

УДК 577.24

ИЗМЕНЕНИЯ В СИСТЕМЕ ГЛУТАМАТ/ГАМК В ГИППОКАМПЕ КРЫС С ВОЗРАСТОМ И ПРИ РАЗВИТИИ ПРИЗНАКОВ БОЛЕЗНИ АЛЬЦГЕЙМЕРА

© 2023 А.О. Бурняшева, Н.А. Стефанова, Н.Г. Колосова*, Д.В. Телегина

*Институт цитологии и генетики СО РАН,
630090 Новосибирск, Россия; электронная почта: kolosova@bionet.nsc.ru*

Поступила в редакцию 30.08.2023

После доработки 12.10.2023

Принята к публикации 17.10.2023

Глутамат и гамма-аминомасляная кислота (ГАМК) являются наиболее распространенными нейромедиаторами в ЦНС и играют ключевую роль в синаптической стабильности/пластичности. Оптимальный гомеостаз глутамата и ГАМК важен для здорового старения и снижения риска неврологических заболеваний, в то время как долговременный дисбаланс может способствовать развитию нейродегенеративных расстройств, включая болезнь Альцгеймера (БА). Его нормализация рассматривается как перспективная стратегия профилактики и/или лечения БА, однако сведения об изменениях ГАМКергической и глутаматергической систем в мозге с возрастом, а тем более – в динамике развития БА, ограничены. Не ясно, является ли дисбаланс возбуждающих/тормозных систем причиной или следствием развития заболевания. В настоящем исследовании проанализированы изменения с возрастом уровня глутамата и ГАМК, ферментов их синтеза и деградации (глутаминазы, глутаминсинтазы, GABA-T и GAD67), а также их транспортеров (GLAST, GLT-1 и GAT1) и субъединиц рецепторов (GluA1, NMDAR1, NMDA2B и GABAAR1) в гиппокампе крыс Вистар и преждевременно стареющих крыс OXYS, у которых спонтанно развиваются все ключевые признаки БА, что позволяет рассматривать их как модель наиболее распространенной (> 95%) спорадической формы заболевания. Результаты исследования свидетельствуют о том, что с возрастом активность системы глутамат/ГАМК снижается в гиппокампе крыс обеих линий. В то же время у крыс OXYS не выявлено существенных изменений этой системы, связанных с развитием характерных для БА нейродегенеративных процессов.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: старение, болезнь Альцгеймера, глутамат, ГАМК, гиппокамп, крысы OXYS.

DOI: 10.31857/S0320972523120023, EDN: NNTTTG

ВВЕДЕНИЕ

По данным Всемирной организации здравоохранения, болезнь Альцгеймера (БА) становится основной причиной сенильной деменции, заболеваемость которой растет на фоне увеличения продолжительности жизни и старения населения развитых и развивающихся стран [1]. БА проявляется выраженным снижением когнитивных способностей на фоне накопления в мозге токсических форм пептида бета-амилоида (β -амилоида), образования амилоидных бляшек и нейрофибриллярных клубков, синаптической недостаточности и ги-

бели нейронов [2–4]. Молекулярные механизмы, лежащие в основе развития БА, не ясны; эффективных подходов, способных замедлить или остановить прогрессию заболевания, нет. Предполагается, что изменения с возрастом баланса нейромедиаторных систем – возбуждающей глутаматергической и тормозной ГАМКергической в головном мозге – могут быть предпосылкой развития БА и вносить существенный вклад в ее прогрессию [5]. Глутамат и гамма-аминомасляная кислота (ГАМК) контролируют многие процессы в ЦНС, в том числе – общий уровень возбуждения головного мозга. Так, избыточное возбуждение тор-

Принятые сокращения: БА – болезнь Альцгеймера; ГАМК – гамма-аминомасляная кислота; GABAAR1 – субъединица 1 рецептора GABA-A; GABA-T – ГАМК-трансаминаза; GAD – декарбоксилаза глутаминовой кислоты (глутаматдекарбоксилаза); GAD67 – изоформа глутаматдекарбоксилазы; GAT1 – ГАМК-транспортер тип 1; GLAST – глиальный транспортер глутамата и аспартата; GLT-1 – глиальный транспортер глутамата 1; GluA1 – субъединица 1 рецептора AMPA; NMDAR1 – субъединица 1 рецептора NMDA; NMDAR2B – субъединица 2B рецептора NMDA.

* Адресат для корреспонденции.

мозной ГАМКергической системы подавляет, а избыточная активность возбуждающей глутаматергической системы вызывает эксайтотоксичность. Сбалансированное взаимодействие этих двух нейротрансмиттерных систем необходимо для физиологического гомеостаза, тогда как длительный дисбаланс может способствовать развитию психических и нейродегенеративных расстройств, в том числе – БА [6]. Предотвращение возбуждающе-тормозного дисбаланса активно обсуждается как многообещающая стратегия профилактики и/или лечения БА [7], при этом сведения об изменениях ГАМКергической и глутаматергической систем с возрастом, а тем более на различных стадиях развития БА, крайне ограничены. Остается неясным, является ли дисбаланс возбуждающих/тормозных систем причиной или следствием развития БА. Связано это, прежде всего, с невозможностью исследовать ранние доклинические стадии заболевания у людей и с дефицитом адекватных моделей заболевания.

Целью настоящего исследования явилась оценка вклада изменений с возрастом баланса глутаматергической и ГАМКергической систем в развитие и прогрессию наиболее распространенной (>95% случаев) спорадической формы БА. Работа выполнена на преждевременно стареющих крысах OXYS – уникальной модели спорадической формы заболевания. У этих животных при отсутствии характерных для наследственной БА мутаций в генах *Psen1*, *App* и *Psen2* спонтанно развиваются все ключевые признаки заболевания [8–10]. Уже в возрасте 3–5 мес. у крыс OXYS выявляются нарушения поведения и снижение когнитивных функций, гиперфосфорилирование тау-белка, нарушение длительной посттетанической потенциации, синаптическая недостаточность, деструктивные изменения нейронов, которые прогрессируют на фоне повышения уровня белка-предшественника амилоида (APP), усиленного накопления β -амилоида и образования амилоидных бляшек в мозге к возрасту 12 мес. и достигают ярко выраженных стадий БА-подобной патологии к 16–18 мес. [10, 11]. Ранее мы исследовали изменения с возрастом системы глутамат/ГАМК в сетчатке крыс OXYS и оценили их возможный вклад в развитие характерной для крыс ретинопатии [12]. Целью настоящей работы явилось сравнение изменений с возрастом системы глутамат/ГАМК в гиппокампе крыс Вистар (контроль) и OXYS на разных стадиях развития признаков БА, включая доклиническую. Для этого мы исследовали в гиппокампе уровень глутамата и ГАМК,

а также содержание ключевых ферментов, регулирующих цикл глутамат/ГАМК: глутаминазы, которая катализирует образование глутамата из глутамината; глутаминсинтетазы, катализирующей синтез глутамината из глутамата; глутаматдекарбоксилазы (GAD67), превращающей глутамат в ГАМК, и фермента деградации ГАМК – ГАМК-трансаминазы (GABA-T). Кроме того, мы исследовали уровень рецепторов глутамата и ГАМК – субъединицы 1 рецептора NMDA (NMDAR1) и субъединицы 2B рецептора (NMDAR2B), субъединицы 1 рецептора AMPA (GluA1) и субъединицы $\alpha 1$ рецептора GABA-A (GABAAR1), а также переносчиков глутамата – глиального транспортера глутамата и аспартата (GLAST, также известного как EAAT1), транспортера глутамата 1 (GLT-1, также известного как EAAT2) и транспортера ГАМК (GAT1). Наконец, мы сравнили у крыс OXYS и Вистар возрастные изменения уровня экспрессии генов, связанных с сигнальными путями глутамата и ГАМК в гиппокампе.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Экспериментальные животные. Все проводимые исследования были выполнены на крысах-самцах линий OXYS и Вистар (контроль). Животных содержали в стандартных условиях вивария при освещении 12 ч свет/12 ч темнота, они получали гранулированный корм и воду *ad libitum*.

Иммуноферментный анализ (ELISA). Содержание глутамата и ГАМК в гиппокампе крыс OXYS и Вистар в возрасте 1,5; 3; 12 и 18 мес. ($n = 5$ для каждой группы) оценивали иммуноферментным анализом (ИФА), используя наборы ELISA Kit for Glutamic Acid (Glu) CES122Ge и ELISA Kit for Gamma-Aminobutyric Acid (gABA) CEA900Ge, согласно протоколу производителя («Cloud-Clone Corp.», США). Наборы для ИФА были подобраны таким образом, чтобы детектировался только уровень свободных глутамата и ГАМК. Глутамат и ГАМК в составе белков (связанный глутамат и ГАМК соответственно) были исключены из анализа.

Концентрацию тотального белка определяли с помощью набора реактивов ThermoFisher Pierce™ BCA Protein Assay («ThermoFisher», США). Для определения концентрации строили калибровочную кривую, используя белок из набора производителя.

Вестерн-блот-анализ. Содержание ключевых ферментов синтеза ГАМК и глутамата –

глутаминазы, глутаминсинтетазы, глутаматдекарбоксилазы (GAD67) и ГАМК-трансаминазы (GABA-T), белков-транспортеров глутамата (GLAST и GLT-1) и ГАМК (GAT1), субъединиц рецепторов глутамата (NMDAR1, NMDAR2B, GluA1) и ГАМК (GABAAR1) определяли в гиппокампе методом вестерн-блот-анализа у крыс OXYS и Вистар в возрасте 1,5; 3; 12 и 18 мес. ($n = 6$ для каждой группы).

Крыс ингаляционно анестезировали CO_2 и декапитировали. Гиппокампы выделяли на льду и замораживали в жидком азоте. Образцы хранили при температуре -70°C до момента использования. Все стадии выделения белка проводили на льду при температуре 4°C . Образцы гиппокампов гомогенизировали с помощью лизирующего буфера RIPA (150 мМ NaCl; 50 мМ Tris-HCl (pH 7,4); 1% Triton X-100; 0,1% додецилсульфата натрия (SDS); 1% дезоксихолата натрия (Deoxycholic Acid, Sodium Salt) и 1 мМ ЭДТА) с ингибиторами протеаз и фосфатаз (P8340 и P5726-5ML; «Sigma-Aldrich», США). После тщательной гомогенизации раствор белка центрифугировался на 12 000 g в течение 30 мин при 4°C . Супернатант хранили при температуре -20°C . Концентрацию тотального белка определяли с помощью набора реактивов ThermoFisher Pierce™ BCA Protein Assay («ThermoFisher»; #23225). Для определения концентрации строили калибровочную кривую, используя белок из набора производителя.

Образцы (по 50 мкг общего белка) в загрузочном буфере (10% SDS; 15% β -меркаптоэтанола; 50% глицерина; 0,3 М Tris-HCl (pH 6,8); бромфеноловый синий) наносили на дорожки 8%-ного полиакриламидного геля в буфере Tris-Glycine (1,5 М, pH 8,8), разделяли электрофорезом и переносили на нитроцеллюлозную мембрану («Bio-Rad», США), которую затем блокировали 5%-ным BSA в PBST (1 ч). Далее, мембраны инкубировали в течение 16 ч при температуре $+4^\circ\text{C}$ с первичными антителами (анти-глутаминаза, анти-глутаминсинтетазы, анти-NMDAR1, анти-субъединица 1 AMPA-рецептора (анти-GluA1), анти-GAD67, анти-GABA-T, анти- $\alpha 1$ рецептора GABA-A, анти-GLT-1 и анти-GAT1 (ab93434, ab64613, ab109182, ab183797, ab26116, ab152134, ab33299, ab41621 и ab426 соответственно; «Abcam», США; разведение — 1 : 1000) и анти-GLAST и анти-NMDA2B (PA519709 и 71-8600, «Invitrogen», США; разведение — 1 : 1000). В качестве референсного белка использовали β -актин (42 кДа; ab6276, «Abcam»; 1 : 5000) и GAPDH (37 кДа; ab8245, «Abcam»; 1 : 5000). После отмывок в PBST проводили инкуба-

цию со вторичными антителами анти-мышь и анти-кролик (ab150115 и ab96886 соответственно; «Abcam»; 1 : 5000) в течение 1 ч при комнатной температуре. Флуоресцентное излучение детектировали с помощью прибора ChemiDoc MP Imaging System («Bio-Rad»). Интенсивность свечения бендов измеряли с помощью программы ImageJ (NIH, США).

Массовое параллельное секвенирование (RNA-Seq). Массовое параллельное секвенирование РНК (RNA-Seq) образцов гиппокампов крыс OXYS и Вистар в возрасте 20 дней, 5 и 18 мес. ($n = 3$ для каждой группы) проводили на платформе Illumina Genome Analyzer IIx в ОАО «Геноаналитика», Россия. Для каждого образца было получено ~40 млн ридов длиной 50 нуклеотидов. Риды картировали на референсный геном *Rattus norvegicus* (версия Rnor_5.0.76) с помощью программы TopHat (v2.0.10). На основании данных RNA-Seq при уровне значимости $\text{adj} < 0,05$ были сформированы списки дифференциально экспрессирующихся генов [13, 14].

Список генов глутаматергического сигнального пути был извлечен из базы данных генома крысы (RGD; 126 генов крысы; <https://rgd.mcg.edu/>). Список генов ГАМКергического синапса был получен в базе данных KEGG pathway (89 генов человека; <http://www.genome.jp/kegg/>).

Статистический анализ. Статистическую обработку результатов проводили с помощью пакета программ STATISTICA (версия 10.0). Использовали тест Колмогорова–Смирнова для проверки на нормальность распределений. В анализ включали все значения, лежащие в пределах трех среднеквадратических отклонений от выборочного среднего. Использовали дисперсионный анализ с последующим post-hoc-сравнением межгрупповых средних по критерию Ньюмена–Кейлса. Как независимые рассматривали факторы «генотип» и «возраст». Данные представлены как среднее \pm среднеквадратичное отклонение ($M \pm SD$). Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Оценка содержания глутамата и ГАМК в гиппокампе крыс OXYS и Вистар разного возраста. На первом этапе работы был проведен иммуноферментный анализ (ELISA) содержания свободных глутамата и ГАМК в гиппокампе крыс Вистар и OXYS разного возраста. Мы не обнаружили межлинейных и возрастных

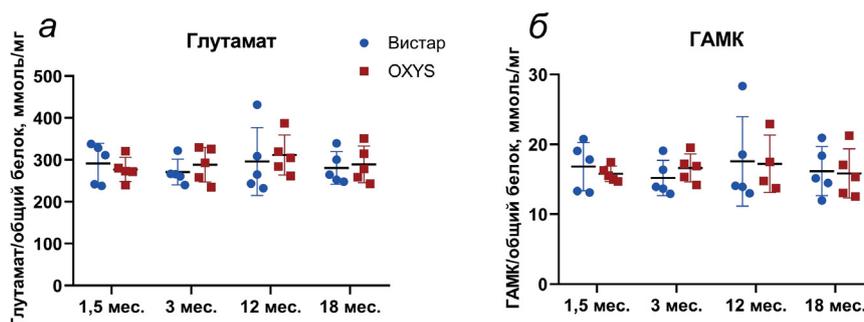


Рис. 1. Уровень глутамата (а) и ГАМК (б) в гиппокампе крыс Вистар и OXYS разного возраста. Данные представлены как $M \pm SD$ ($n = 5$)

различий в содержании глутамата (рис. 1, а) и ГАМК (рис. 1, б) в гиппокампе крыс обеих линий. Двухфакторный дисперсионный анализ ANOVA не выявил влияния факторов «генотип» и «возраст». Таким образом, уровень исследованных нейромедиаторов оставался стабильным в гиппокампе крыс OXYS и Вистар на протяжении всей жизни.

Изменения глутаматергической системы в гиппокампе крыс Вистар и OXYS с возрастом. Оценивая изменения глутаматергической системы с возрастом в головном мозге крыс, мы анализировали экспрессию ключевых ферментов синтеза и деградации глутамата — белков глутаминазы и глутаминсинтетазы, а также белков-транспортеров GLAST, GLT-1 и субъединиц рецепторов глутамата NMDAR1, NMDAR2B и GluA1 (субъединицы рецептора AMPA). Глутамат не способен проникать через гематоэнцефалический барьер, соответственно, в головном мозге глутамат синтезируется *de novo* в астроцитах и нейронах из глутаминина с помощью фермента глутаминазы. В астроцитах глутамат под действием фермента глутаминсинтетазы превращается в глутамин [15].

Согласно двухфакторному дисперсионному анализу, уровень глутаминазы (рис. 2, а) и глутаминсинтетазы (рис. 2, б) не зависел от возраста, и на него не влиял генотип животных — мы не выявили различий в содержании этих белков в гиппокампе крыс OXYS и Вистар.

Важным фактором, определяющим доступность глутамата для сигнальных процессов, является система его обратного захвата и рециркуляции. Поглощение глутамата из синаптической щели необходимо для нормальной нейротрансмиссии в глутаматергических синапсах, поскольку высокий уровень внеклеточного глутамата может оказывать токсический эффект на нейроны и синапсы. Транспортеры GLAST и GLT-1 удаляют глутамат из внеклеточного пространства, что необ-

ходимо для поддержания низких нетоксичных концентраций этого нейромедиатора [16]. Согласно анализу ANOVA, уровни белков GLAST и GLT-1 в гиппокампе зависели от фактора «возраст» ($F_{3,37} = 10,2$; $p < 0,001$ и $F_{3,31} = 4,4$; $p < 0,01$ соответственно) и не зависели от фактора «генотип». Как показало сравнение групповых средних, уровень GLAST у крыс обеих линий повышался к возрасту 12 мес., а к возрасту 18 мес. — снижался до уровня 1,5-месячных животных (рис. 2, в). Уровень GLT-1 у крыс OXYS повышался с 3 до 12 мес. и оставался на том же уровне в возрасте 18 мес., в то время как у крыс Вистар уровень GLT-1 с возрастом значимо не изменялся (рис. 2, г). Межлинейных различий в содержании транспортеров GLAST и GLT-1 обнаружено не было.

Постсинаптическое окончание распознает глутамат с помощью глутаматных рецепторов [6]. Далее, мы проанализировали в гиппокампе крыс Вистар и OXYS разного возраста содержание субъединиц ионотропных рецепторов глутамата NMDA и AMPA-типа, ответственных за быструю нейротрансмиссию: субъединицу 1 AMPA-рецептора (также известную как GluA1) и субъединицы NR1 и NR2B NMDA-рецептора (NMDAR2B и NMDAR1; также известны как GluN2B и GluN1 соответственно). Согласно двухфакторному дисперсионному анализу, уровень белка NMDAR1 зависел только от фактора «возраст» ($F_{3,34} = 1,6$; $p < 0,05$). Сравнение групповых средних показало, что уровень NMDAR1 снижался с возрастом у крыс Вистар — к возрасту 12 мес. он стал достоверно ниже ($p < 0,05$) по сравнению с 1,5-месячными животными (рис. 2, д). У крыс OXYS достоверных изменений с возрастом не выявлено, поэтому уже в возрасте 12 мес. у них наблюдалась тенденция к повышению, по сравнению с крысами Вистар, содержания NMDAR1 ($p = 0,06$), а в возрасте 18 мес. у крыс OXYS уровень NMDAR1 был достоверно повышен ($p < 0,05$; рис. 2, д).

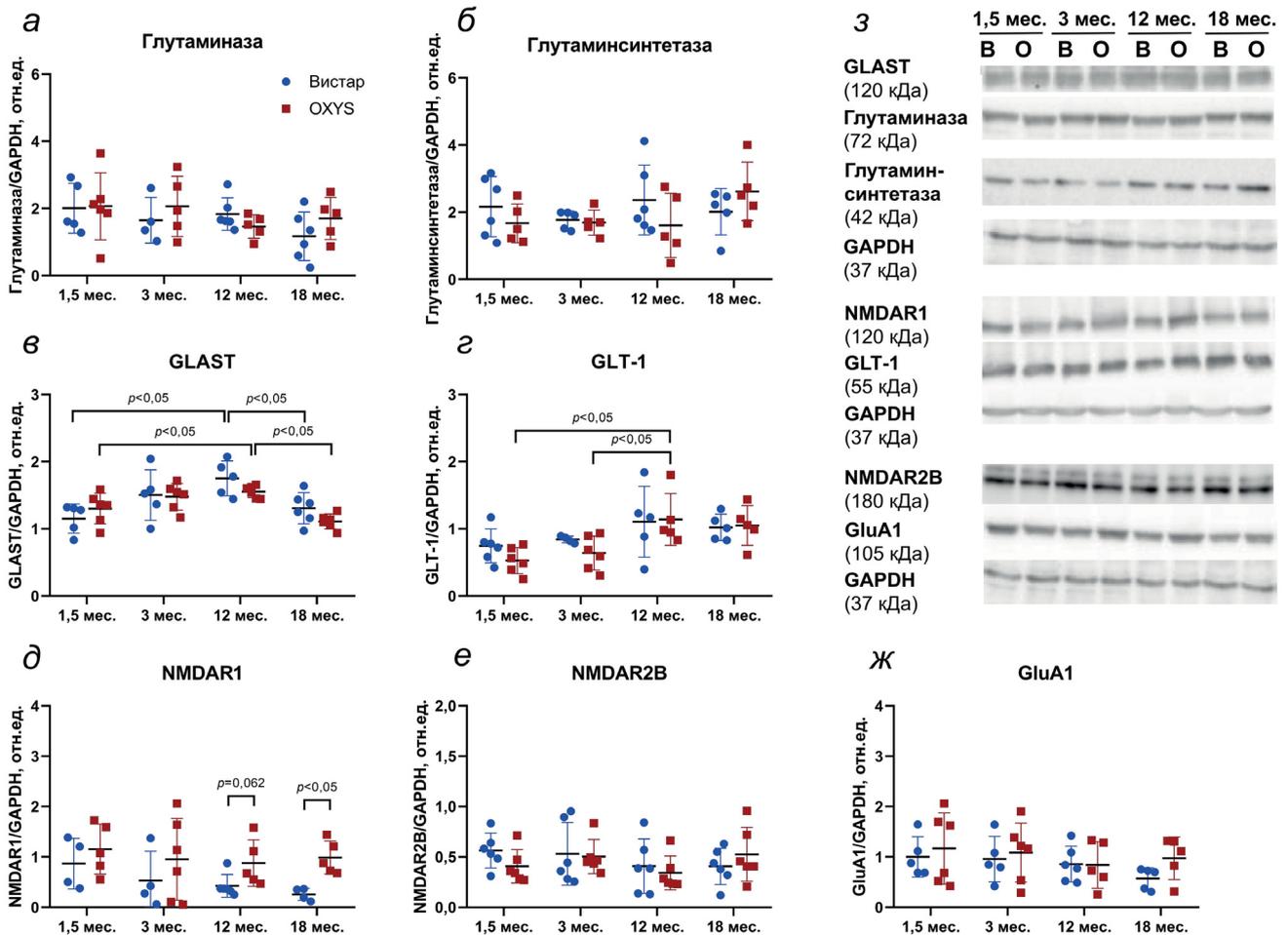


Рис. 2. Изменения уровня белка глутаминазы (а), глутаминсинтетазы (б), GLAST (в), GLT-1 (г), NMDAR1 (д), NMDAR2B (е), GluA1 (ж) в гиппокампе крыс Вистар и OXYS с возрастом. 3 – Репрезентативные изображения белков, полученные методом вестерн-блот-анализа: В – Вистар, О – OXYS. Данные представлены как $M \pm SD$ ($n = 4-6$)

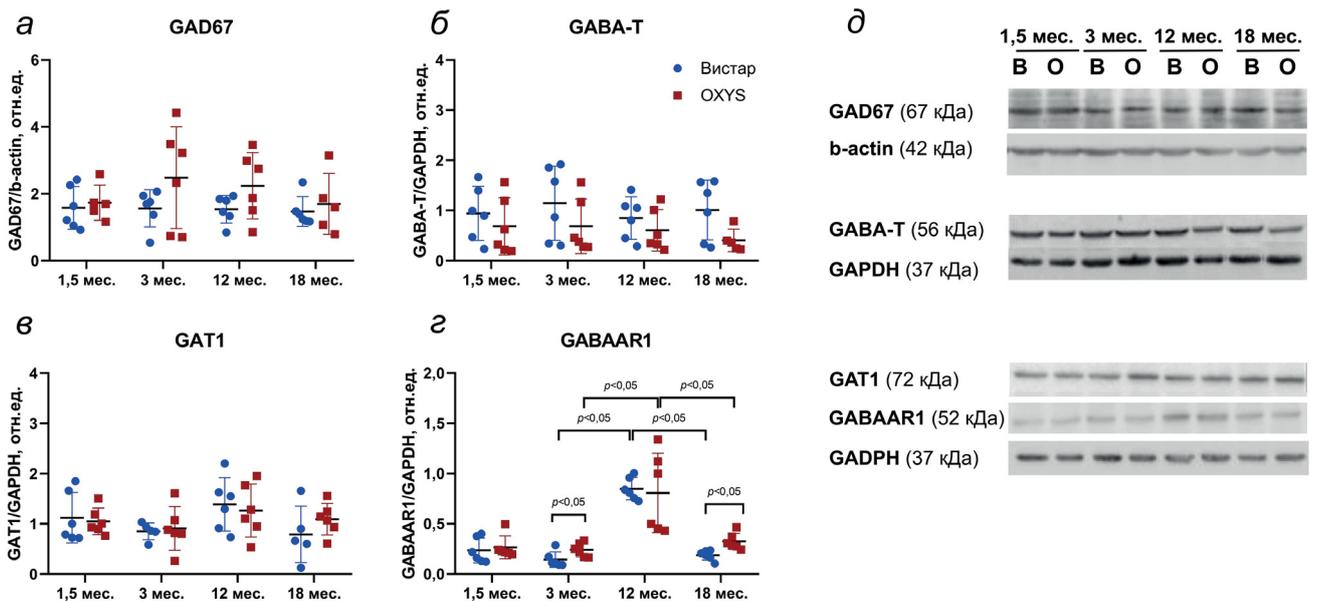


Рис. 3. Изменения уровня белков GAD67 (а), GABA-T (б), GAT1 (в) и GABAAR1 (г) в гиппокампе крыс Вистар и OXYS с возрастом. д – Репрезентативные изображения белков, полученные методом вестерн-блот-анализа: В – Вистар, О – OXYS. Данные представлены как $M \pm SD$ ($n = 4-6$)

Содержание NMDAR2B и GluA1 в гиппокампе крыс OXYS и Вистар не различалось и не менялось с возрастом (рис. 2, *e* и *ж*).

Изменения ГАМКергической системы в гиппокампе крыс Вистар и OXYS с возрастом. Далее, мы оценили экспрессию ключевых ферментов синтеза (глутаматдекарбоксилазы, GAD67) и деградации (ГАМК-трансаминазы, GABA-T) ГАМК. Как показал двухфакторный дисперсионный анализ, уровень GAD67 у крыс OXYS был повышен ($F_{1,38} = 4,2; p < 0,05$), а уровень GABA-T – снижен ($F_{1,39} = 6,3; p < 0,02$) по сравнению с крысами Вистар, при этом возраст на содержание этих белков не влиял (рис. 3, *a* и *b*). Не влиял возраст и на содержание GAT1 – транспортера, который удаляет ГАМК из синаптической щели. Различий в содержании белка GAT1 в гиппокампе крыс OXYS и Вистар также выявлено не было (рис. 3, *в*).

Содержание GABAAR1 зависело от возраста животных ($F_{3,40} = 39,7; p < 0,001$), но на него не влиял генотип. Уровень GABAAR1 значительно возрастал к возрасту 12 мес., а затем снижался к возрасту 18 мес. у крыс обеих линий ($p < 0,05$; рис. 3, *г*). При этом сравнение групповых средних показало, что в возрасте 3 и 18 мес. у крыс OXYS уровень GABAAR1 был выше, чем у крыс Вистар ($p < 0,05$).

Изменения экспрессии связанных с сигнальными путями глутамата и ГАМК генов в гиппокампе крыс OXYS и Вистар с возрастом. Для оценки изменений экспрессии генов, связанных с глутаматергическими и ГАМКергическими синапсами у крыс OXYS, были проанализированы ранее полученные данные RNA-Seq гиппокампа 20-дневных, 5- и 18-месячных крыс OXYS и Вистар [13, 14]. У крыс OXYS с возраста 20 дней до 5 мес. изменялась экспрессия 29 из 126 генов, связанных (согласно RGD) с глутаматергическим синапсом, а с возраста 5 до 18 мес. – 56 генов. У крыс Вистар с возраста 20 дней до 5 мес. изменялась экспрессия 34 генов и с возраста 5 до 18 мес. – 51 гена. Из 88 генов, связанных (согласно базе данных KEGG pathway database) с ГАМКергическим синапсом, в гиппокампе крыс OXYS с возраста 20 дней до 5 мес. изменялась экспрессия 13 генов и с 5 до 18 мес. – 41 гена, а у крыс Вистар с возраста 20 дней до 5 мес. – 21 гена, с 5 до 18 мес. – 37 генов. Следует отметить, что с 5 до 18 мес. в гиппокампе крыс обеих линий экспрессия подавляющего большинства генов, связанных с сигнальными путями глутамата/ГАМК, снижалась (таблица).

В возрасте 20 дней экспрессия только четырех генов, связанных с глутаматергическим

синапсом, в гиппокампе крыс OXYS отличалась от таковой у крыс Вистар: уровень мРНК *Grin3b*, *Grm6* и *Slc1a2* был повышен, а *Pla2g5* – снижен ($\text{padj} < 0,05$). В возрасте 5 мес. у крыс OXYS была изменена (повышена) экспрессия генов *Grin3b* и *Pla2g2d*; в 18 мес. – повышена экспрессия гена *Pla2g6*, а генов *Gng12*, *Grm6*, *Ppp3r1* и *Slc1a1* – снижена. Из числа генов, связанных с ГАМКергическим синапсом, только в возрасте 18 мес. мы идентифицировали дифференциально экспрессирующиеся гены, экспрессия которых была у крыс OXYS снижена: *Gad2*, *Gng12*, *Plcl1* и *Trak2*.

Таким образом, нам не удалось обнаружить существенных межлинейных различий в уровне экспрессии генов, связанных с глутаматергическими и ГАМКергическими синапсами. С возрастом в гиппокампе крыс обеих линий в основном происходят сходные изменения экспрессии генов, связанных с сигнальными путями глутамата и ГАМК, при этом уровень мРНК подавляющего большинства этих генов закономерно снижался как у крыс Вистар, так и у крыс OXYS.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Снижение эффективности глутаматергической передачи сигналов с возрастом, выявляемое у разных видов животных, Cox et al. [5] рассматривают как одно из консервативных проявлений старения, подобное саркопении или остеопорозу. Закономерно, что снижение и нарушение синаптической пластичности ускоряется при преждевременном старении, в том числе – при БА. Основной целью настоящего исследования была оценка вклада изменений с возрастом глутаматергической и ГАМКергической систем в возникновение и прогрессию признаков БА в головном мозге крыс OXYS – модели спорадической формы заболевания. Неожиданно для нас, мы не обнаружили существенных различий в функционировании этих систем в гиппокампе крыс OXYS и контрольных крыс Вистар. Одна из возможных причин – снижение уровня общего белка, на который были нормированы уровни глутамата и ГАМК в этой работе. В другой работе при исследовании метаболома гиппокампа методом ЯМР-спектроскопии мы нормировали все показатели на вес образцов и выявили повышение уровня ГАМК с возраста 20 дней до 5 мес. и его снижение с 5 до 18 мес. у крыс обеих линий, а также аналогичные возрастные изменения уровня глутамата у крыс OXYS [17]. Такие результаты указывают на то,

Изменения с возрастом экспрессии генов, связанных с сигнальными путями глутамата/ГАМК, в гиппокампе крыс OXYS и Вистар

Название гена	Символ гена	20 дней–5 месяцев		5–18 месяцев	
		OXYS	Вистар	OXYS	Вистар
4-Аминобутират аминотрансфераза	<i>Abat</i>			↓	↓
Аденилатциклаза 1	<i>Adcy1</i>		↑	↓	↓
Аденилатциклаза 2	<i>Adcy2</i>		↑	↓	↓
Аденилатциклаза 4	<i>Adcy4</i>		↓		↑
Аденилатциклаза 5	<i>Adcy5</i>			↓	↓
Аденилатциклаза 6	<i>Adcy6</i>	↓	↓		
Аденилатциклаза 9	<i>Adcy9</i>	↑	↑	↓	↓
Потенциал-зависимая субъединица кальциевого канала N-типа альфа-1B	<i>Cacna1b</i>			↓	
Потенциал-зависимая субъединица кальциевого канала N-типа альфа-1C	<i>Cacna1c</i>			↓	↓
Кальциневрин-подобный EF-рука белок 1	<i>Chp1</i>			↓	↓
Скаффолд белок 4 диски MAGUK большие	<i>Dlg4</i>			↓	↓
DLG ассоциированный белок 1	<i>Dlgap1</i>	↑	↑	↓	↓
Белок типа 1, ассоциированный с рецептором ГАМК типа A	<i>Gabarapl1</i>		↑		
Белок типа 2, ассоциированный с рецептором ГАМК типа A	<i>Gabarapl2</i>			↑	↑
Субъединица 1 рецептора ГАМК типа B	<i>Gabbr1</i>			↑	
Субъединица 2 рецептора ГАМК типа B	<i>Gabbr2</i>			↓	↓
Субъединица альфа 1 рецептора ГАМК типа A	<i>Gabra1</i>			↓	↓
Субъединица альфа 2 рецептора ГАМК типа A	<i>Gabra2</i>			↓	↓
Субъединица альфа 3 рецептора ГАМК типа A	<i>Gabra3</i>			↓	↓
Субъединица альфа 5 рецептора ГАМК типа A	<i>Gabra5</i>			↓	↓
Субъединица бета 1 рецептора ГАМК типа A	<i>Gabrb1</i>	↑	↑	↓	↓
Субъединица бета 2 рецептора ГАМК типа A	<i>Gabrb2</i>			↓	↓
Субъединица бета 3 рецептора ГАМК типа A	<i>Gabrb3</i>			↓	↓
Субъединица дельта рецептора ГАМК типа A	<i>Gabrd</i>	↑	↑	↑	
Субъединица гамма 2 рецептора ГАМК типа A	<i>Gabrg2</i>	↑		↓	↓
Субъединица гамма 3 рецептора ГАМК типа A	<i>Gabrg3</i>				↓

Таблица (продолжение)

Название гена	Символ гена	20 дней–5 месяцев		5–18 месяцев	
		OXYS	Вистар	OXYS	Вистар
Субъединица тета рецептора ГАМК типа А	<i>Gabra3</i>				↓
Глутаматдекарбоксилаза 2	<i>Gad2</i>			↓	↓
Глутаминаза	<i>Gls</i>			↓	↓
Глутаминаза 2	<i>Gls2</i>		↑		
Субъединица альфа i1 G-белка	<i>Gnai1</i>			↓	↓
Субъединица альфа i3 G-белка	<i>Gnai3</i>		↓	↓	
Субъединица альфа o1 G-белка	<i>Gnao1</i>			↓	↓
Субъединица альфа q G-белка	<i>Gnaq</i>			↓	↓
Комплексный локус GNAS	<i>Gnas</i>			↑	↑
Субъединица G-белка бета 1	<i>Gnb1</i>			↓	↓
Субъединица G-белка бета 2	<i>Gnb2</i>			↑	
Субъединица G-белка бета 4	<i>Gnb4</i>	↓	↓	↓	↓
Субъединица G-белка бета 5	<i>Gnb5</i>		↑		
Субъединица G-белка гамма 12	<i>Gng12</i>	↓	↓	↓	↓
Субъединица G-белка гамма 2	<i>Gng2</i>	↓		↓	↓
Субъединица G-белка гамма 3	<i>Gng3</i>	↓		↑	
Субъединица G-белка гамма 4	<i>Gng4</i>	↓			↓
Субъединица G-белка гамма 5	<i>Gng5</i>			↑	↑
Субъединица G-белка гамма 8	<i>Gng8</i>				↑
Субъединица 1 глутаматного ионотропного рецептора типа AMPA	<i>Gria1</i>		↑	↓	↓
Субъединица 3 глутаматного ионотропного рецептора типа AMPA	<i>Gria3</i>			↓	
Субъединица 2 глутаматного ионотропного рецептора каинатного типа	<i>Grik2</i>			↓	
Субъединица 3 глутаматного ионотропного рецептора каинатного типа	<i>Grik3</i>			↓	↓
Субъединица 4 глутаматного ионотропного рецептора каинатного типа	<i>Grik4</i>			↑	
Субъединица 2A глутаматного ионотропного рецептора NMDA типа	<i>Grin2a</i>	↑	↑	↓	↓

Таблица (продолжение)

Название гена	Символ гена	20 дней—5 месяцев		5—18 месяцев	
		OXYS	Вистар	OXYS	Вистар
Субъединица 2В глутаматного ионотропного рецептора NMDA типа	<i>Grin2b</i>	↑	↑		↓
Субъединица 2D глутаматного ионотропного рецептора NMDA типа	<i>Grin2d</i>				↓
Субъединица 3А глутаматного ионотропного рецептора NMDA типа	<i>Grin3a</i>			↓	↓
Субъединица 3В глутаматного ионотропного рецептора NMDA типа	<i>Grin3b</i>				↑
Глутаматный metabotropный рецептор 1	<i>Grm1</i>	↑	↑	↓	↓
Глутаматный metabotropный рецептор 2	<i>Grm2</i>		↓		
Глутаматный metabotropный рецептор 3	<i>Grm3</i>	↑	↑	↓	↓
Глутаматный metabotropный рецептор 4	<i>Grm4</i>	↓	↓		
Глутамат 5	<i>Grm5</i>			↓	↓
Глутаматный metabotropный рецептор 7	<i>Grm7</i>			↓	↓
Белок 1, связанный с хантингином	<i>Hap1</i>	↑	↑		
Скаффолд белок семейства Гомер 1	<i>Homer1</i>			↓	↓
Скаффолд белок семейства Гомер 2	<i>Homer2</i>			↓	↓
Скаффолд белок семейства Гомер 3	<i>Homer3</i>			↑	↑
Инозитол-1,4,5-трифосфатный рецептор типа 1	<i>Itp1</i>	↑	↑	↓	↓
Инозитол-1,4,5-трифосфатный рецептор типа 2	<i>Itp2</i>	↓	↓		
Член 3 подсемейства J калиевых каналов внутреннего выпрямления	<i>Kcnj3</i>			↓	↓
Член 6 подсемейства J калиевых каналов внутреннего выпрямления	<i>Kcnj6</i>			↓	
Митоген-активируемая протеинкиназа 1	<i>Mapk1</i>	↑	↑	↓	↓
Фактор, чувствительный к N-этилмалеимиду, сливающаяся с пузырьками АТРаза	<i>Nsf</i>		↑		
Фосфолипаза А2, группа IIС	<i>Pla2g2c</i>		↑		
Фосфолипаза А2, группа III	<i>Pla2g3</i>	↓	↓	↑	↑
Фосфолипаза А2, группа IVE	<i>Pla2g4e</i>	↓			
Фосфолипаза А2, группа V	<i>Pla2g5</i>	↓			
Фосфолипаза А2, группа VI	<i>Pla2g6</i>				↓

Таблица (продолжение)

Название гена	Символ гена	20 дней–5 месяцев		5–18 месяцев	
		OXYS	Вистар	OXYS	Вистар
Фосфолипаза С бета 1	<i>Plcb1</i>	↑		↓	↓
Фосфолипаза С бета 4	<i>Plcb4</i>		↓	↓	
Фосфолипаза С подобная 1 (неактивная)	<i>Plcl1</i>			↓	
Фосфолипаза D1	<i>Pld1</i>	↓	↓	↓	↓
Фосфолипаза D2	<i>Pld2</i>	↓	↓		
Протеинфосфатаза 3, каталитическая альфа субъединица	<i>Ppp3ca</i>	↑		↓	
Протеинфосфатаза 3, каталитическая бета субъединица	<i>Ppp3cb</i>			↓	
Протеинфосфатаза 3, каталитическая гамма субъединица	<i>Ppp3cc</i>				↑
Протеинфосфатаза 3, регуляторная субъединица В, альфа	<i>Ppp3r1</i>		↑	↓	
сАМР-зависимая протеинкиназа, каталитическая бета субъединица	<i>Prkacb</i>			↓	↓
Протеинкиназа С альфа	<i>Prkca</i>			↓	↓
Протеинкиназа С бета	<i>Prkcb</i>			↓	↓
Протеинкиназа С гамма	<i>Prkcg</i>		↑	↓	
сАМР-зависимая протеинкиназа X-связанная каталитическая субъединица	<i>Prkx</i>		↓		
SH3 и множественные повторяющиеся домены анкирина 1	<i>Shank1</i>	↑			
Член 5 семейства 12 переносчиков растворенных веществ	<i>Slc12a5</i>	↑	↑		
Член 6 семейства 17 переносчиков растворенных веществ	<i>Slc17a6</i>	↓	↓	↓	↓
Член 8 семейства 17 переносчиков растворенных веществ	<i>Slc17a8</i>		↓	↓	
Член 1 семейства 1 переносчиков растворенных веществ	<i>Slc1a1</i>			↓	↓
Член 2 семейства 1 переносчиков растворенных веществ	<i>Slc1a2</i>	↑	↑	↓	↓
Член 3 семейства 1 переносчиков растворенных веществ	<i>Slc1a3</i>	↓			
Член 7 семейства 1 переносчиков растворенных веществ	<i>Slc1a7</i>	↓	↓		

Таблица (окончание)

Название гена	Символ гена	20 дней–5 месяцев		5–18 месяцев	
		ОХYS	Вистар	ОХYS	Вистар
Член 1 семейства 38 переносчиков растворенных веществ	<i>Slc38a1</i>			↓	↓
Член 2 семейства 1 переносчиков растворенных веществ	<i>Slc38a2</i>			↓	
Член 3 семейства 38 переносчиков растворенных веществ	<i>Slc38a3</i>	↓	↓		
Член 1 семейства 6 переносчиков растворенных веществ	<i>Slc6a1</i>				↓
Член 11 семейства 6 переносчиков растворенных веществ	<i>Slc6a11</i>		↑	↓	↓
Член 1 семейства 6 переносчиков растворенных веществ	<i>Slc6a12</i>		↓		
Член 13 семейства 6 переносчиков растворенных веществ	<i>Slc6a13</i>		↓		
Моторный белок кинезин 2	<i>Trak2</i>			↓	↓
Член 1 подсемейства С канала с транзиторным рецепторным катионным потенциалом	<i>Trpc1</i>			↓	↓

Примечание. Стрелка вверх – гены, экспрессия которых повышалась с возрастом, стрелка вниз – гены, экспрессия которых снижалась с возрастом.

что в гиппокампе крыс обеих линий с возрастом происходят изменения баланса между системами глутамат/ГАМК. Следует отметить, что в литературе информация об изменениях при старении и развитии БА уровня глутамата, ферментов его синтеза и деградации противоречива. В ряде работ сообщается о снижении уровня глутамата в передней поясной извилине, гиппокампе и других областях мозга при старении [18–22]. Другие авторы утверждают, что в головном мозге крыс изменений синтеза глутамата и глутаминина не происходит и оборот глутамата не меняется с возрастом, что подтверждается данными об отсутствии изменений активности глутаминсинтетазы [23, 24].

Как показали результаты настоящего исследования, уровень ключевых ферментов синтеза (нейрональной глутамининазы) и деградации (глиальной глутаминсинтетазы) глутамата не меняются с возрастом и не различаются у крыс ОХYS и Вистар, что указывает на стабильность его синтеза в гиппокампе крыс на протяжении всей жизни. При этом следует отметить, что отсутствие изменений уровня глутамата нельзя однозначно рассматривать как показатель стабильности глутаматергической

системы при старении и при развитии признаков БА. Эكсайтотоксичность глутамата опосредована главным образом нарушением системы его обратного захвата, следствием которого и становится высокое содержание глутамата в синаптических щелях и, как следствие, гиперактивация NMDA-рецепторов [25].

Таким образом, важным фактором, определяющим доступность глутамата для процессов передачи сигнала, является система его обратного захвата и рециркуляции. Глутамат не может проникать через гематоэнцефалический барьер и вырабатывается в основном нейронами и астроцитами. Тем не менее сами нейроны не способны синтезировать глутамат из глюкозы через цикл трикарбоновых кислот из-за отсутствия в них фермента пируваткарбоксилазы [15]. В связи с этим важную роль играет образование глутамата в астроцитах, которое происходит двумя путями: путем синтеза *de novo* в цикле трикарбоновых кислот (на него приходится ~15% глутамата) или путем «рециркуляции» глутаминина из ГАМК и глутамата с помощью обратного захвата нейромедиаторов [6]. В физиологических условиях астроциты удаляют ~90% всего высвобождае-

мого ЦНС глутамата с помощью переносчиков возбуждающих аминокислот GLAST и GLT-1, которые необходимы для поддержания низких нетоксичных концентраций этого нейромедиатора [26]. Как показало наше исследование, как у крыс Вистар, так и у крыс OXYS содержание белка GLAST в гиппокампе увеличивалось к возрасту 12 мес. и уменьшалось к 18 мес. Нам не удалось обнаружить возрастных изменений уровня GLT-1 у крыс Вистар, тогда как у крыс OXYS он значительно повысился с возраста 3 до 12 мес., что может указывать на изменение обратного захвата глутамата. Вероятно, это связано с накоплением к 12 мес. токсичных форм β -амилоида в гиппокампе крыс OXYS [9]. Стоит отметить, что в гиппокампе пациентов с БА также были обнаружены незначительные изменения в количестве GLT-1: сообщается, что пространственный паттерн экспрессии этого транспортера изменен, и повышенное иммуноокрашивание GLT-1 наблюдается в отростках астроцитов и в нейропиле, особенно в зонах CA1 и CA3 гиппокампа, а также в зубчатой извилине [27].

Рецепторы NMDA и AMPA присутствуют примерно в 70% синапсов головного мозга млекопитающих, преимущественно в коре головного мозга, миндалине, полосатом теле и гиппокампе. Специфическое расположение этих рецепторов имеет большое значение, поскольку глутаматергическая система играет важную роль не только в нейропластичности, но и в эксайтотоксичности [28]. Было показано, что с возрастом глутаматергическая система, опосредуемая NMDA-рецепторами, становится гипофункциональной, и этот дефицит может приводить к когнитивной дисфункции как при нормальном старении, так и при патологических состояниях [5]. Кроме этого, есть доказательства того, что с возрастом происходит уменьшение количества NMDA-рецепторов на постсинаптических окончаниях нейронов в гиппокампе [29, 30], что значительно снижает биодоступность глутамата [31]. Известно, что NMDA-рецепторы представляют собой гетеротетрамеры, состоящие из двух обязательных субъединиц NMDAR1 и двух регуляторных субъединиц GluN2 (A–D) или GluN3 (A или B), расположенных в основном в дендритах нейронов. Поскольку гиппокамп является областью мозга, регулирующей когнитивные функции, регуляторные субъединицы в основном представлены NMDA2A или NMDA2B (GluN2A и GluN2B соответственно) [32].

В этой работе мы оценили возрастные изменения содержания облигатной субъединицы

NMDAR1 и субъединицы NMDA2B, опосредующей эксайтотоксические эффекты глутамата в гиппокампе крыс [33]. Уровень белка NMDAR2B значимо не изменялся с возрастом и не различался у крыс Вистар и OXYS, тогда как уровень субъединицы NMDAR1 уменьшался с возрастом в гиппокампе крыс Вистар, но значимо не менялся у крыс OXYS. В результате к 18 мес. содержание NMDAR1 становилось значительно выше у крыс OXYS по сравнению с крысами Вистар. Стоит отметить, что аналогичные изменения уровня белка NMDAR1 были обнаружены у пациентов с БА [34]. Возможно, что повышение NMDAR1 в гиппокампе при БА является компенсаторным механизмом, поскольку сообщалось, что увеличение количества субъединиц NMDAR1 и NMDA2A, но не NMDA2B, связано с консолидацией и формированием пространственной памяти [34].

В гиппокампе рецепторы AMPA, локализованные в основном в нейронах, являются компонентом большинства возбуждающих синапсов, особенно в области CA1 (~80% всех рецепторов). Наиболее изученной субъединицей рецептора AMPA является GluA1 [35]. Более того, нарушение синаптической пластичности, связанное с GluA1, рассматривается многими авторами как одно из ключевых событий на ранних стадиях развития БА [36]. Наш анализ уровня GluA1 не выявил его существенных изменений с возрастом и при развитии признаков БА у крыс OXYS. Возможно, это обусловлено тем, что мы оценивали его во всем гиппокампе, тогда как изменения экспрессии GluA1 могут иметь разную направленность в разных областях этой структуры мозга [34, 35].

Раньше считалось, что ГАМКергические нейроны более устойчивы к патологическим воздействиям β -амилоида по сравнению с холинергическими или глутаматергическими нейронами [36]. В последние годы была выдвинута гипотеза, согласно которой дисбаланс возбуждения/торможения может вызывать ГАМКергическую дисфункцию, повышающую уязвимость нейронов к воздействию неблагоприятных внешних факторов и патологическому стрессу, способствуя нарушению функциональных связей в мозге при развитии БА [37]. В настоящем исследовании мы не выявили различий в содержании ГАМК в гиппокампе крыс OXYS и Вистар. Единственным прямым предшественником ГАМК в ЦНС является глутамат, из которого она преобразуется декарбоксилазой глутаминовой кислоты, или глутаматдекарбоксилазой (GAD).

В мозге млекопитающих GAD имеет две изоформы: GAD65 и GAD67 [38]. GAD65 преимущественно локализована на пресинаптических нервных окончаниях, в то время как GAD67 распределена по всей клетке. Следует отметить, что более 90% ГАМК в головном мозге синтезируется GAD67 [39, 40]. Мыши с нокаутом гена, кодирующего GAD67, умирают в течение недели после рождения, однако мыши с дефицитом экспрессии GAD67 жизнеспособны, хотя у них и отмечается аномальное поведение [41]. Напротив, мыши с нокаутом гена, кодирующего GAD65, выживают, но подвержены судорогам [42]. Дисфункция GAD67 связана с такими расстройствами головного мозга, как шизофрения [43], биполярное расстройство [44] и болезнь Паркинсона [45]. Сообщается, что экспрессия GAD67 не изменена в посмертных образцах ткани головного мозга пациентов с БА, но при этом остается не ясным, вовлечена ли GAD67 в прогрессию заболевания [46]. Также показано, что возраст и пол не влияют на экспрессию GAD67 в гиппокампе и коре мозга людей [47]. Согласно нашим данным, в гиппокампе крыс OXYS уровень GABA-T – фермента, ответственного за деградацию ГАМК в головном мозге и локализованного в основном в астроцитах – значительно ниже, в то время как уровень GAD67, которая катализирует образование ГАМК в нейронах, выше, чем у крыс Вистар. Эти результаты указывают на повышенный запрос на образование ГАМК в гиппокампе крыс OXYS. В то же время мы не выявили достоверных различий в содержании белка-переносчика ГАМК GAT1, который удаляет ГАМК из синаптической щели.

Ранее в экспериментах *in vitro* было показано, что нейротоксичность β -амилоида снижает активность ГАМКергических нейронов и ослабляет тормозные постсинаптические потенциалы путем подавления постсинаптических ГАМК-рецепторов [48, 49]. Однако в гиппокампе крыс OXYS уровень постсинаптического белка-рецептора ГАМК GABAAR1 в возрасте 3 мес. (в период манифестации признаков БА) и в период их активной прогрессии (12 мес.) был выше, чем у крыс Вистар. В гиппокампе уровень экспрессии GABAAR1 наиболее высок в зоне CA1, и, согласно ряду исследований, его экспрессия не изменяется с возрастом [50, 51]. Мы полагаем, что выявленное нами повышение экспрессии GABAAR1 в гиппокампе годовалых крыс OXYS может быть обусловлено нейродегенеративными изменениями, которые регистрируются у них уже в 3–5 мес. и с возрастом прогрессируют [52].

К возрасту 12 мес. в структурах мозга крыс OXYS происходит значительное накопление β -амилоида [9], которое мы рассматриваем как возможную причину повышения GABAAR1, однако это предположение нуждается в экспериментальной проверке в дальнейшем.

Для оценки изменений с возрастом глутаматергической и ГАМКергической систем и их возможного вклада в развитие признаков БА мы провели анализ экспрессии генов в гиппокампе крыс OXYS и Вистар разного возраста, используя данные RNA-Seq. Наш анализ выявил их значительные изменения с возрастом в гиппокампе крыс обеих линий, однако мы не обнаружили межлинейных различий. Таким образом, уровень мРНК генов, кодирующих компоненты сигнальных путей глутамата и ГАМК, не различаются между крысами Вистар и OXYS на всех стадиях развития признаков БА. Исключением, которое мы отметили, являются гены, кодирующие рецепторы глутамата (*Grin3b* и *Grm6*), глутаматдекарбоксилазу 2 (*Gad2*), субъединицу белка G (*Gng12*), семейство носителей растворенных веществ (*Slc1a1* и *Slc1a2*), фосфолипазу A2 (*Pla2g2d*, *Pla2g5* и *Pla2g6*), фосфолипазу C (*Plc11*), протенинфосфатазу 3 (*Ppp3r1*) и транспортирующий белок кинезин 2 (*Trak2*). Тем не менее изменения в экспрессии этих генов на разных стадиях нейродегенерации у крыс OXYS не позволили нам сформулировать какую-либо гипотезу о вкладе этих генов в патогенез БА. Напротив, у крыс обеих линий мы выявили явное зависимое от возраста снижение экспрессии генов, связанных с передачей сигналов глутамат/ГАМК.

В целом, наши результаты указывают на отсутствие изменений либо компенсаторную активацию в глутамат- и ГАМКергической системах при старении и развитии признаков БА у крыс OXYS, которые, вероятно, являются следствием развития нейродегенеративных процессов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Согласно Cox et al. [5], снижение глутаматергической передачи может быть использовано в качестве биомаркера перехода от физиологического к патологическому старению. Исходя из результатов нашего исследования, мы можем заключить, что в гиппокампе наблюдается значительное снижение передачи сигналов глутамата и ГАМК с возрастом у крыс Вистар, однако в гиппокампе крыс OXYS

не выявлено существенных изменений или компенсаторного повышения в этой системе при развитии нейродегенеративных процессов, характерных для БА. Исследование патогенеза БА осложняется гетерогенностью заболевания, различными патофизиологическими сценариями и существованием нескольких молекулярных подтипов заболевания [53]. Необходимы дальнейшие исследования для выявления изменений в балансе нейромедиаторных систем. Эти знания станут важным шагом на пути к персонализированной медицине для пациентов с этим нейродегенеративным заболеванием.

Вклад авторов. А.О. Бурняшева, Н.А. Стефанова – проведение экспериментов; А.О. Бурняшева, Н.А. Стефанова, Д.В. Телегина, Н.Г. Колосова – обсуждение результатов исследования; А.О. Бурняшева, Д.В. Телегина – написание текста; Н.Г. Колосова,

Н.А. Стефанова, Д.В. Телегина – редактирование текста статьи.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 19-15-00044).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Все проводимые исследования выполнялись на крысах-самцах линий OXYS и Вистар (контроль) на базе Центра коллективного пользования «Генофонды лабораторных животных» Института цитологии и генетики СО РАН в соответствии с этическими нормами Директивы Европейского союза 2010/63/EU от 22 сентября 2010 г. Все эксперименты были одобрены и проведены в соответствии с руководящими принципами этического комитета по испытаниям на животных в ИЦиГ СО РАН, Новосибирск, Россия (постановление № 12000-496 от 2 апреля 1980 г.).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Wang, R., and Reddy, P. H. (2017) Role of glutamate and NMDA receptors in Alzheimer's disease, *J. Alzheimers Dis.*, **57**, 1041-1048, doi: 10.3233/JAD-160763.
2. Selkoe, D. J., and Hardy, J. (2016) The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease at 25 years, *EMBO Mol. Med.*, **8**, 595-608, doi: 10.15252/emmm.201606210.
3. Wyss-Coray, T. (2016) Ageing, neurodegeneration and brain rejuvenation, *Nature*, **539**, 180-186, doi: 10.1038/nature20411.
4. Polanco, J. C., Li, C., Bodea, L. G., Martinez-Marmol, R., Meunier, F. A., and Götz, J. (2017) Amyloid- β and tau complexity – towards improved biomarkers and targeted therapies, *Nat. Rev. Neurol.*, **14**, 22-39, doi: 10.1038/nrneurol.2017.162.
5. Cox, M. F., Hascup, E. R., Bartke, A., and Hascup, K. N. (2022) Friend or foe? Defining the role of glutamate in aging and Alzheimer's disease, *Front. Aging*, **3**, 929474, doi: 10.3389/fragi.2022.929474.
6. Hampe, C. S., Mitoma, H., and Manto, M. (2018) GABA and glutamate: their transmitter role in the CNS and pancreatic islets, in *GABA and Glutamate – New Developments in Neurotransmission Research*, IntechOpen, Book Chapter 5, pp. 65-90, doi: 10.5772/intechopen.70958.
7. Sears, S. M. S., and Hewett, S. J. (2021) Influence of glutamate and GABA transport on brain excitatory/inhibitory balance, *Exp. Biol. Med. (Maywood)*, **246**, 1069-1083, doi: 10.1177/1535370221989263.
8. Kolosova, N. G., Stefanova, N. A., Korbolina, E. E., Fursova, A. Z., and Kozhevnikova, O. S. (2014) Senescence-accelerated OXYS rats: a genetic model of premature aging and age-related diseases, *Adv. Gerontol.*, **27**, 336-340, doi: 10.1134/S2079057014040146.
9. Stefanova, N. A., Muraleva, N. A., Korbolina, E. E., Kiseleva, E., Maksimova, K. Y., and Kolosova, N. G. (2015) Amyloid accumulation is a late event in sporadic Alzheimer's disease-like pathology in nontransgenic rats, *Oncotarget*, **6**, 1396-1413, doi: 10.18632/oncotarget.2751.
10. Kolosova, N. G., Kozhevnikova, O. S., Muraleva, N. A., Rudnitskaya, E. A., Rumyantseva, Y. V., Stefanova, N. A., Telegina, D. V., Tyumentsev, M. A., Fursova, A. Z. (2022) SkQ1 as a tool for controlling accelerated senescence program: experiments with OXYS rats, *Biochemistry (Moscow)*, **87**, 1552-1562, doi: 10.1134/S0006297922120124.
11. Stefanova, N. A., Maksimova, K. Y., Kiseleva, E., Rudnitskaya, E. A., Muraleva, N. A., and Kolosova, N. G. (2015) Melatonin attenuates impairments of structural hippocampal neuroplasticity in OXYS rats during active progression of Alzheimer's disease-like pathology, *J. Pineal. Res.*, **59**, 163-177, doi: 10.1111/JPI.12248.
12. Telegina, D. V., Antonenko, A. K., Fursova, A. Z., and Kolosova, N. G. (2022) The glutamate/GABA System in the retina of male rats: effects of aging, neurodegeneration, and supplementation with melatonin and antioxidant SkQ1, *Biogerontology*, **23**, 571-585, doi: 10.1007/s10522-022-09983-w.

13. Stefanova, N. A., and Kolosova, N. G. (2023) The rat brain transcriptome: from infancy to aging and sporadic Alzheimer's disease-like pathology, *Int. J. Mol. Sci.*, **24**, 1462, doi: 10.3390/ijms24021462.
14. Stefanova, N. A., Maksimova, K. Y., Rudnitskaya, E. A., Muraleva, N. A., and Kolosova, N. G. (2018) Association of cerebrovascular dysfunction with the development of Alzheimer's disease-like pathology in OXYS rats, *BMC Genomics*, **19**, 51-63, doi: 10.1186/S12864-018-4480-9.
15. Magi, S., Piccirillo, S., Amoroso, S., and Lariccia, V. (2019) Excitatory amino acid transporters (EAATs): glutamate transport and beyond, *Int. J. Mol. Sci.*, **20**, 5674, doi: 10.3390/ijms20225674.
16. Pajarillo, E., Rizor, A., Lee, J., Aschner, M., Lee, E. (2019) The role of astrocytic glutamate transporters GLT-1 and GLAST in neurological disorders: Potential targets for neurotherapeutics, *Neuropharmacology*, **161**, 1-37, doi: 10.1016/j.neuropharm.2019.03.002.
17. Snytnikova, O., Telegina, D., Savina, E., Tsentalovich, Y., and Kolosova, N. (2023) Quantitative metabolomic analysis of the rat hippocampus: effects of age and of the development of Alzheimer's disease-like pathology, *J. Alzheimer's Disease*, doi: 10.3233/JAD-230706, in press.
18. Schubert, F., Gallinat, J., Seifert, F., and Rinneberg, H. (2004) Glutamate concentrations in human brain using single voxel proton magnetic resonance spectroscopy at 3 Tesla, *NeuroImage*, **21**, 1762-1771, doi: 10.1016/j.neuroimage.2003.11.014.
19. Kaiser, L.G., Schuff, N., Cashdollar, N., and Weiner, M. W. (2005) Age-related glutamate and glutamine concentration changes in normal human brain: 1H MR spectroscopy study at 4 T, *Neurobiol. Aging*, **26**, 665-672, doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2004.07.001.
20. Chang, L., Jiang, C. S., and Ernst, T. (2009) Effects of age and sex on brain glutamate and other metabolites, *Magn. Reson. Imaging*, **27**, 142-145, doi: 10.1016/j.mri.2008.06.002.21.
21. Huang, D., Liu, D., Yin, J., Qian, T., Shrestha, S., and Ni, H. (2017) Glutamate-glutamine and GABA in brain of normal aged and patients with cognitive impairment, *Eur. Radiol.*, **27**, 2698-2705, doi: 10.1007/S00330-016-4669-8.
22. Rozycka, A., Charzynska, A., Misiewicz, Z., Maciej Stepniewski, T., Sobolewska, A., Kossut, M., and Liguz-Leczna, M. (2019) Glutamate, GABA, and presynaptic markers involved in neurotransmission are differently affected by age in distinct mouse brain regions, *ACS Chem. Neurosci.*, **10**, 4449-4461, doi: 10.1021/acschemneuro.9b00220.
23. Segovia, G., Porrás, A., Del Arco, A., and Mora, F. (2001) Glutamatergic neurotransmission in aging: a critical perspective, *Mech. Ageing Dev.*, **122**, 1-29, doi: 10.1016/S0047-6374(00)00225-6.
24. Dong, Y., and Brewer, G. J. (2019) Global metabolic shifts in age and Alzheimer's disease mouse brains pivot at NAD⁺/NADH redox sites, *J. Alzheimer's Dis.*, **71**, 119-140, doi: 10.3233/JAD-190408.
25. Mira, R. G., and Cerpa, W. (2020) Building a bridge between NMDAR-mediated excitotoxicity and mitochondrial dysfunction in chronic and acute diseases, *Cell. Mol. Neurobiol.*, **41**, 1413-1430, doi: 10.1007/S10571-020-00924-0.
26. Rodríguez-Giraldo, M., González-Reyes, R. E., Ramírez-Guerrero, S., Bonilla-Trilleras, C. E., Guardo-Maya, S., and Nava-Mesa, M. O. (2022) Astrocytes as a therapeutic target in Alzheimer's disease-comprehensive review and recent developments, *Int. J. Mol. Sci.*, **23**, 13630, doi: 10.3390/ijms232113630.
27. Yeung, J. H. Y., Palpagama, T. H., Wood, O. W. G., Turner, C., Waldvogel, H. J., Faull, R. L. M., and Kwakowsky, A. (2021) EAAT2 expression in the hippocampus, subiculum, entorhinal cortex and superior temporal gyrus in Alzheimer's disease, *Front. Cell. Neurosci.*, **15**, 702824, doi: 10.3389/fncel.2021.702824.
28. Babaei, P. (2021) NMDA and AMPA receptors dysregulation in Alzheimer's disease, *Eur. J. Pharmacol.*, **908**, 174310, doi: 10.1016/j.ejphar.2021.174310.
29. Kumar, A. (2015) NMDA receptor function during senescence: implication on cognitive performance, *Front. Neurosci.*, **9**, 473, doi: 10.3389/fnins.2015.00473.
30. Kumar, A., and Foster, T. C. (2018) Alteration in NMDA receptor mediated glutamatergic neurotransmission in the hippocampus during senescence, *Neurochem. Res.*, **44**, 38-48, doi: 10.1007/S11064-018-2634-4.
31. Avila, J., Llorens-Martín, M., Pallas-Bazarrá, N., Bolos, M., Perea, J. R., Rodríguez-Matellán, A., and Hernandez, F. (2017) Cognitive decline in neuronal aging and Alzheimer's disease: role of NMDA receptors and associated proteins, *Front. Neurosci.*, **11**, 626, doi: 10.3389/fnins.2017.00626.
32. Cercato, M. C., Vázquez, C. A., Kornisiuk, E., Aguirre, A. I., Colettis, N., Snitkofsky, M., Jerusalinsky, D. A., and Baez, M. V. (2017) GluN1 and GluN2A NMDA receptor subunits increase in the hippocampus during memory consolidation in the rat, *Front. Behav. Neurosci.*, **10**, 242, doi: 10.3389/fnbeh.2016.00242.
33. Ge, Y., and Wang, Y. T. (2023) GluN2B-containing NMDARs in the mammalian brain: pharmacology, physiology, and pathology, *Front. Mol. Neurosci.*, **16**, 1190324, doi: 10.3389/fnmol.2023.1190324.
34. Yeung, J. H. Y., Walby, J. L., Palpagama, T. H., Turner, C., Waldvogel, H. J., Faull, R. L. M., and Kwakowsky, A. (2021) Glutamatergic receptor expression changes in the Alzheimer's disease hippocampus and entorhinal cortex, *Brain Pathol.*, **31**, e13005, doi: 10.1111/BPA.13005.
35. Qu, W., Yuan, B., Liu, J., Liu, Q., Zhang, X., Cui, R., Yang, W., and Li, B. (2021) Emerging role of

- AMPA receptor subunit GluA1 in synaptic plasticity: implications for Alzheimer's disease, *Cell Prolif.*, **54**, e12959, doi: 10.1111/cpr.12959.
36. Li, Y., Sun, H., Chen, Z., Xu, H., Bu, G., and Zheng, H. (2016) Implications of GABAergic neurotransmission in Alzheimer's disease, *Front. Aging Neurosci.*, **8**, 31, doi: 10.3389/fnagi.2016.00031.
37. Bi, D., Wen, L., Wu, Z., and Shen, Y. (2020) GABAergic dysfunction in excitatory and inhibitory (E/I) imbalance drives the pathogenesis of Alzheimer's disease, *Alzheimers Dement.*, **16**, 1312-1329, doi: 10.1002/alz.12088.
38. Lee, S. E., Lee, Y., and Lee, G. H. (2019) The regulation of glutamic acid decarboxylases in GABA neurotransmission in the brain, *Arch. Pharm. Res.*, **42**, 1031-1039, doi: 10.1007/s12272-019-01196-z.
39. Chattopadhyaya, B., Di Cristo, G., Wu, C. Z., Knott, G., Kuhlman, S., Fu, Y., Palmiter, R. D., and Huang, Z. J. (2007) GAD67-mediated GABA synthesis and signaling regulate inhibitory synaptic innervation in the visual cortex, *Neuron*, **54**, 889-903, doi: 10.1016/j.neuron.2007.05.015.
40. Lau, C. G., and Murthy, V. N. (2012) Activity-dependent regulation of inhibition via GAD67, *J. Neurosci.*, **32**, 8521-8531, doi: 10.1523/JNEUROSCI.1245-12.2012.
41. Sandhu, K. V., Lang, D., Müller, B., Nullmeier, S., Yanagawa, Y., Schwegler, H., and Stork, O. (2014) Glutamic acid decarboxylase 67 haplodeficiency impairs social behavior in mice, *Genes Brain Behav.*, **13**, 439-450, doi: 10.1111/GBB.12131.
42. Kash, S. F., Johnson, R. S., Tecott, L. H., Noebels, J. L., Mayfield, R. D., Hanahan, D., and Baekkeskov, S. (1997) Epilepsy in mice deficient in the 65-KDa isoform of glutamic acid decarboxylase, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 14060-14065, doi: 10.1073/PNAS.94.25.14060.
43. Toritsuka, M., Yoshino, H., Makinodan, M., Ikawa, D., Kimoto, S., Yamamuro, K., Okamura, K., Akamatsu, W., Okada, Y., Matsumoto, T., Hashimoto, K., Ogawa, Y., Saito, Y., Watanabe, K., Aoki, C., Takada, R., Fukami, S. I., Hamano-Iwasa, K., Okano, H., and Kishimoto, T. (2021) Developmental dysregulation of excitatory-to-inhibitory GABA-polarity switch may underlie schizophrenia pathology: a monozygotic-twin discordant case analysis in human IPS cell-derived neurons, *Neurochem. Int.*, **150**, e105179, doi: 10.1016/J.NEUINT.2021.105179.
44. Benes, F. M., Lim, B., Matzilevich, D., Walsh, J. P., Subburaju, S., and Minns, M. (2007) Regulation of the GABA cell phenotype in hippocampus of schizophrenics and bipolars, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**, 10164-10169, doi: 10.1073/pnas.0703806104.
45. Lanoue, A. C., Dumitriu, A., Myers, R. H., Soghomonian, J. J. (2010) Decreased glutamic acid decarboxylase mRNA expression in prefrontal cortex in Parkinson's disease, *Exp. Neurol.*, **226**, 207-217, doi: 10.1016/j.expneurol.2010.09.001.
46. Wang, Y., Wu, Z., Bai, Y. T., Wu, G. Y., and Chen, G. (2017) Gad67 haploinsufficiency reduces amyloid pathology and rescues olfactory memory deficits in a mouse model of Alzheimer's disease, *Mol. Neurodegener.*, **12**, 73, doi: 10.1186/s13024-017-0213-9.
47. Ethiraj, J., Palpagama, T. H., Turner, C., van der Werf, B., Waldvogel, H. J., Faull, R. L. M., and Kwakowsky, A. (2021) The effect of age and sex on the expression of GABA signaling components in the human hippocampus and entorhinal cortex, *Sci. Rep.*, **11**, 21470, doi: 10.1038/s41598-021-00792-8.
48. Krantic, S., Isorce, N., Mechawar, N., Davoli, M. A., Vignault, E., Albuquerque, M., Chabot, J. G., Moysse, E., Chauvin, J. P., Aubert, I., McLaurin, J., and Quirion, R. (2012) Hippocampal GABAergic neurons are susceptible to amyloid- β Toxicity *in vitro* and are decreased in number in the Alzheimer's disease TgCRND8 mouse model, *J. Alzheimers Dis.*, **29**, 293-308, doi: 10.3233/JAD-2011-110830.
49. Ulrich, D. (2015) Amyloid- β impairs synaptic inhibition via GABAA receptor endocytosis, *J. Neurosci.*, **35**, 9205-9210, doi: 10.1523/JNEUROSCI.0950-15.2015.
50. Palpagama, T. H., Sagniez, M., Kim, S., Waldvogel, H. J., Faull, R. L., and Kwakowsky, A. (2019) GABAA receptors are well preserved in the hippocampus of aged mice, *eNeuro*, **6**, 1-13, doi: 10.1523/ENEURO.0496-18.2019.
51. Rissman, R. A., and Mobley, W. C. (2011) Implications for treatment: GABAA receptors in aging, down syndrome and Alzheimer's disease, *J. Neurochem.*, **117**, 613-622, doi: 10.1111/J.1471-4159.2011.07237.X.
52. Stefanova, N. A., Kozhevnikova, O. S., Vitovtov, A. O., Maksimova, K. Y., Logvinov, S. V., Rudnitskaya, E. A., Korbolina, E. E., Muraleva, N. A., and Kolosova, N. G. (2014) Senescence-accelerated OXYS rats: a model of age-related cognitive decline with relevance to abnormalities in Alzheimer disease, *Cell Cycle*, **13**, 898-909, doi: 10.4161/CC.28255.
53. Neff, R. A., Wang, M., Vatansever, S., Guo, L., Ming, C., Wang, Q., Wang, E., Horgusluoglu-Moloch, E., Song, W. M., Li, A., Castranio, E. L., Tcw, J., Ho, L., Goate, A., Fossati, V., Noggle, S., Gandy, S., Ehrlich, M. E., Katsel, P., Schadt, E., Cai, D., Brennand, K. J., Haroutunian, V., and Zhang, B. (2021) Molecular subtyping of Alzheimer's disease using RNA sequencing data reveals novel mechanisms and targets, *Sci. Adv.*, **7**, eabb5398, doi: 10.1126/sciadv.abb5398.

CHANGES IN THE GLUTAMATE/GABA SYSTEM IN THE HIPPOCAMPUS OF RATS WITH AGE AND DURING THE ALZHEIMER'S DISEASE SIGNS DEVELOPMENT

A. O. Burnyasheva, N. A. Stefanova, N. G. Kolosova*, and D. V. Telegina

*Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences,
Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences,
630090 Novosibirsk, Russia; e-mail: kolosova@bionet.nsc.ru*

GABA and glutamate are the most abundant neurotransmitters in the CNS and play a pivotal part in synaptic stability/plasticity. Glutamate and GABA homeostasis is important for healthy aging and reducing the risk of various neurological diseases, while long-term imbalance can contribute to the development of neurodegenerative disorders, including Alzheimer's disease (AD). Its normalization discussed as a promising strategy for the prevention and/or treatment of AD, however, data on changes in the GABAergic and glutamatergic systems in with age, as well as in the dynamics of AD development, are limited. It is not clear whether the imbalance of the excitatory/inhibitory systems is a cause or a consequence of the development of the disease. Here we analyzed age-related alterations of the expression of glutamate, GABA, and enzymes that synthesize them (glutaminase, glutamine synthetase, GABA-T, and GAD67), transporters (GLAST, GLT-1, and GAT1), and relevant receptors (GluA1, NMDAR1, NMDA2B, and GABAAr1) in the whole hippocampus of Wistar rats and of senescence-accelerated OXYS rats, a model of the most common (> 95%) sporadic AD. Our results suggest that there is a decline of glutamate and GABA signaling with aging in the hippocampus of the both rat strains. However, we have not identified significant changes or compensatory enhancements in this system in the hippocampus of OXYS rats during development of neurodegenerative processes that are characteristic of AD.

Keywords: aging, Alzheimer's disease, glutamate, GABA, hippocampus, OXYS rats