

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ
РАБОТЫ

УДК 577.2+616.8-092+612.821(082)

**НЕЙРОХИМИЧЕСКИЕ И ПОВЕДЕНЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ
ДЕЙСТВИЯ ПРЕФИБРИЛЯРНЫХ ОЛИГОМЕРНЫХ СТРУКТУР
 α -СИНУКЛЕИНА У ВЗРОСЛЫХ МЫШЕЙ**

© 2020 г. М. А. Грудень^{1,*}, О. А. Соловьева¹, В. С. Кудрин²,
В. Б. Наркевич², В. В. Шерстнев¹

¹ФГБНУ “НИИ нормальной физиологии им. П.К. Анохина”, Москва, Россия

²ФГБНУ “НИИ фармакологии им. В.В. Закусова”, Москва, Россия

Поступила в редакцию 13.06.2019 г.

После доработки 24.06.2019 г.

Принята к публикации 05.07.2019 г.

Префибрилярные олигомерные структуры белка α -синуклеина, образующиеся при его мисфолдинге, играют важную роль в процессах молекулярного патогенеза болезни Паркинсона и других зависимых от возраста нейродегенеративных заболеваний. Проведено исследование влияния токсических олигомеров α -синуклеина, вводимых интраназально в течение 14-ти дней, на двигательную активность, обучение, память и тревожность взрослых (6-месячных) самцов мышей C57Bl/6, а также на содержание и обмен моноаминов и нейромедиаторных аминокислот в гиппокампе и фронтальной коре мозга. В работе использовали модели “Открытое поле”, “Условная реакция пассивного избегания” и “Приподнятый крестообразный лабиринт”. Содержание моноаминов и их метаболитов, а также нейромедиаторных аминокислот в ткани мозга животных определяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с электрохимической детекцией. Обнаружено, что олигомеры α -синуклеина вызывают у взрослых мышей повышение тревожности, выраженное снижением содержания дофамина и разнонаправленное изменение уровня его метаболитов в гиппокампе и фронтальной коре. Значимых изменений показателей обучения и долговременной памяти, двигательной активности животных, а также содержания норадреналина, серотонина и нейромедиаторных аминокислот в изученных структурах мозга при действии олигомеров α -синуклеина не документировано. Выполнен сравнительный анализ экспериментальных данных, полученных в работе, и результатов проведенных нами ранее исследований поведенческих и нейрохимических эффектов олигомерных структур белка у стареющих 12-месячных мышей. Обсуждаются возможные механизмы выявленных в наших исследованиях зависимых от возраста эффектов олигомеры α -синуклеина.

Ключевые слова: олигомеры α -синуклеина, дофамин, нейромедиаторы, поведение, гиппокамп, фронтальная кора, взрослые и стареющие мыши, болезнь Паркинсона

DOI: 10.31857/S1027813320010094

ВВЕДЕНИЕ

Согласно современным представлениям болезнь Паркинсона (БП) является возрастзависимым мультисистемным нейродегенеративным заболеванием. БП характеризуется широкой распространенностью в популяции, ростом заболеваемости с возрастом и, что особенно важно, прогрессирующим “омоложением” [1–3]. Считают, что в основе развития БП лежат гиперэкспрессия и нарушение конформации белка α -синуклеина (α -син) с образованием нейротоксических амилоидогенных форм, инициирующих нейродегенеративный процесс с

определенным временным градиентом распространения по мозгу, который охватывает не только дофаминергическую, но и серотонинергическую, норадреналинергическую, ацетилхолинергическую, глутаматергическую и ГАМК-ергическую системы, вызывая гибель определенных популяций нервных клеток в различных структурах мозга, что обуславливает спектр характерных двигательных и недвигательных симптомов. На начальном этапе происходит деградация пресинаптических терминалей и нарушение процессов синаптической нейротрансмиссивной передачи, что обуславливает развитие ранних немоторных проявлений при БП [4–6]. Таким образом, исследование возрастных особенностей двигательных и недвигательных нарушений, сопряженных с изменением

* Адресат для корреспонденции: 125315 Россия, Москва, ул. Балтийская, д. 8; тел.: 8(495)601-21-30; e-mail: mgruden@mail.ru.

содержания и обмена нейромедиаторов в церебральных структурах при мисфолдинге α -син и действию его нейротоксических конформаций, представляет значимый интерес для понимания механизмов формирования и развития БП и других возрастзависимых нейродегенеративных заболеваний.

Ранее нами была разработана оригинальная экспериментальная модель сходных с БП патологических состояний, основанная на инокуляции в нос стареющим мышам конформационных агрегатов α -син (олигомеров и/или фибрилл), что вызывало взаимосвязанные процессы, ассоциированные с характерным изменением нейрохимического паттерна мозга и нарушения двигательной активности животных [7]. В дальнейших экспериментах, выполненных на 12-месячных мышах, были документированы сопряженные с моторными проявлениями (ригидность, гипокинезия и неподвижность) изменения содержания дофамина (DA), серотонина (5-НТ), норадреналина (НА), а также их метаболитов в черной субстанции (ЧС) и стриатуме (Ст) в условиях хронического интраназального введения указанных агрегированных форм α -син либо их композиционной смеси [8, 9]. У стареющих животных при хроническом интраназальном введении олигомеров α -син были выявлены нарушения долговременной памяти и повышение тревожности, а также уменьшение числа DA нейронов в компактной части ЧС мозга и нарушение нейрогенеза в зубчатой фасции гиппокампа [10].

Целью настоящей работы явилось изучение эффектов олигомеров α -син при хроническом интраназальном введении на двигательную активность и тревожность взрослых 6-ти месячных мышей, а также содержание и обмен моноаминов и медиаторных аминокислот в гиппокампе и фронтальной коре мозга.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Работа проведена на 20 самцах мышей линии C57Bl/6 в возрасте 6-ти мес. и массой 26.5 ± 1.2 г. (ФГБУН НЦБМТ ФМБА питомник “Столбовая”, Россия). Мыши содержались по 5 особей в клетках в стандартных условиях вивария со сменной темной и светлой фаз суток 12/12 ч при свободном доступе к пище и воде. Все манипуляции с животными были проведены с соблюдением требований, изложенных в директиве по охране животных, используемых в научных целях (2010/63/ EU от 22 сентября 2010 г.), а также в соответствии с правилами, утвержденными комиссией по биоэтике ФГБНУ “Научно-исследовательский институт нормальной физиологии им. П.К. Анохина”. Мышам двух групп вводили поочередно в каждую ноздрю раствор префибрилярных агрегатов-олигомеров α -син (8 мкл,

0.48 мг/кг, $n = 10$) либо физиологический раствор (ФР, 8 мкл, $n = 10$) ежедневно в интервале времени 10.00–14.00 в течение 14-ти дней.

Поведенческое тестирование включало оценку двигательной активности в тесте “Открытое поле” (ОП), долговременной памяти при формировании условной реакции пассивного избегания (УРПИ) и тревожности (“Приподнятый крестообразный лабиринт”, ПКЛ) [10]. На 15-е сут исследования животных однократно поместили в установку ОП (5 мин – адаптация, с 6-ой по 11-ю мин – тестирование). На 18-й день формировали УРПИ (тест через 24 ч) в установке PACS Shuttle Box (Columbus Instruments, Огайо, США). На 22-ые сут животных на протяжении 5 мин тестировали в ПКЛ (Columbus Instruments, Огайо, США). Во время обучения и тестирования в ОП и ПКЛ поведение мышей записывали с помощью видеокamеры CNB-BVB-31F (CNB Technology Inc., Корея). Для анализа видео файлов использовали программу Ethovision XT 8.5 (Noldus, Голландия). На основе полученных траекторий пути передвижения определяли количество посещений животного каждой зоны интереса (ОП: центр, периферия и углы установки, ПКЛ: открытые и закрытые рукава и центр) и общее время пребывания в ней, также оценивали среднюю скорость движения и пройденный путь. Латентное время (ЛВ) перехода в освещенный отсек при формировании и тестировании УРПИ определяли с помощью компьютерной программы PACS 30 Shuttle Box v. 3.13.

Через 24 ч по окончании поведенческих экспериментов всех животных декапитировали, извлекали мозг и выделяли на холоде образцы гиппокампа и фронтальной коры мозга, которые замораживали в жидком азоте. Далее в полученных образцах церебральных структур определяли содержания биогенных аминов: DA, 5-НТ, НА и метаболитов DA (DOPAC, HVA, 3-MT), 5-НТ (5-HIAA), а также концентрации нейромедиаторных аминокислот: Asp, глутамата Glu, глицина Gly, Tau, GABA. Уровень нейромедиаторов определяли в структурах мозга мышей методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЖХ) с электрохимической детекцией (ВЭЖХ/ЭД) на хроматографе LC-304T (BAS, West Lafayette, США) с инжектором Rheodyne 7125, с объемом петли для нанесения образцов в 20 мкл [8]. Величины концентрации моноаминов в опытных образцах рассчитывали методом “внутреннего стандарта”, исходя из отношений площадей пиков в стандартной смеси и в экспериментальном образце, и выражали в нмоль/г ткани. Содержание нейромедиаторных аминокислот определяли методом ВЭЖХ/ЭД согласно стандартной методике [11]. В качестве стандартной смеси для калибровки колонки с сорбентом использовали раствор смеси аспарагиновой, глутаминовой кислот, глицина, таурина и ГАМК в концентрации 0.1 мкМ/мл в 0.1 н HClO₄. Величи-

ны концентрации нейромедиаторных аминокислот выражали в ммоль/г ткани.

Олигомеры α -син были получены и охарактеризованы по описанному ранее протоколу [7], нейротрансмиттеры – дофамин (dopamine, DA), его метаболиты (3,4-Dihydroxyphenylacetic acid, DOPAC; homovanillic acid, HVA; 3-Methoxytyramine, 3-МТ), норадреналин (NA), серотонин (5-hydroxytryptamine, serotonin, 5-НТ) и его метаболит (5-hydroxyindoleacetic acid, 5-НИАА), а также нейромедиаторные аминокислоты – аспарат (Asp), глутамат (Glu), глицин (Gly), таурин (Tau), ГАМК (GABA) были получены (Sigma, St. Louis, MO, USA).

Статистический анализ результатов поведенческих экспериментов осуществляли с помощью программ SPSS Statistics 17.0 (SPSS Inc., США) и Statistica 7.0. Показатели сравнивали с помощью теста Манна–Уитни для двух независимых выборок и теста Вилкоксона для зависимых выборок. Данные представлены как средние значения и стандартная погрешность измерения. Различия считали статистически значимыми при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

При изучении поведенческих эффектов олигомеров α -син обнаружено, что общая двигательная активность экспериментальных мышей по сравнению с контрольными достоверно не изменилась. Средняя скорость движения экспериментальных мышей в ОП не отличалась от скорости контрольных животных (адаптация: олигомеры α -син: 5.0 ± 0.6 см/с, ФР: 5.8 ± 0.4 см/с, тест Манна–Уитни, $U = 19.00$, $Z = -1.042$, $p = 0.298$; тест: олигомеры α -син: 3.8 ± 0.7 см/с, ФР: 4.7 ± 0.4 см/с, тест Манна–Уитни, $U = 28.00$, $Z = 0$, $p = 1$). Пройденное исследованными группами животных расстояние также статистически значимо не различалось (адаптация: олигомеры α -син: 1494.4 ± 173.1 см, ФР: 1731.1 ± 122 см, $U = 19.00$, $Z = -1.042$, $p = 0.298$; тест: олигомеры α -син: 1359.3 ± 253.4 см, ФР: 1669.6 ± 135.6 см, $U = 28.00$, $Z = 0$, $p = 1$).

В ПКЛ средняя скорость движения (олигомеры α -син: 4.4 ± 0.9 см/с, ФР: 5.1 ± 0.6 см/с, $U = 19.00$, $Z = -0.645$, $p = 0.519$) и длина пути, пройденного за 5 мин (олигомеры α -син: 1312.0 ± 281.0 см, ФР: 1515.3 ± 173.6 см, $U = 19.00$, $Z = -0.645$, $p = 0.519$) не различались у мышей из экспериментальной и контрольных групп.

При формировании УРПИ среднее ЛВ перехода в темный отсек не различалось между группами мышей (олигомеры α -син: 27.7 ± 7.4 см, ФР: 31.0 ± 11.0 см, $U = 20.5$, $Z = -0.453$, $p = 0.651$). Через 24 ч после обуславливания среднее ЛВ перехода в темный отсек у экспериментальных мышей было в 2 раза меньше по сравнению с контрольными (олигомеры α -син: 113.2 ± 44.4 см, ФР: 225.8 ± 38.6 см,

$U = 10.5$, $Z = -1.814$, $p = 0.07$), однако из-за большого разброса показателей различия не достигли статистической значимости. У экспериментальных животных не было отмечено статистически значимых различий между ЛВ обуславливания и ЛВ тестирования (тест Вилкоксона, $Z = -1.892$, $p = 0.058$), у контрольных – были ($Z = -2.521$, $p = 0.012$). При тестировании в ОП не выявлено достоверных различий в двигательной активности между группами мышей в центре установки (4 квадранта из 16) (адаптация: олигомеры α -син: 54.7 ± 8.9 с, ФР: 69.6 ± 9.2 с, $U = 16.00$, $Z = -1.389$, $p = 0.165$; тест: олигомеры α -син: 58.1 ± 5.5 с, ФР: 68.4 ± 8.1 см/с, $U = 16.00$, $Z = -1.389$, $p = 0.165$). Животные, получавшие олигомеры, больше времени провели на периферии установки (остальные 12 квадрантов установки) в течение последних 6 минут, по сравнению с первыми 5 (адаптация: 239.4 ± 7.9 с, тест: 297.2 ± 5.6 с, тест Вилкоксона, $Z = -2.366$, $p = 0.018$), а также в углах установки (квадранты z1, z4, z13, z16) (адаптация: 88.1 ± 13.0 с, тест: 143.2 ± 18.8 с, $Z = -2.028$, $p = 0.043$). У контрольных мышей не обнаружено значимых различий в нахождении на периферии (адаптация: 222.1 ± 9.1 с, тест: 272.1 ± 17.2 с, $Z = -1.82$, $p = 0.069$) и в углах ОП (адаптация: 68.2 ± 5.2 с, тест: 95.3 ± 13.6 с, $Z = -1.12$, $p = 0.263$).

В тесте ПКЛ между экспериментальной и контрольной группами мышей выявлены достоверные различия в длительности нахождения в открытых (олигомеры α -син: 13.5 ± 4.7 с, ФР: 57.0 ± 17.0 с, $U = 5.00$, $Z = -2.453$, $p = 0.014$) и закрытых рукавах лабиринта (олигомеры α -син: 257.3 ± 11.1 с, ФР: 204.3 ± 19.7 с, $U = 6.00$, $Z = -2.324$, $p = 0.020$). Количество входов в открытые рукава ПКЛ было на уровне тенденции ниже в группе мышей, которым вводили олигомеры α -син, по сравнению с контролем (олигомеры α -син: 6.8 ± 2.3 , ФР: 15.3 ± 3.2 , $U = 9.00$, $Z = -1.945$, $p = 0.052$), тогда как различия в количестве входов в закрытые рукава были не значимы ($p > 0.2$) (рис. 1). Полученные данные указывают на повышение уровня тревожности у животных, получавших интраназально олигомеры α -син по сравнению с мышами, которым вводили ФР.

Нейрохимический анализ выявил следующие особенности содержания моноаминов и их метаболитов в гиппокампе и фронтальной коре мозга мышей, которым интраназально вводили олигомеры α -син. Так, документировано, что в гиппокампе экспериментальных животных содержание DA снижается на 42.5% ($p < 0.05$), а также наблюдается снижение уровня его метаболитов, HVA и 3-МТ на 28.2 и 52% ($p < 0.05$) соответственно, при неизменном содержании DOPAC (табл. 1, рис. 2). Эффекты олигомеров α -син сопряжены со снижением коэффициента обмена DA–DOPAC/DA на 47.1% ($p < 0.05$) в гиппокампе по сравнению с контролем (рис. 3). Вместе с тем введение олигоме-

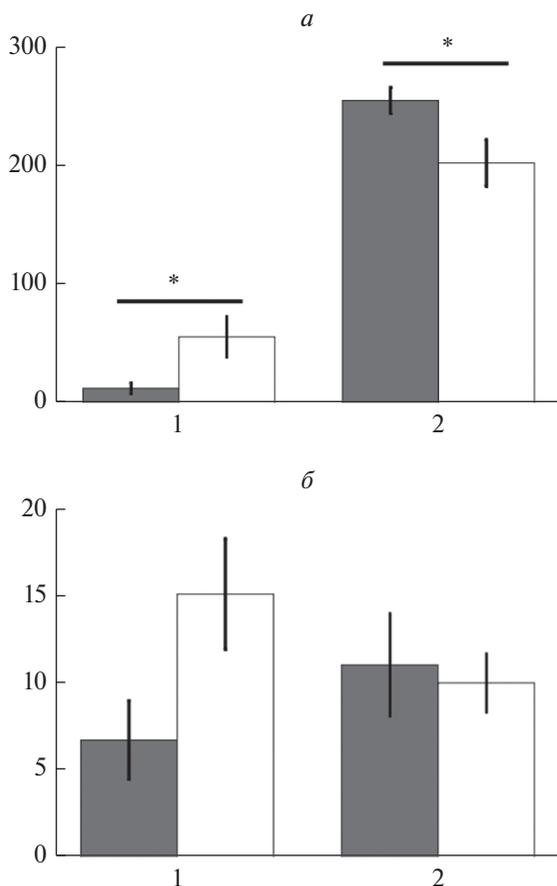


Рис. 1. Влияние хронического интраназального введения олигомеров α-синуклеина на длительность и количество входов в закрытые и открытые рукава “Приподнятого крестообразного лабиринта” у 6-месячных мышей по сравнению с контролем. По оси абсцисс: 1 – открытые рукава ПКЛ, 2 – закрытые рукава. По оси ординат: длительность нахождения в рукавах, с (а), количество входов в рукава (б). Серый столбик – олигомеры α-син, незакрашенный столбик – ФР. Данные представлены как $M \pm SEM$. * – $p < 0.05$, сравнение экспериментальной и контрольной групп мышей по критерию Манна–Уитни.

ров не вызывает достоверных изменений показателей обмена других нейромедиаторов, однако инициирует незначительное снижение норадреналина в гиппокампе животных (табл. 1). Во фронтальной коре у экспериментальных мышей аналогично с гиппокампом наблюдается снижение концентрации DA на 56.0% с одновременным возрастанием его метаболитов DOPAC на 83.0% ($p < 0.05$) и на 16.7% – 3-МТ, тогда как вектор коэффициента обмена DA–DOPAC/DA меняется и возрастает на 35.2% по сравнению с контролем. В условиях действия олигомеров α-син во фронтальной коре мышей не отмечено достоверных изменений в концентрации норадреналина, а также серотонина и его метаболитов (табл. 1). Значимых различий уровней нейромедиаторных

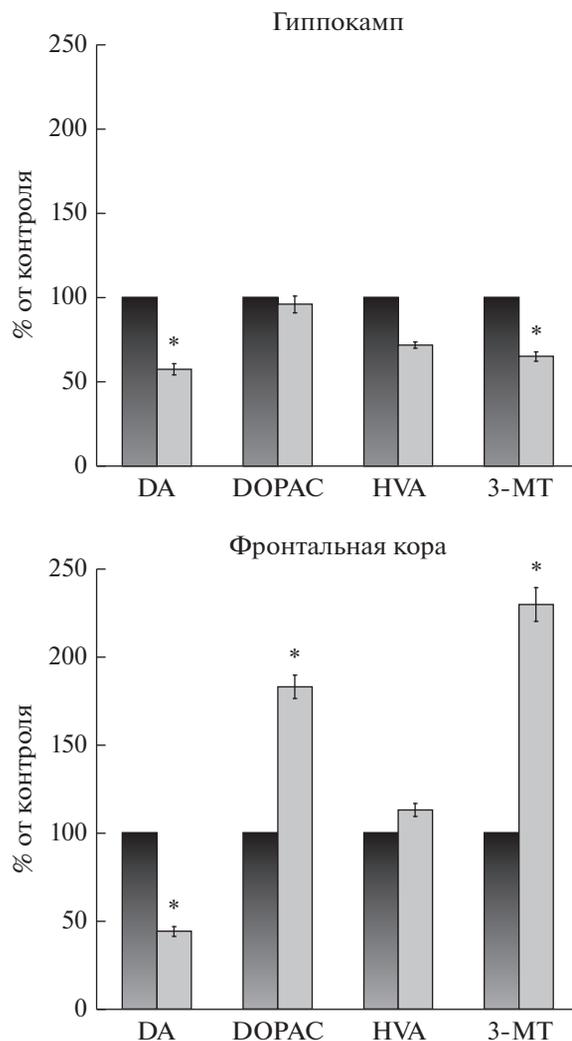


Рис. 2. Влияние хронического интраназального введения олигомеров α-синуклеина на содержание дофамина и его метаболитов в гиппокампе и фронтальной коре мозга по сравнению с контролем у 6-месячных мышей C57Bl/6. По оси абсцисс: черный столбик – физиологический раствор, серый столбик – олигомеры α-синуклеина. По оси ординат: содержание дофамина и его метаболитов в % от контроля. * – $p < 0.05$, сравнение экспериментальной и контрольной групп мышей.

аминокислот в исследованных структурах головного мозга животных, которым вводили олигомеры α-син либо физиологический раствор, не выявлено (табл. 2).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В проведенном нами исследовании было обнаружено, что олигомеры α-син, вводимые интраназально в течение 14-ти дней, вызывают у взрослых 6-ти месячных мышей возрастание показателей тревожности: уменьшение времени нахождения в открытых рукавах и увеличение вре-

Таблица 1. Влияние хронического интраназального введения олигомеров α -синуклеина на содержание нейромедиаторов и их метаболитов, а также показателей обмена в гиппокампе и фронтальной коре по сравнению с контролем

Наименование структуры мозга и групп животных	Нейромедиаторы, их метаболиты (нМ/г ткани) и показатели обмена (усл. ед.)									
	NA	DA	DOPAC	HVA	3-МТ	5-НТ	5-Н1АА	DOPAC/DA	HVA/DA	5-Н1АА/5НТ
Гиппокамп										
Физ. раствор	8.74 ± 0.51	8.37 ± 0.90	0.39 ± 0.05	1.74 ± 0.529	1.12 ± 0.41	9.19 ± 0.58	8.14 ± 0.27	0.17 ± 0.074	0.89 ± 0.08	0.50 ± 0.08
Олигомеры α -синуклеина	7.79 ± 0.50	4.81 ± 2.56*	0.34 ± 0.06	1.25 ± 0.53*	0.73 ± 0.25*	9.47 ± 0.55	7.88 ± 0.524	0.09 ± 0.03*	0.842 ± 0.057	0.42 ± 0.40
Фронтальная кора										
Физ. раствор	8.69 ± 0.16	4.86 ± 1.83	0.37 ± 0.04	1.89 ± 0.18	0.37 ± 0.08	8.72 ± 0.31	3.21 ± 0.32	0.122 ± 0.033	0.65 ± 0.19	0.36 ± 0.029
Олигомеры α -синуклеина	8.58 ± 0.25	2.14 ± 0.720*	0.68 ± 0.10*	2.16 ± 0.34	0.85 ± 0.26*	8.82 ± 0.40	3.46 ± 0.49	0.165 ± 0.056	0.51 ± 0.10	0.39 ± 0.016

Таблица 2. Влияние хронического интраназального введения олигомеров α -синуклеина на содержание нейромедиаторных аминокислот в гиппокампе и фронтальной коре по сравнению с контролем

Наименование структуры мозга и групп животных	Содержание нейромедиаторных аминокислот (ммоль/г ткани)				
	ASP	GLU	GLY	TAU	GABA
Гиппокамп					
Физ. раствор	9.89 ± 0.50	27.16 ± 1.83	1.17 ± 0.026	8.98 ± 0.70	2.64 ± 0.17
Олигомеры α -синуклеина	9.10 ± 1.07	26.27 ± 3.08	1.04 ± 0.12	8.36 ± 0.85	2.57 ± 0.36
Фронтальная кора					
Физ. раствор	12.29 ± 0.91	30.40 ± 1.80	0.92 ± 0.045	9.57 ± 0.32	2.08 ± 0.12
Олигомеры α -синуклеина	11.57 ± 0.86	28.36 ± 1.89	0.97 ± 0.075	8.88 ± 0.50	2.09 ± 0.15

мени в закрытых рукавах ПКЛ, а также возрастные динамики предпочтения нахождения на периферии и в углах ОП. При этом у животных не было документировано значимых изменений показателей двигательной активности и сохранности УРПИ. Вместе с тем, олигомеры α -син инициируют у взрослых мышей выраженное снижение содержания DA, а также изменения уровня моноаминергических метаболитов в гиппокампе и фронтальной коре мозга. В гиппокампе отмечено снижение содержания метаболитов HVA и 3-МТ при стабильном уровне DOPAC, тогда как в коре мозга возрастает содержание DOPAC и 3-МТ при неизменном уровне HVA. Эти данные свидетельствуют, что в гиппокампе преобладает путь распада DA с участием фермента моноаминоксидазы (MAO), а во фронтальной коре мозга — с участием фермента катехол-О-метилтрансферазы (COMT). Выявленные различия содержания DA и его метаболитов в исследованных церебральных структурах, по-видимому, обусловлены особенностями влияния олигомерных конформаций α -

син на обмен DA в мезокортикальной и мезолимбической—дофаминергических системах мозга [12].

В данной работе документировано, что у взрослых животных олигомеры α -син инициируют синхронное снижение уровня DA в гиппокампе и фронтальной коре мозга, ассоциированное с повышением тревожности. Эти данные, на наш взгляд, позволяют объяснить развитие у мышей тревожно-подобного состояния нарушением DA-ергической трансмиссии в указанных церебральных структурах, а также аберрацией постнатального нейрогенеза в зубчатой фасции гиппокампа. Известно, что гиппокамп и фронтальная кора непосредственно связаны с регуляцией когнитивной и аффективной функций. Нарушение обмена моноаминов и моноаминергических процессов, в частности, DA, рассматривают в качестве ведущих механизмов патогенеза расстройств депрессивного спектра [13, 14]. Существующие представления связывают процессы неонейрогенеза в гиппокампе с обеспечением психоэмоциональных функций, а

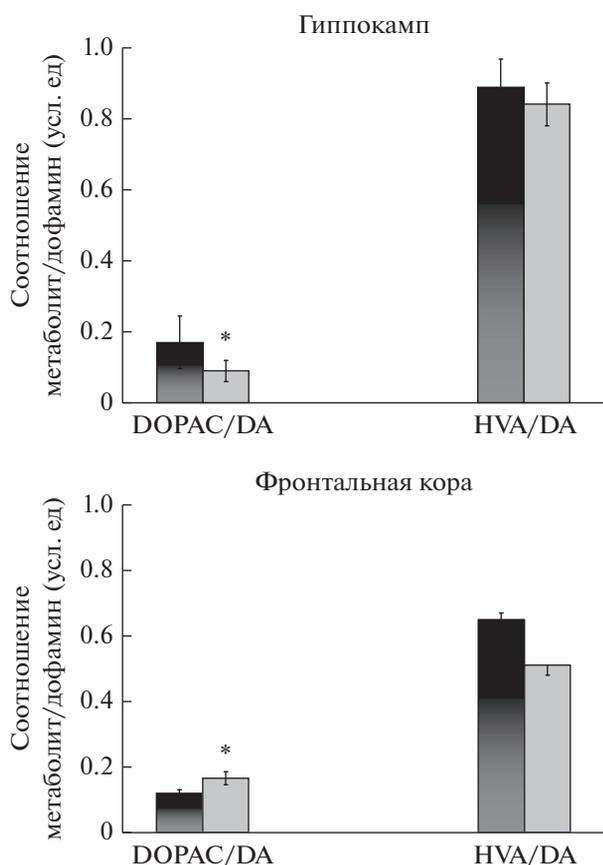


Рис. 3. Влияние хронического интраназального введения олигомеров α -синуклеина на показатель обмена дофамина и его метаболитов в гиппокампе и фронтальной коре мозга по сравнению с контролем у 6-месячных мышей C57Bl/6. По оси абсцисс: черный столбик – физиологический раствор, серый столбик – олигомеры α -синуклеина. По оси ординат: соотношение содержания метаболитов дофамина и дофамина в условных единицах. * – $p < 0,05$, сравнение экспериментальной и контрольной групп мышей.

нарушение пролиферации, дифференцировки и выживаемости вновь образованных нервных клеток – с развитием депрессии, тревоги и апатии – распространенных немоторных проявлений доклинической стадии БП и синуклеинопатий. Показано, что снижение содержания DA в гиппокампе угнетает нейрогенез в зубчатой фации, инициируя формирование aberrантных нейронных сетей [15, 16].

В опытах, выполненных нами ранее на стареющих 12-ти месячных мышцах, было показано, что олигомеры α -син в условиях аналогичного экспериментального протокола вызывают нарушения двигательной функции, ориентировочно-исследовательской активности, эпизодической памяти и повышение тревожности. У стареющих животных, получавших олигомерные формы α -син, было выявлено нарушение процессов нейрогене-

за в зубчатой фации гиппокампа, а также некоторое уменьшение содержания DA-ергических нейронов в компактной части черной субстанции мозга [7, 10].

Интересно, что у трансгенных мышей обнаружена возрастная динамика проявления моторных и немоторных нарушений, сходная с выявленными в наших опытах на взрослых и стареющих мышцах, получавших олигомеры α -син. Так, взрослые мыши Thy1-a-syn с гиперэкспрессией человеческого α -син дикого типа характеризуются снижением социального поведения без нарушения ориентировочно-исследовательской и двигательной активности. При этом у животных 3–4-х месячного возраста указанных изменений поведения не наблюдается [17]. Стареющие 12-ти месячные мыши, экспрессирующие мутантный (A30P) α -син, демонстрируют наличие когнитивного дефицита – нарушение долговременной пространственной памяти и условного страха без двигательных расстройств. Выраженные двигательные нарушения регистрируются только у 17-ти месячных и более старых мышей [18]. Следует отметить, что повышенная экспрессия белка α -син дикого типа либо его мутантных форм инициирует и ускоряет образование нейротоксических агрегированных форм α -син [19].

Таким образом, в условиях действия олигомеров α -син при хроническом интраназальном введении у взрослых 6-ти месячных мышей нами документированы проявления, сходные с начальными доклиническими симптомами БП (аффективные расстройства без характерных двигательных нарушений). Тогда, как у стареющих 12-ти месячных животных эффекты олигомеров α -син в условиях аналогичного экспериментального протокола воспроизводили проявления клинической стадии заболевания (двигательные, когнитивные и психоэмоциональные нарушения, ассоциированные с дефицитом DA в nigrostriatной системе и aberrантным нейрогенезом в гиппокампе.

Обнаруженные возрастные различия влияния олигомеров α -син на показатели поведения, содержания и обмена нейромедиаторов в структурах мозга 6-ти и 12-ти месячных мышей обусловлены, по-видимому, несколькими механизмами. У взрослых 6-ти месячных животных адапционные механизмы, такие как усиление синтеза, секреции и обратного захвата DA, снижение скорости его деградации, а также синтез DA в недофаминергических нейронах способны компенсировать дефицит DA и сдерживать нарушения DA-ергической системы мозга. У стареющих 12-месячных животных указанные компенсаторные перестройки менее эффективны и недостаточны для сдерживания моторных нарушений [3, 20, 21]. С возрастом происходит ослабление нейроглиального потенциала мозга, в частности, способности

микроглии захватывать и нейтрализовать α -син, а также снижение нейротекторной и трансмиссивной функций астроцитов [22, 23].

Показано, что нарушенные процессы постнатального нейрогенеза участвуют в развитии немоторных проявлений БП — когнитивных и психоэмоциональных расстройств. Вместе с тем, при старении происходит снижение активности постнатального нейрогенеза, облегчая и ускоряя формирование немоторных нарушений на доклинической стадии заболевания [24–26].

В качестве возможного механизма инициации БП и развития ранних доклинических симптомов рассматривают также ассоциированное с возрастом нарушение физиологической функции α -син как регулятора синаптической передачи вследствие его мисфолдинга и агрегации [27, 28].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные в работе экспериментальные данные и результаты ранее выполненного исследования позволяют считать, что выявленные у взрослых 6-ти месячных мышей C57Bl/6 поведенческие и нейрохимические эффекты олигомеров α -син, вводимых интраназально в течение 14-ти дней, воспроизводят отдельные немоторные доклинические проявления БП, тогда как у стареющих 12-месячных животных олигомерные формы α -син вызывают моторные и немоторные нарушения, сходные с клиническими симптомами заболевания, отражая тем самым возрастзависимый характер нейротоксического действия амилоидогенных конформаций белка α -син. Предполагается, что усиление тревожности, документированное у 6-ти месячных животных при хроническом интраназальном введении олигомеров α -син обусловлено нарушением процессов DA-ергической нейротрансмиссии в гиппокампе и коре мозга, а также абберацией нейрогенеза в зубчатой фасции гиппокампа.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность профессору Ludmilla Morozova-Roche, Department of Medical Biochemistry and Biophysics, Umeå University, Sweden за предоставление нативного белка α -синуклеина и техническую поддержку в получении амилоидогенных структур α -синуклеина.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Geht A.B., Popov G.R.* Medical and Social aspects of Parkinson's disease. Parkinson's disease and moving disorder. M.: "RKI Sovero Press", 2014. 450 pages (in Russian).
2. *Chen H., Burton E.A., Ross G.W., Huang X., Savica R., Abbott R.D., Ascherio A., Caviness J.N., Gao X.,*

- Gray K.A., Hong J.S., Kamel F., Jennings D., Kirshner A., Lawler C., Liu R., Miller G.W., Nussbaum R., Peddada S.D., Rick A.C., Ritz B., Siderowf A.D., Tanner C.M., Tröster A.I., Zhang J.* // Environ. Health Perspect. 2013. V. 121. № 11–12. P. 1245–1252.
<https://doi.org/10.1289/ehp.1306967>
3. *Hindle J.V.* // Age Ageing. 2010. V. 39. № 2. P. 156–161.
<https://doi.org/10.1093/ageing/afp223>
4. *Borghammer P.* // Mov. Disord. 2018. V. 33. № 1. P. 48–57.
<https://doi.org/10.1002/mds.27138>
5. *Bridi J.C., Hirth F.* // Front. Neurosci. 2018. V. 19. P. 12:80.
<https://doi.org/10.3389/fnins>
6. *Mehra S., Sahay S., Maji S.K.* // Biochim. Biophys. Acta. Proteins Proteom. 2019. pii: S1570-9639(19)30045-7.
<https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2019.03.001>
7. *Gruden M.A., Davidova T.V., Yanamandra K., Kucheryanu V.G., Morozova-Roche L.A., Sherstnev V.V., Sewell R.D.* // Behav. Brain. Res. 2013. V. 243. P. 205–212.
8. *Gruden M.A., Davydova T.V., Narkevich V.B., Fomina V.G., Wang C., Kudrin V.S., Morozova-Roche L.A., Sewell R.D.* // Behav. Brain. Res. 2014. V. 263. P. 158–168.
9. *Gruden M.A., Davydova T.V., Narkevich V.B., Fomina V.G., Wang C., Kudrin V.S., Morozova-Roche L.A., Sewell R.D.* // Behav. Brain. Res. 2015. V. 279. P. 191–201.
<https://doi.org/10.1016/j.bbr.2014.11.001>
10. *Шерстнев В.В., Кедров А.В., О. А. Соловьева О.А., Грудень М.А., Коновалова Е.В., Калинин И.А., Прошин А.Т.* // Нейрохимия. 2017. Т. 34. № 4. С. 1–10.
<https://doi.org/10.7868/s1027813317040094>
11. *Gruden M.A., Davydova T.V., Kudrin V.S., Wang C., Narkevich V.B., Morozova-Roche L.A., Sewell R.D.E.* // ACS. Chem. Neurosci. 2018. V. 9. № 3. P. 568–577.
<https://doi.org/10.1021/acchemneuro.7b00379>
12. *Roberts H.L., Brown D.R.* // Biomolecules. 2015. V. 5. № P. 282–305.
<https://doi.org/10.3390/biom5020282>
13. *Belujon P., Grace A.* // Int. J. Neuropsychopharmacol. 2017. V. 20. № 12. P. 1036–1046.
<https://doi.org/10.1093/ijnp/pyx056>
14. *Yang W., Yu S.* // Cell Mol. Life. Sci. 2017. V. 74. № 8. P. 1485–1501.
<https://doi.org/10.1007/s00018-016-2411-y>
15. *Schoenfeld T.J., Cameron H.A.* // Neuropsychopharmacology. 2015. V. 40. № 1. P. 113–128.
<https://doi.org/10.1038/npp.2014.230>
16. *Schlachetzki J.C., Grimm T., Schlachetzki Z., Ben Abdallah N.M., Eitle B., Vöhringer P., Ferger B., Winner B., Nuber S., Winkler J.* // J. Neurosci. Res. 2016. V. 94. № 1. P. 62–73.
<https://doi.org/10.1002/jnr.23677>
17. *Magen I., Torres E.R., Dinh D., Chung A., Masliah E., Chesselet M.F.J.* // J. Parkinsons Dis. 2015. V. 5. № 3. P. 669–680.
<https://doi.org/10.3233/JPD-140503>
18. *Freichel C., Neumann M., Ballard T., Müller V., Woolley M., Ozmen L., Borroni E., Kretschmar H.A., Haass C., Spooren W., Kahle P.J.* // Neurobiol. Aging. 2007. V. 28. № 9. P. 1421–1435.

19. *Etmazadeh F.N.* // J. Res. Med. Sci. 2016. V. 9. P. 21–29. <https://doi.org/10.4103/1735-1995-181989>
20. *Козина Е.А., Колачева А.А., Кудрин В.С., Кучеряну В.Г., Хаиндрава В.Г., Угрюмов М.В.* // Нейрохимия. 2016. Т. 33. № 3. С. 222–229. <https://doi.org/10.7868/51027813316030092>
21. *Козина Е.А., Ким А.Р., Хакимова Г.Р., Угрюмов М.В.* // Нейрохимия. 2016. Т. 33. № 4. С. 310–315. doi4 <https://doi.org/10.7868/51027813316030109>
22. *Гомазков О.А.* // Астроциты – звезды, которые управляют мозгом. М.: Издательство ИКАР, 2018. 108 с.
23. *Bliederhaeuser C., Grozdanov V., Speidel A.* // Acta Neuropathol. 2016. V. 131. № 3. P. 379–391. <https://doi.org/10.1007/s00401-015-1504-2>
24. *Couillard-Després S.* // Curr. Top. Behav. Neurosci. 2013. V. 15. P. 343–355. https://doi.org/10.1007/7854_2012_232
25. *Le Grand J.N., Gonzalez-Cano L., Pavlou M.A., Schwamborn J.C.* // Cell Mol. Life Sci. 2015. V. 72. № 4. P. 773–797. <https://doi.org/10.1007/s00018-014-1774-1>
26. *Marxreiter F., Regensburger M., Winkler J.* // Cell Mol. Life Sci. 2013. V. 70. № 3. P. 459–473. <https://doi.org/10.1007/s00018-012-1062-x>
27. *Calo L., Wegrzynowicz M., Santivañez-Perez J., Grazia Spillantini M.* // Mov. Disord. 2016. V. 31. № 2. P. 169–177. <https://doi.org/10.1002/mds.26479>
28. *Benskey M.J., Perez R.G., Manfredsson F.P.* // J. Neurochem. 2016. V. 137. № 3. P. 331–359. <https://doi.org/10.1111/jnc.13570>

Neurochemical and Behavioral Features of Action of Pre-Fibrillar Oligomeric Structures of α -Synuclein in Adult Mice

M. A. Gruden^a, O. A. Solov'eva^a, V. S. Kudrin^b, V. B. Narkevich^b, and V. V. Sherstnev^a

^aAnokhin Institute of Normal Physiology, Moscow, Russia

^bZakusov Institute of Pharmacology, Moscow, Russia

The pre-fibrillar oligomeric structures of the α -synuclein protein formed during its misfolding play an important role in the molecular pathogenesis of Parkinson's disease and other age-dependent neurodegenerative diseases. We studied the effect of toxic α -synuclein oligomers administered intranasally for 14 days on the motor activity, learning, memory, and anxiety of adult (6-month-old) male C57Bl/6 mice, as well as on the content and metabolism of monoamines and neurotransmitter amino acids in the hippocampus and the frontal cortex. We used the open field, passive avoidance, and elevated plus maze tests. The content of monoamines and their metabolites, as well as neurotransmitter amino acids in the brain tissue of animals was determined by high performance liquid chromatography with electrochemical detection. It was found that oligomers of α -synuclein cause an increase in anxiety in adult mice, a pronounced decrease in dopamine content and oppositely directed changes in the level of its metabolites in the hippocampus and frontal cortex. No significant changes in learning indices and long-term memory, motor activity of animals, as well as the content of noradrenaline, serotonin, and neurotransmitter amino acids in the studied brain structures after treatment with α -synuclein oligomers were found. We compared the experimental data obtained and the results of our previous studies on the behavioral and neurochemical effects of oligomeric protein structures in aging 12-month-old mice. Possible mechanisms of the age-dependent effects of the α -synuclein oligomers that were found in our studies are discussed.

Keywords: α -synuclein oligomers, dopamine, neurotransmitters, behavior, hippocampus, frontal cortex, adult and aging mice, Parkinson's disease