of small heat-shock proteins increase lifespan. *Aging Cell*, 2016. 15(2): p. 217-26. PMID: 26705243.
 16. Walker, G.A.G.J. Lithgow. Lifespan extension in *C. elegans* by a molecular chaperone dependent upon insulin-like signals. *Aging Cell*, 2003. 2(2): p. 131-9. PMID: 12882326.
 17. Bobkova, N.V., M. Evgen'ev, D.G. Garbuz, A.M. Kulikov, A. Morozov, A. Samokhin, et al. Exogenous Hsp70 delays senescence and improves cognitive function in aging mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2015. 112(52): p. 16006-11. PMID: 26668376.
 18. Salway, K.D., E.J. Gallagher, M.M. PageJ.A. Stuart. Higher levels of heat shock proteins in longer-lived mammals and birds. *Mech Ageing Dev*, 2011. 132(6-7): p. 287-97. PMID: 21703294.
 19. Rampelt, H., J. Kirstein-Miles, N.B. Nillegoda, K. Chi, S.R. Scholz, R.I. Morimoto, et al. Metazoan Hsp70 machines use Hsp110 to power protein disaggregation. *Embo J*, 2012. 31(21): p. 4221-35. PMID: 22990239.
 20. Deocaris, C.C., W.J. Lu, S.C. KaulR. Wadhwa. Druggability of mortalin for cancer and neuro-degenerative disorders. *Curr Pharm Des*, 2013. 19(3): p. 418-29. PMID: 22920904.
 21. Plumier, J.C., A.M. Krueger, R.W. Currie, D. Kontoyianis, G. KolliasG.N. Pagoulatos. Transgenic mice expressing the human inducible Hsp70 have hippocampal neurons resistant to ischemic injury. *Cell Stress Chaperones*, 1997. 2(3): p. 162-7. PMID: 9314603.
 22. Rajdev, S., K. Hara, Y. Kokubo, R. Mestril, W. Dillmann, P.R. Weinstein, et al. Mice overexpressing rat heat shock protein 70 are protected against cerebral infarction. *Ann Neurol*, 2000. 47(6): p. 782-91. PMID: 10852544.
 23. Zhao, Z., Y. Sui, W. Gao, B. CaiD. Fan. Effects of diet on adenosine monophosphate-activated protein kinase activity and disease progression in an amyotrophic lateral sclerosis model. *J Int Med Res*, 2015. 43(1): p. 67-79. PMID: 25534414.
 24. Watanabe, S., N. Ageta-Ishihara, S. Nagatsu, K. Takao, O. Komine, F. Endo, et al. SIRT1 overexpression ameliorates a mouse model of SOD1-linked amyotrophic lateral sclerosis via HSF1/HSP70i chaperone system. *Mol Brain*, 2014. 7: p. 62. PMID: 25167838.
 25. Bobkova, N.V., D.G. Garbuz, I. Nesterova, N. Medvinskaya, A. Samokhin, I. Alexandrova, et al. Therapeutic effect of exogenous hsp70 in mouse models of Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis*, 2014. 38(2): p. 425-35. PMID: 23985416.
 26. Shelkovnikova, T.A., O.M. Peters, A.V. Deykin, N. Connor-Robson, H. Robinson, A.A. Ustyugov, et al. Fused in sarcoma (FUS) protein lacking nuclear localization signal (NLS) and major RNA binding motifs triggers proteinopathy and severe motor phenotype in transgenic mice. *J Biol Chem*, 2013. 288(35): p. 25266-74. PMID: 23867462.
 27. Дейкин, А.В., Е.А. Ковражкина, Р.К. Овчинников, Е.В. Бронуицкий, О.Д. Разинская, А.П. Смирнов, и др. Модель бокового амиотрофического склероза на основе линии трансгенных мышей, экспрессирующих мутантную форму ФУС белка человека. *Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова*, 2014. Т.8: p. 63-70.
 28. Абрашова, Т.В., Я.А. Гуцин, М.А. Ковалева, А.В. Рыбакова, А.И. Селезнева, А.П. Соколова, и др. Справочник. Физиологические, биохимические и биометрические показатели нормы экспериментальных животных. Ред. В.Г. Макарова и М.Н. Макарова. 2013, СПб: Изд-во «ЛЕМА». с. 116.
 29. Морозов, А.В., М.М. Юринская, В.А. Митькевич, Д.Г.

- Гарбуз, О.В. Преображенская, М.Г. Винокуров, и др. Белок теплового шока 70 снижает активность протеасом в клетках нейробластомы человека в присутствии изомеризованного по asp7 бета-амилоида 1-42. Молекулярная биология, 2017. Т.51(1): p. 166-171. DOI: 10.7868/S0026898416060136.
30. Andreeva, N.V., O.G. Zatsepina, D.G. Garbuz, M.B. Evgen'evA.V. Belyavsky. Recombinant HSP70 and mild heat shock stimulate growth of aged mesenchymal stem cells. Cell Stress Chaperones, 2016. 21(4): p. 727-33. PMID: 27091568.
31. Riar, A.K., S.R. Burstein, G.M. Palomo, A. Arreguin, G. ManfrediD. Germain. Sex specific activation of the ERalpha axis of the mitochondrial UPR (UPRmt) in the G93A-SOD1 mouse model of familial ALS. Hum Mol Genet, 2017. 26(7): p. 1318-1327. PMID: 28186560.