

На правах рукописи

Голоборщева Валерия Владимировна

**ОСОБЕННОСТИ МФТП-ИНДУЦИРОВАННОГО ПАРКИНСОНИЗМА НА
МЫШАХ С ГЕНЕТИЧЕСКИМ НОКАУТОМ АЛЬФА-СИНУКЛЕИНА**

3.3.3 – Патологическая физиология

Автореферат диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Москва 2021

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»

Научные руководители:

доктор медицинских наук **Кучеряну Валериян Григорьевич**
кандидат медицинских наук **Овчинников Руслан Константинович**

Официальные оппоненты:

Пинелис Всеволод Григорьевич – доктор медицинских наук, профессор, главный научный сотрудник лаборатории нейробиологии и основ развития мозга Федерального государственного автономного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей» Министерства здравоохранения РФ.

Худоерков Рудольф Михайлович – доктор медицинских наук, главный научный сотрудник лаборатории нейроморфологии Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научный центр неврологии».

Ведущая организация:

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский университет).

Защита состоится «23» декабря 2021 г. в 14 ч. 00 мин. на заседании диссертационного совета 24.1.180.01, созданного на базе ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии», по адресу: 125315, г. Москва, ул. Балтийская, д. 8.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБНУ «НИИОПП», а также на сайте <http://www.niiopp.ru/>.

Автореферат разослан «22» ноября 2021 г.

Ученый секретарь диссертационного совета
доктор биологических наук

Н.Б. Панкова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Избирательное поражение дофаминергических нейронов nigrostriатной системы является одним из основных компонентов патогенеза болезни Паркинсона (БП). Установлено, что альфа-синуклеин, локализованный преимущественно в пресинаптических окончаниях, вовлечен в регуляцию оборота дофамина (ДА) в синапсах и принимает непосредственное участие в оптимизации процессов нейротрансмиссии в ДА-ергических нейронах. Нарушения его структуры, экспрессии и внутринейронной локализации приводят к патогенной агрегации и формированию характерных патогистологических включений – телец Леви [Воронков Д.Н. и др., 2018; Иллариошкин С.Н., Ахмадуллина Д.Р., 2020]. Более того, получены многочисленные экспериментальные доказательства того, что нейротоксин - 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридин (МФТП), специфически поражающий nigrostriатные ДА-ергические нейроны, вызывает повышение экспрессии и посттрансляционные модификации эндогенного альфа-синуклеина, а в некоторых случаях, ведет к его агрегации в цитоплазме нейронов с образованием патогистологических включений [Fornai F. et al., 2005]. Остается не до конца выясненным, вовлечён ли эндогенный альфа-синуклеин в механизмы токсического действия МФТП на ДА-ергические нейроны чёрной субстанции (ЧС) головного мозга. В ряде исследований, проведенных на линиях нокаутных по гену альфа-синуклеина мышей, было показано, что их ДА-ергические нейроны ЧС более устойчивы к нейротоксическому эффекту МФТП [Dauer W. et al., 2002; Drolet R. et al., 2004; Fornai F. et al., 2005; Klivenyi P. et al., 2006; Robertson D. et al., 2004]. С другой стороны, у линии мышей с большой спонтанной делецией части хромосомы (размер делеции - 2 сМ), захватывающей и локус Snca, эти нейроны оказались столь же чувствительными к МФТП, как и нейроны мышей дикого типа [Fornai F. et al., 2005]. Кроме того, было продемонстрировано, что в устойчивой к МФТП линии животных с инактивированным альфа-синуклеином [Robertson D. et al., 2004] одновременная делеция генов, кодирующих и другие члены семейства синуклеинов, восстанавливает чувствительность ДА-ергических нейронов ЧС к этому токсину. Таким образом, роль альфа-синуклеина в механизме токсического действия МФТП остается окончательно не установленной.

Несоответствия, наблюдаемые в разных линиях мышей с инактивированным геном альфа-синуклеина, могут быть объяснены природой внесенных генетических модификаций. Известные и изученные линии

содержат дополнительные генетические элементы, оставшиеся в модифицированном локусе гена альфа-синуклеина. Эти «следовые» элементы могут влиять на экспрессию соседних или относительно отдаленных генов с часто непредсказуемым воздействием на функционирование нейронов в целом и их чувствительность к МФТП в частности.

Поскольку использование генетически модифицированных животных для исследования роли нарушения функции альфа-синуклеина в патологии nigростриатной системы остается наиболее продуктивным методологическим подходом, были созданы новые линии с регулируемым и конвенционным нокаутом гена альфа-синуклеина [Ninkina N. et al., 2015]. Использование в диссертационном исследовании новой нокаутной линии, в которой конститутивная инактивация гена альфа-синуклеина достигнута минимальными модификациями локуса с удалением всех посторонних последовательностей, используемых на промежуточных этапах создания нокаута, позволило исследовать непосредственно нарушения функции альфа-синуклеина в центральной нервной системе. Выявление механизмов селективного повреждения определенных групп DA-ергических нейронов является важной фундаментальной задачей в изучении патогенеза БП, а недавние исследования убедительно показали, что альфа-синуклеин вовлечен в эти механизмы [Tarasova T. et al., 2018], поскольку участвует в регуляции формирования популяций DA-нейронов, имеющих различную чувствительность к нейротоксину МФТП и дифференцировано поражаемых у больных с БП.

Цель исследования

Изучение патогенетических механизмов МФТП-индуцированного экспериментального паркинсонизма у животных с генетическим нокаутом альфа-синуклеина.

Задачи исследования

- 1.** Провести моделирование МФТП-индуцированного паркинсонического синдрома на двух линиях нокаутных по гену альфа синуклеина мышей, различающимися модификациями в локусе альфа-синуклеина.
- 2.** Исследовать изменения локомоторной функции у альфа-синуклеин нокаутных мышей, в сравнении с животными с немодифицированным геномом, в условиях МФТП-индуцированного экспериментального паркинсонизма.
- 3.** Выполнить морфометрическое исследование популяций DA-ергических нейронов в чёрной субстанции (ЧС) и вентральной области покрышки (ВОП) среднего мозга у альфа-синуклеин нокаутных мышей и животных с немодифицированным геномом после введения МФТП.

4. Оценить изменения содержания ДА и его метаболитов – диоксифенилуксусной кислоты (ДОФУК) и гомованилиновой кислоты (ГВК) в стриатуме альфа-синуклеин нокаутных мышей и животных с немодифицированным геномом после введения МФТП.
5. Проанализировать влияние посторонних последовательностей, внесенных в модифицированный геномный локус, на экспрессию близлежащего гена мультимерина-1.
6. Исследовать эффект возможного функционального замещения двух других высоко гомологичных членов семейства синуклеинов на развитие МФТП-индуцированного паркинсонического синдрома у бессинуклеиновых мышей с делецией генов α -, β -, γ -синуклеинов.

Научная новизна исследования

1. Впервые была изучена роль дефицита альфа-синуклеина в селективном поражении ДА-ергических нейронов ЧС и ВОП мозга нокаутных по гену альфа-синуклеина мышей в условиях моделирования паркинсонического синдрома путём системного введения МФТП.
2. Получены новые данные по характеристике МФТП-индуцированного паркинсонизма на модельных системах генетического нокаута, воспроизводящих недостаточность альфа-синуклеина, или всех трёх членов семейства синуклеинов.
3. Впервые установлено влияние привнесённых в геном экспериментальных моделей *in vivo* модификаций в локусе альфа-синуклеина на экспрессию гена мультимерина-1, картированного в непосредственной близости с альфа-синуклеином.

Теоретическая значимость

Выявлены особенности патогенеза МФТП-индуцированного паркинсонического синдрома у двух линий мышей с избирательной инактивацией гена альфа-синуклеина (Abel-KO и Δ Flox-KO), а также линии бессинуклеинового нокаута (abg-KO). Установлено, что генетическая инактивация альфа-синуклеина приводит к снижению общего числа ДА-ергических нейронов в чёрной субстанции (ЧС) и вентральной области покрышки (ВОП). Введение нокаутным животным пронеуротоксина МФТП не влияет на число ДА-ергических нейронов ЧС и ВОП, но индуцирует манифестацию поведенческих и биохимических признаков экспериментального

паркинсонизма. При генетическом «выключении» всех белков-синуклеинов в условиях МФТП-нейротоксичности развиваются типичные патоморфологические и нейрохимические признаки паркинсонического синдрома, что предполагает наличие функционального замещения у двух других высоко гомологичных членов семейства синуклеинов.

Практическая значимость

Поскольку линию избирательного нокаута альфа-синуклеина Δ Floх-КО, а также созданной на его основе линию abg-КО с делецией генов α -, β -, γ -синуклеинов, ранее не использовали для моделирования паркинсонического синдрома, полученные данные могут быть полезны для разработки новых подходов к патогенетической диагностике и лечению паркинсонизма. В частности, открывается возможность выбора новых молекулярных мишеней таргетной терапии – семейство белков-синуклеинов.

Положения, выносимые на защиту

1. В ходе морфометрического анализа популяции ДА-ергических нейронов ЧС и ВОП мозга обеих альфа-синуклеин нокаутных линий мышей установлено, что альфа-синуклеин вовлечён в процессы их специфического поражения в условиях МФТП-индуцированного паркинсонизма.
2. Дефицит альфа-синуклеина оказывает нейропротекторный эффект на ДА-ергические нейроны ЧС в субхронической модели МФТП-индуцированного паркинсонического синдрома.
3. Привнесённые в модифицированный локус альфа-синуклеина в линии Abel-КО посторонние последовательности повышают уровень экспрессии гена мультимерина-1 в нервной ткани, в то время как уровни экспрессии в линии Δ Floх-КО не отличаются от таковых в контрольных мышах с интактным геномом.
4. При генетической делеции всех трёх синуклеинов чувствительность ДА-ергических нейронов ЧС к токсическому действию МФТП не отличается от таковой у животных с немодифицированным геномом, по-видимому, из-за отсутствия эффекта функционального замещения бета-синуклеином, оптимизирующего захват дофамина синаптическими везикулами.

Публикация результатов исследования

По теме диссертации опубликовано 13 печатных работ, в том числе 7 статей – в рецензируемых научных изданиях по специальности 3.3.3 –

патологическая физиология, и приравненные к ним публикации, и 6 сообщений – в сборниках докладов научных конференций.

Структура и объем работы

Диссертация представлена в виде введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов собственных исследований, их обсуждения, выводов и списка цитируемой литературы, включающего 185 наименований. Работа изложена на 142 страницах и сопровождается 37 рисунками, 3 таблицами и 1 схемой.

Личный вклад автора

Разработка основной научной идеи и планирование исследования выполнено при непосредственном активном участии автора. Все ключевые эксперименты выполнены автором лично. Моделирование МФТП-индуцированного паркинсонизма на экспериментальных и контрольных когортах животных было проведено автором самостоятельно в конвенциональной зоне SPF-вивария при Лаборатории генетического моделирования нейродегенеративных процессов ИФАВ РАН, Черноголовка. Анализ моноаминов методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) выполнен автором совместно с А.Ю. Романом в Кардиффском университете, Великобритания. Автором самостоятельно сформирована база данных, проведена статистическая обработка, анализ и интерпретация всех полученных результатов. Автору принадлежит ведущая роль при подготовке и написании научных публикаций по теме диссертации.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Линии нокаутных животных:

- **Abel-KO** – генетический нокаут альфа-синуклеина с масштабной делецией части генома (3,2 Kb);
- **Δ Flox-KO** – конвенционный «бесследовой» нокаут альфа-синуклеина;
- **β -KO** – генетический нокаут бета-синуклеина;
- **γ -KO** – генетический нокаут гамма-синуклеина.

Все линии на генетическом фоне C57Bl/6J. Работы проведены в соответствии с "Правилами лабораторной практики в Российской Федерации" от 01.04.2016 г. № 199н.

Генотипирование: проводили методом конвенционной ПЦР с последующим электрофорезом ДНК-фрагментов в агарозном геле.

Протокол введения МФТП: в возрасте 3 месяцев экспериментальным животным внутрибрюшинно вводили водный раствор МФТП (30 мг/кг в сутки) в течение 5 дней, контрольным группам животных вводили изотонический раствор хлорида натрия (NaCl 0,9%).

Поведенческое тестирование проводили в экспериментальных и контрольных группах самцов через 21 день после последней инъекции МФТП. Сенсомоторные нарушения исследованы в тестах с вертикальным шестом, на перевёрнутой сетке и с применением современной многофункциональной установки «CatWalk XT».

Анализ уровня моноаминов (серотонина, дофамина и его метаболитов) выполняли методом ВЭЖХ в образцах дорсальных стриатумов.

Патогистологический анализ. Фиксацию тканей проводили в холодном растворе Карнуа при 4°C в течение ночи. Далее образцы отмывали от фиксирующего раствора в фосфатно-солевом буфере (ФСБ) и проводили дегидратацию тканей при комнатной температуре методом последовательного инкубирования в серии спиртов с повышением концентрации. Дегидратированные ткани головного мозга мышей насыщали расплавленным парафином в сухом термостате при 60°C. Заключение в парафиновые блоки проводили при помощи полуавтоматической станции Leica EG1160 (Leica Biosystems, Германия). Срезы толщиной 8 мкм производили на ротационном микротоме Leica RM2265 (Leica Biosystems, Германия), после чего полученные парафиновые образцы монтировали на предметные стекла с полилизинным покрытием (Thermo Scientific, Великобритания). Срезы подвергались депарафинизации в ксилоле с последующей регидратацией в серии спиртов понижающейся концентрации и дистиллированной воде. Для иммуногистохимического окрашивания ДА нейронов использовали моноклональные антитела против тирозингидроксилазы (ТГ). В качестве вторичных антител – биотинилированные против иммуноглобулинов мыши. Микроскопию и фотографирование проводили камерой Leica DFS 490 с программным обеспечением Leica Application Suit v. 2.8.1. Для морфометрического анализа ДА нейронов использовали стереологический подход, определяя содержание ТГ-позитивных нейронов во всей исследуемой анатомической структуре, локализацию которой проводили по атласу [Fraklin K. et al., 2007]. Для подсчета каждый пятый срез располагали на предметном стекле, всего 10 срезов толщиной 8 микрон на препарат. Для введения

коррекционной поправки Аберкромби измеряли диаметр 30 нейронов, располагавшихся в каждой из исследуемых областей. Подсчитывали отдельно значения для правой и левой частей ЧС и ВОП.

Анализ уровней экспрессии мРНК гена *Mmrn-1*. Суммарную РНК выделяли из замороженных образцов с помощью набора RNeasy Plus Mini (Qiagen, Германия) по инструкции производителя. Очищенную РНК использовали для синтеза комплементарной цепи ДНК в реакции обратной транскрипции с последующей амплификацией реагентами qPCRmix-HS SYBR (Евроген, Россия) по протоколу производителя методом ПЦР в режиме реального времени в установке BioRad CFX 96 (BioRad, США).

Статистическая обработка данных. Результаты электрофореза агарозного геля документировали после визуализации ДНК в проходящем ультрафиолетовом свете с помощью системы BioSpectrum AC Chemi HR 410 (UVP, США). Для анализа полученных данных ВЭЖХ использовали программное обеспечение ALEXYS (Antec Leyden, Нидерланды). Результаты теста CatWalk прошли обработку в программном обеспечении CatWalk XT10.6 (Noldus, Нидерланды). Статистическая обработка данных была выполнена в программных пакетах Statistica 12.0 и GraphPad Prism 8: в случае нормального распределения для множественных сравнений использовали однофакторный дисперсионный анализ ANOVA в сочетании с критерием Фишера (PLSD post-hoc), Тьюки или Даннета, для попарных сравнений – t-критерий Стьюдента; в случае отсутствия нормальности распределения выборок для попарных сравнений использовали непараметрический критерий Манна-Уитни. Нормальность распределения массивов данных была оценена в тесте Колмогорова-Смирнова.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В рамках диссертационной работы были использованы две альфа-синуклеин дефицитные линии мышей. Одна из них – Abel-KO, которая была получена в лаборатории А. Rosental в 2000 году [Abeliovich A. et al., 2000], а другая (ΔFlox-KO) – в лаборатории В.Л. Бухмана в 2015 году [Ninkina N. et al., 2015].

Так, в линии Abel-KO (**Рис. 1**) после удаления первого (Ib) и второго экзона альфа-синуклеина с прилегающими последовательностями (размер делеции порядка 3.2 Кб), в модифицированном локусе оставался фрагмент плазмидного вектора pGT-N39 размером 1.9 Кб, содержащий кодирующую часть гена нео под промотором мышинового гена фосфоглицераткиназы Pgc1. В другой линии (ΔFlox-KO) делеция *Sncs* гена была проведена с минимальными

модификациями локуса. Из генома мыши был удален второй экзон, содержащий START-кодон, и небольшой участок прилегающей интронной последовательности размером всего 1.1 Кб. Более того, и ген нео, и все значимые посторонние последовательности были удалены из модифицированного локуса полученных мышей. Единственной привнесенной вставку, оставшейся в геноме Δ Flox-KO мышей, является лишь инертный LoxP-сайт размером 34 п.н.

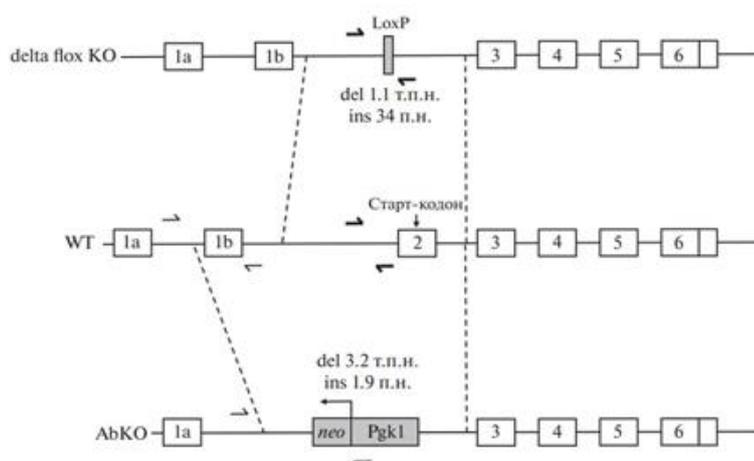


Рисунок 1. Схема модификаций локуса альфа-синуклеина в нокаутных линиях мышей. Закрашены привнесенные в мышинный геном посторонние последовательности.

Морфометрический анализ ДА-ергических нейронов в компактной части чёрной субстанции у мышей с генетическим нокаутом альфа-синуклеина

Для выявления фенотипических особенностей нигростриатной системы в двух линиях мышей с генетическим нокаутом альфа-синуклеина – Δ Flox-KO и ранее изученной Abel-KO, проводили сравнительный морфометрический анализ числа дофаминергических нейронов в компактной части чёрной субстанции (Рис. 2).

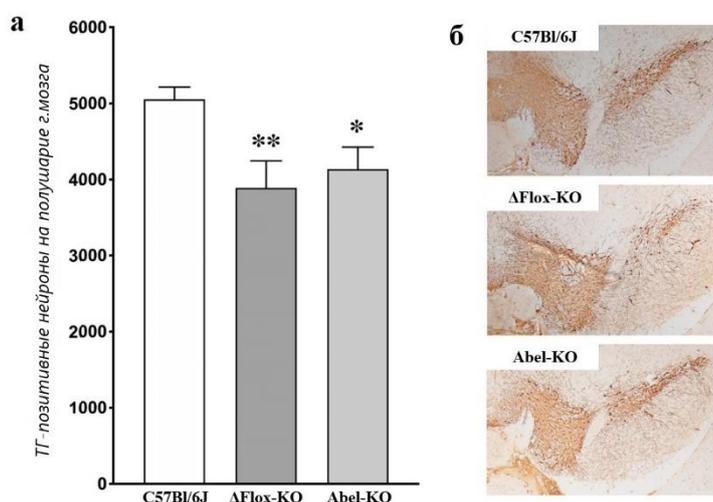


Рисунок 2. Снижение числа ДА-ергических нейронов в компактной части чёрной субстанции в двух альфа-синуклеин нокаутных линиях мышей.

а) Количество ТГ(+)-нейронов в ЧС. One-way ANOVA + тест Даннетта

($p = 0.0123$; $**p = 0.0094$; $*p = 0.0451$), $n=8$.

б) Срезы мозга в зоне компактной части ЧС, ИГХ антителами против ТГ.

Проведённый морфометрический анализ показал, что общее количество дофаминергических нейронов в ЧС взрослых мышей Abel-KO и новой линии Δ Flox-KO было ниже, чем в ЧС контрольных мышей дикого типа (C57BL/6J). Последний результат указывает на то, что дефицит ДА-ергических нейронов действительно вызван недостатком функционального белка альфа-синуклеина.

Анализ уровней мРНК гена *Mmrn-1*, картированного вблизи с альфа-синуклеином

Чтобы выяснить, могут ли различные модификации в локусе альфа-синуклеина (*Sncs*) исследуемых нокаутных линий влиять на экспрессию гена *Mmrn-1*, расположенного в 160 Кб от *Sncs*, нами было исследовано содержание мРНК *Mmrn-1* в коре головного мозга методом ОТ-ПЦР относительно животных с интактным геномом (Рис. 3).

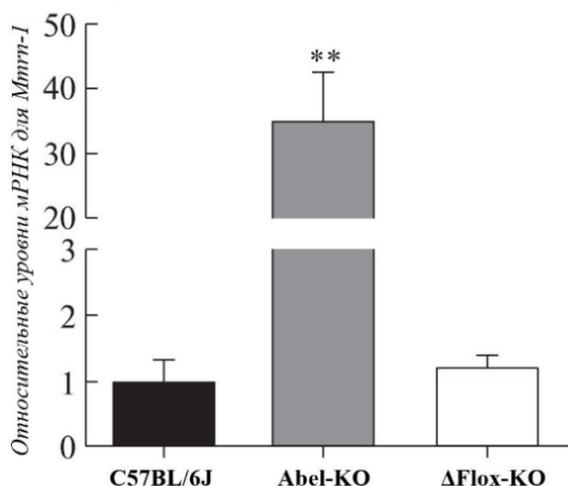


Рисунок 3. Сравнительный анализ уровней экспрессии гена *Mmrn-1* в трех линиях мышей с генетическим нокаутом альфа-синуклеина. $M \pm SEM$, $n = 6$ для каждой группы; ** $p < 0.01$ при сравнении Abel-KO с остальными группами. One-way ANOVA с применением множественных сравнений Тьюки.

Проведенный анализ относительных уровней экспрессии *Mmrn-1* в двух линиях мышей с генетическим нокаутом альфа-синуклеина показал, что его уровень был повышен в 35 раз у мышей линии Abel-KO, в то время как у Δ Flox-KO он практически не отличался от результатов для контрольных животных с немодифицированным геномом. Эти данные указывают на то, что функционально активный промотор кассеты в геноме линии Abel-KO, ориентированный в направлении *Mmrn-1*, мог оказывать активирующий эффект на регуляторные последовательности этого гена. Обнаруженный нами эффект влияния этих посторонних последовательностей на регуляторные элементы гена *Mmrn-1* следует учитывать при работе с альфа-синуклеин нокаутной линией Abel-KO, которая является общепринятой и используется в лабораториях мира для исследования и интерпретации механизмов нейродегенерации.

Характеристика МФТП-индуцированного паркинсонического синдрома у мышей с селективной инактивацией гена альфа-синуклеина

Референсные (C57BL/6J) и альфа-синуклеин дефицитные группы мышей были сформированы из помётов от скрещивания гетерозиготных производителей и последующего генотипирования потомков.

Результаты инструментального анализа двигательных нарушений

Тестирование «перевернутая сетка»

В проведённом тесте не было выявлено каких-либо значимых различий у животных получавших нейротоксин МФТП и группы контроля (**Рис. 4**). Время, которое животные удерживались на перевернутой сетке, было близким ко времени тестирования (60 с) во всех группах, что указывало на отсутствие существенных нарушений мышечной силы конечностей и способности удерживать равновесие.

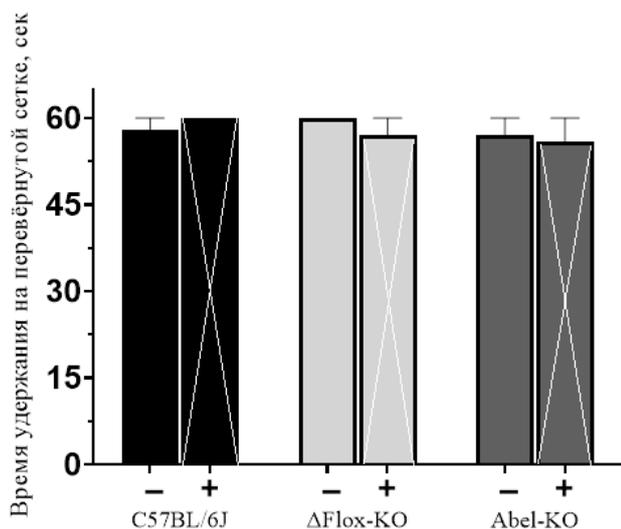


Рисунок 4. Анализ способности животных удерживаться на перевернутой сетке в группах, получавших МФТП (+) и в контрольных группах (-).

$M \pm SEM$, $n = 8$ в каждой из шести групп. One-way ANOVA с применением критерия множественных сравнений Тьюки.

Тестирование «вертикальный шест»

Анализ способности животных спускаться по вертикальному шесту не выявил статистически значимых различий между принимавшими МФТП и физраствор животными (**Рис. 5**). И хотя наблюдалась тенденция к увеличению общего времени спуска с шеста у животных, получавших МФТП, различия в показателях не были значимыми, что свидетельствует об отсутствии выраженных локомоторных нарушений в наблюдаемых группах.

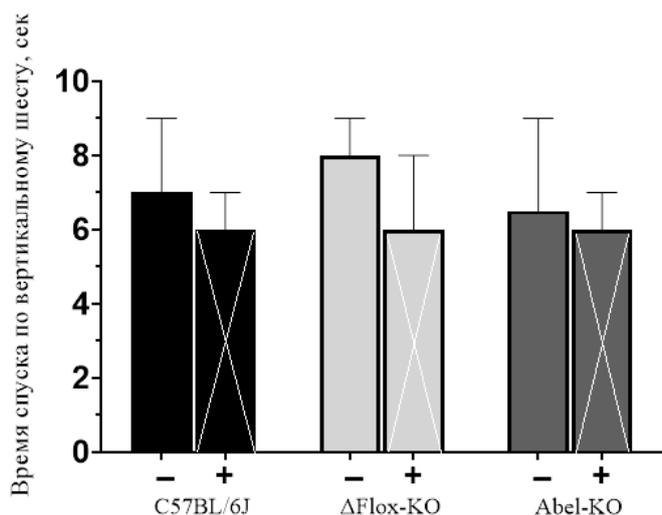


Рисунок 5. Исследование координации движений у животных в тесте «вертикальный шест» до (-) и после (+) введения МФТП. $M \pm SEM$, $n = 8$ в каждой из шести групп.

One-way ANOVA с применением критерия множественных сравнений Тьюки.

Анализ походки в высокотехнологичной установке CatWalk XT (“Noldus”)

Данная установка позволяет регистрировать до 250 параметров, характеризующих походку животных. Выявлены изменения ряда показателей походки в группах мышей, обработанных МФТП. Наиболее выраженными были изменения интенсивности и формы контакта конечности с пластиной аппарата при ходьбе. В частности, у мышей, получавших МФТП, интенсивность давления конечности на поверхность снижалась в среднем на 20%. Причем снижение этого показателя наблюдалось на всех четырех конечностях. Важно отметить, что у мышей обеих нокаутных линий выраженность эффекта ослабления контакта конечности с поверхностью была одинаковой (Рис. 6).

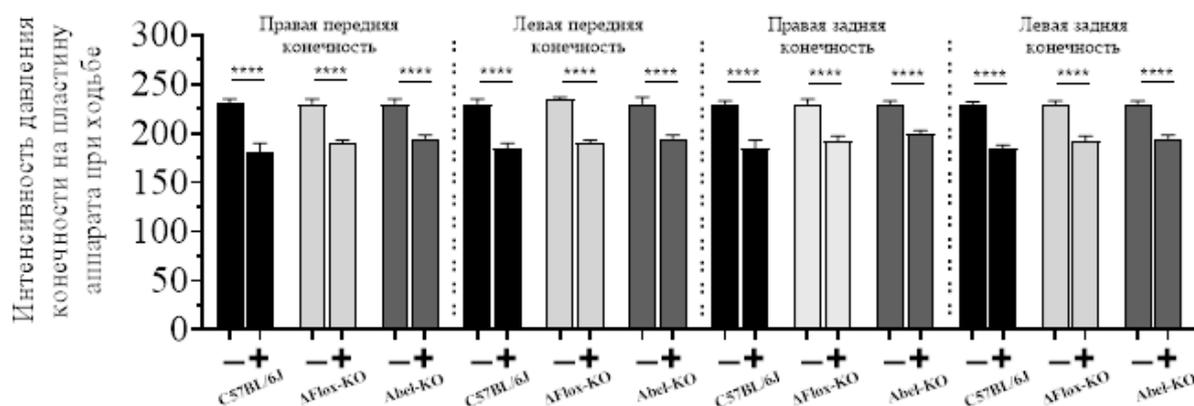


Рисунок 6. Интенсивность давления конечности на пластину аппарата при ходьбе (усл. ед.). (+) - введен МФТП; (-) - не введен МФТП. $M \pm SEM$, $n = 8$; **** $p < 0.0001$. One-way ANOVA + критерий сравнения Тьюки.

Также был проанализирован другой параметр – расстояние между шагами по разным осям движения тела мыши, который также менялся, однако

отсутствовала строгая закономерность, количественно описывающая общую для всех групп особенность нарушения походки (**Рис. 7**).

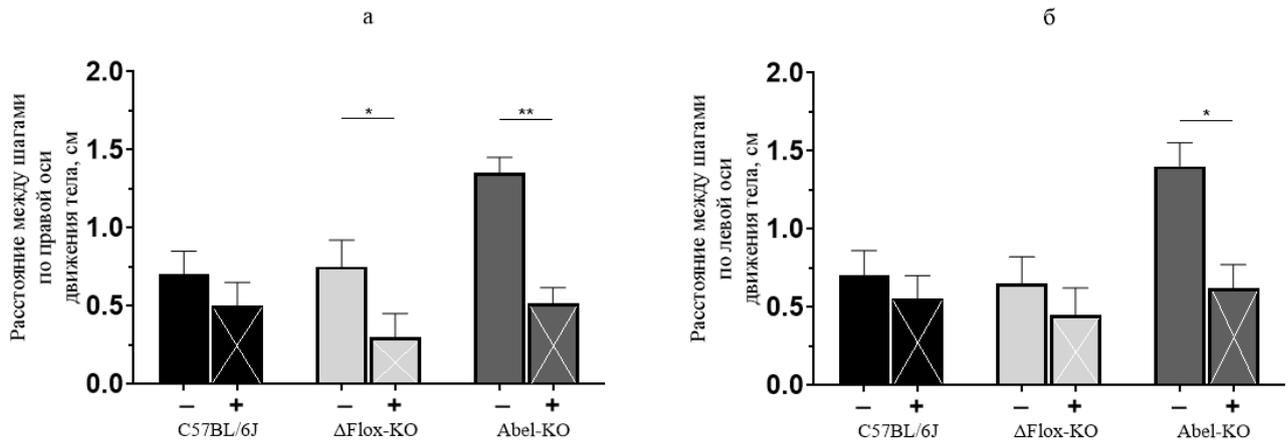


Рисунок 7. Сокращение расстояния между шагами по разным осям движения тела мыши после введения МФТП. а – правая, б – левая ось движения тела мыши.

(+) - введен МФТП; (-) - не введен МФТП. $M \pm SEM$, $n = 8$; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$. One-way ANOVA с применением критерия сравнений Тьюки.

Биохимическое исследование дофамина и его метаболитов в стриатуме

Уровни дофамина и его метаболитов определяли методом ВЭЖХ в тканях стриатума, поскольку в стриатуме располагаются синапсы ДА-ергических нейронов ЧС, и там осуществляется трансмиссия дофамина. Нами выявлено статистически значимое снижение уровней дофамина у мышей всех групп после обработки нейротоксином МФТП (**Рис. 8**).

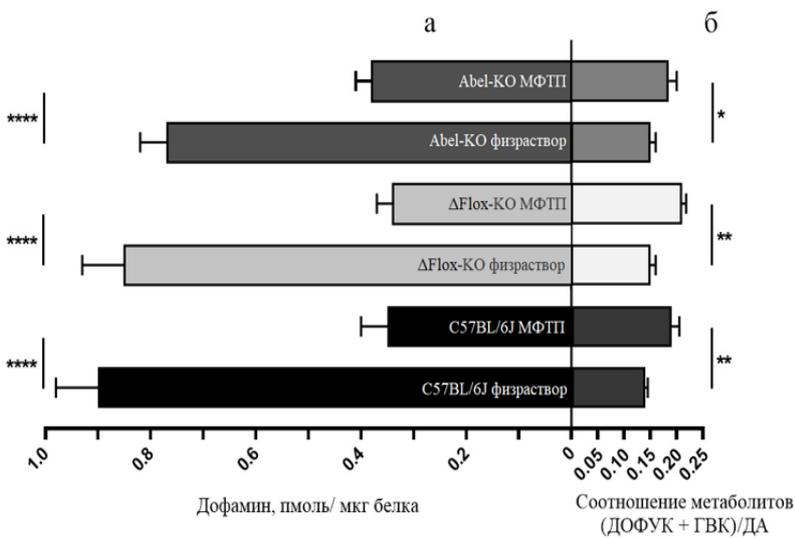


Рисунок 8. ВЭЖХ-анализ уровней дофамина и его метаболитов в стриатуме мышей.

а – содержание дофамина в стриатуме мышей дикого типа (C57BL/6J) и линий с нокаутом альфа-синуклеина – Abel-KO и ΔFlox-KO;

б – соотношение общего содержания ДОФУК + ГVK и уровня стриатного дофамина. $M \pm SEM$, $n = 8$; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; **** $p < 0.0001$. One-way ANOVA + критерий сравнения Тьюки.

Соотношение содержания продуктов метаболизма дофамина и молекул дофамина во всех образцах было повышено. Это указывало на то, что количество молекул дофамина, утилизируемых в синаптических окончаниях

ДА-ергических нейронов, превышало количество новосинтезированного ДА. Такие изменения в показателях катаболизма стриатного дофамина обусловлены гибелью тел части ДА-ергических нейронов ЧС. Таким образом, сравнительный анализ содержания дофамина и его метаболитов в стриатумах мышей линий Δ Floх-KO и Abel-KO показал идентичность повреждающего эффекта МФТП на дофаминовый статус.

В тех же образцах методом ВЭЖХ определены уровни серотонина (Рис. 9). Не выявлено статистически значимого падения уровня серотонина после обработки МФТП ни у мышей Abel-KO, ни у мышей Δ Floх-KO, ни у мышей дикого типа (C57BL/6J). Эти данные указывают на специфичность МФТП-токсического поражения именно тел ДА-ергических нейронов в компактной части ЧС.

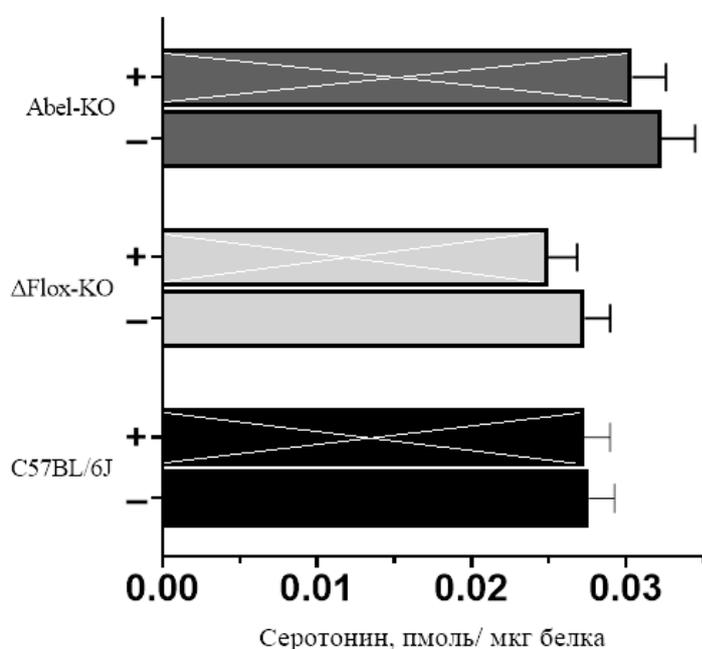


Рисунок 9. Содержание серотонина у C57BL/6J и у нокаутных мышей двух линий: Abel-KO и Δ Floх-KO.

(+) - введен МФТП; (-) - не введен МФТП. $M \pm SEM$, $n = 8$. One-way ANOVA + критерий сравнения Тьюки.

Морфометрический анализ дофаминергических нейронов чёрной субстанции (ЧС) и вентральной области покрышки (ВОП)

Для анализа выживаемости популяции зрелых нейронов ЧС и ВОП в условиях МФТП-токсического моделирования паркинсонического синдрома на двух альфа-синуклеин нокаутных линиях мышей Abel-KO и Δ Floх-KO было произведено сравнительное морфометрическое исследование.

Результаты исследования показали, что общее количество ДА-ергических нейронов компактной части ЧС у мышей дикого типа, получавших физиологический раствор, было на 20-22% выше по сравнению с гомозиготными альфа-синуклеин нокаутными мышами Δ Floх-KO и Abel-KO, что согласуется с результатами, полученными нами ранее (Рис. 2). После

введения МФТП произошло значительное истощение иммунореактивных ТГ-позитивных нейронов у мышей дикого типа, однако примечательно, что подобный эффект не наблюдался у мышей с генетическим нокаутом альфа-синуклеина (Рис. 10). Таким образом, мы обнаружили, что мыши в условиях дефицита альфа-синуклеина устойчивы к потере ДА-ергических нейронов в компактной части ЧС после введения МФТП.

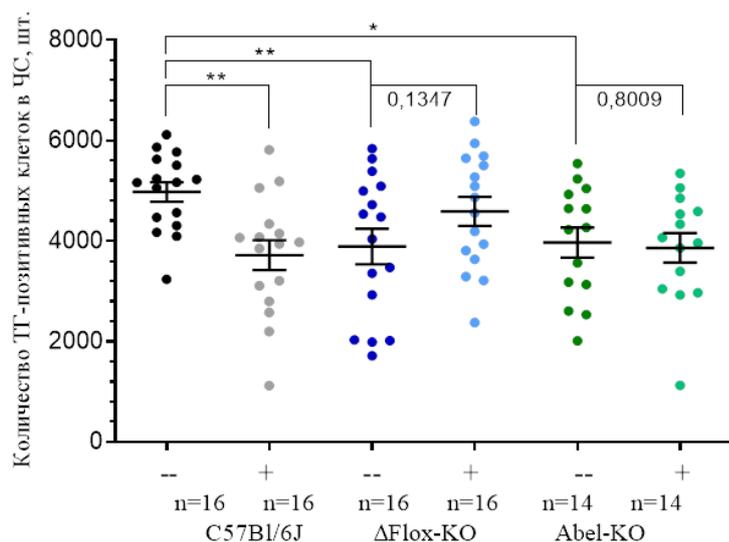


Рисунок 10. Популяция ДА-ергических нейронов ЧС после введения физраствора (—) и МФТП (+). $M \pm SEM$ числа стереологически подсчитанных нейронов в компактной части чёрной субстанции.

One-way ANOVA в сочетании с критерием Фишера (PLSD post-hoc).

Также установлено, что ДА-ергические нейроны ВОП устойчивы к воздействию МФТП во всех трёх регистрируемых группах, причём линия генетического нокаута альфа-синуклеина Δ Flox-KO демонстрировала более выраженную резистентность в отличие от животных с неизменённым геномом (Рис. 11). Следует отметить, что в условиях дефицита альфа-синуклеина у нокаутных животных линий Δ Flox-KO и Abel-KO, получавших физраствор, отмечалось достоверное снижение числа ДА-ергических нейронов относительно контрольных животных дикого типа $\sim 30\%$.

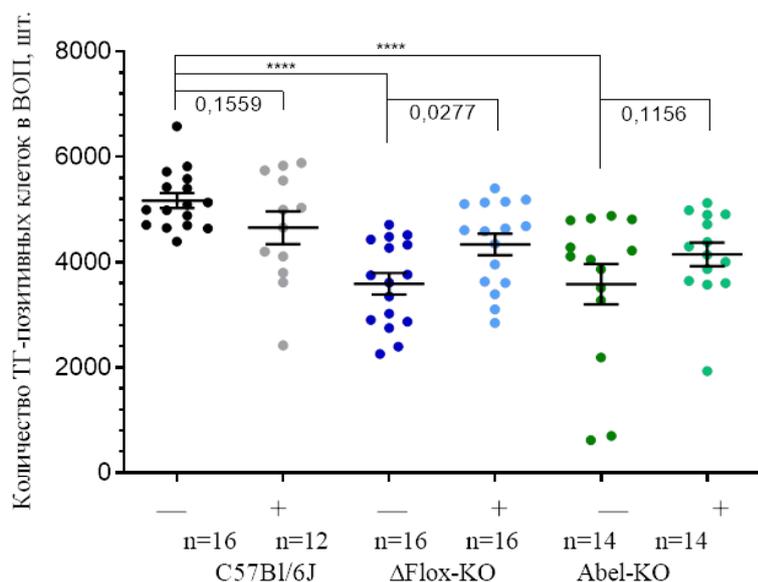


Рисунок 11. Популяция ДА-ергических нейронов ВОП после введения физраствора (—) и МФТП (+). $M \pm SEM$ числа стереологически подсчитанных нейронов в вентральной области покрышки. One-way ANOVA в сочетании с критерием Фишера (PLSD post-hoc).

Характеристика МФТП-индуцированного паркинсонического синдрома у животных с тройной делецией всех членов семейства синуклеинов

Для изучения потенциальной компенсации потери функции альфа-синуклеина другими членами высокомолекулярного семейства, а также роли белков семейства синуклеинов в механизме развития паркинсонического синдрома, индуцированного нейротоксином МФТП, необходимо было получить экспериментальную модель на мышах, не содержащую собственных эндогенных белков синуклеинов. Для этого нами была использована линия мышей *abg-KO* с генетической инактивацией всех трёх генов (α -, β -, γ -синуклеинов), впервые полученная путём последовательного многоэтапного скрещивания линий Δ Flox-KO, β -KO и γ -KO. В качестве контроля использовали линию C57BL/6J с немодифицированным геномом.

В возрасте 12 недель самцам обеих линий внутрибрюшинно вводили МФТП (30 мг/кг в сутки) по субхроническому протоколу. Через 21 день после последней инъекции были проведены исследования, аналогичные для альфа-синуклеин дефицитных групп животных, а именно оценка локомоторной функции, исследование уровней моноаминов и сравнительный морфометрический анализ дофаминергических нейронов ЧС и ВОП головного мозга.

Оценка расстройств двигательной системы у животных линии *abg-KO*

Исследование двигательной функции у бессинуклеиновых мышей линии *abg-KO* было проведено в батарее инструментальных тестов, аналогичных для альфа-синуклеин дефицитных животных: «перевернутая сетка», «вертикальный шест» и в установке CatWalk. Мыши обеих групп в возрасте 4 месяцев были способны распределять тело в пространстве на тонком шесте и оперативно спускаться с него, не падая на платформу, в которую был закреплён шест, причём разницы между показателями в группах контрольных и обработанных МФТП выявлено не было (**Рис. 12**).

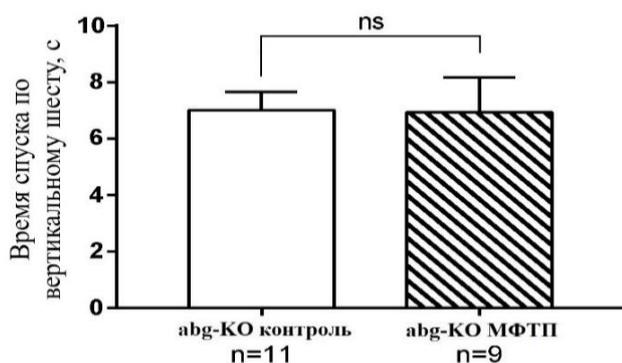


Рисунок 12. Анализ двигательной активности у животных линии *abg-KO* в тесте «вертикальный шест». $p > 0.05$, $M \pm SEM$. Тест Манна-Уитни (Mann–Whitney U-test).

Координация движений и мышечная сила конечностей, оцененные по способности мышей удерживаться на перевернутой сетке, также не различались между группами: все животные успешно удерживались в течение всего времени теста, которое составляло 60 секунд (**Рис. 13**).

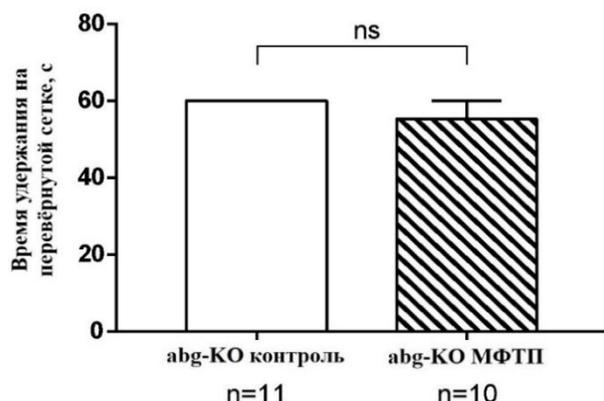


Рисунок 13. Исследование мышечной силы у бессинуклеиновых мышей в тесте «перевернутая сетка». $p > 0,05$, $M \pm SEM$. Тест Манна-Уитни (Mann-Whitney U-test).

Таким образом, нами было установлено, что базовые моторные тесты не выявили МФТП-индуцированных изменений у бессинуклеиновых мышей линии abg-KO. Анализ двигательной функции на установке CatWalk показал, что у животных дикого типа, МФТП достоверно изменяет множество параметров, описывающих походку. В то же время, у abg-KO животных под действием МФТП не изменяется ни один из 250 параметров, детектируемых установкой CatWalk (Noldus) (**Рис. 14**).

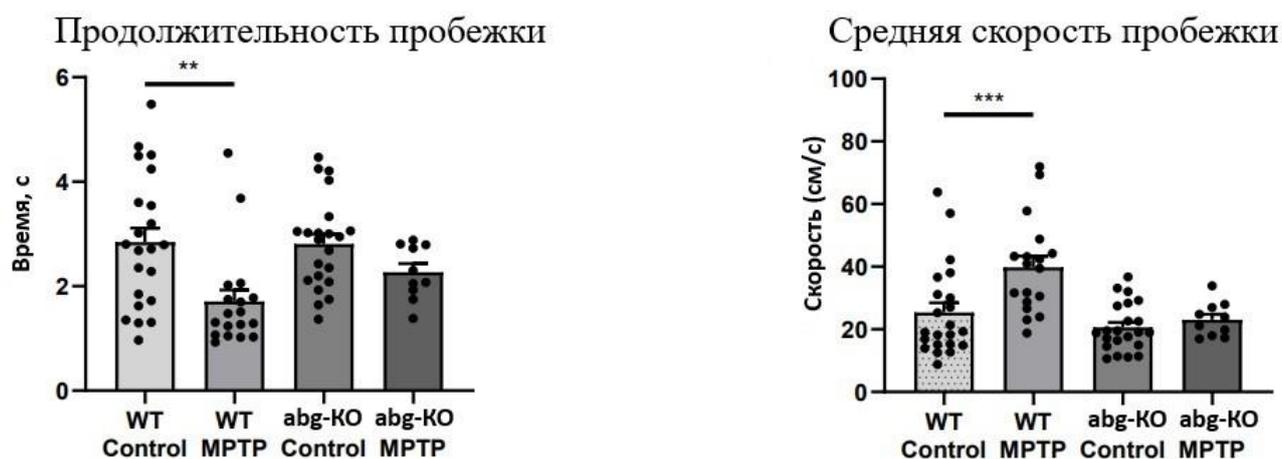


Рисунок 14. Устойчивость к нарушениям походки линии abg-KO, регистрируемая на установке CatWalk (Noldus) на примере параметров «Продолжительность пробежки» и «Средняя скорость пробежки», характеризующих брадикинезию у мышей. One-way ANOVA в сочетании с критерием сравнения Сидака (** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

Исследование дофаминового статуса в стриатуме у бессинуклеиновых мышей

Образцы подвергались исследованию методом ВЭЖХ для количественного определения уровня дофамина (ДА) и его метаболитов – ДОФУК и ГВК – аналогичным методом, использованным ранее для альфа-синуклеин дефицитных животных.

Полученные результаты измерения уровней дофамина и его метаболитов в стриатуме животных линии *abg-KO* продемонстрировали схожую с альфа-синуклеин дефицитными мышами клиническую картину (Рис. 15). Так, уровни дофамина достоверно снижались в контрольной и экспериментальной группах животных после введения МФТП, а соотношение содержания продуктов катаболизма дофамина (ДОФУК+ГВК/ДА) повышалось вследствие активного истощения молекул ДА в синаптических окончаниях ДА-ергических нейронов. Однако стоит отметить, что у бессинуклеиновых животных, принимавших физраствор, обнаружено статистически значимое снижение уровня дофамина, ДОФУК и ГВК относительно контрольных животных дикого типа (WT), что может свидетельствовать о недостаточности функциональных белков семейства синуклеинов в регуляции дофаминовой нейротрансмиссии.

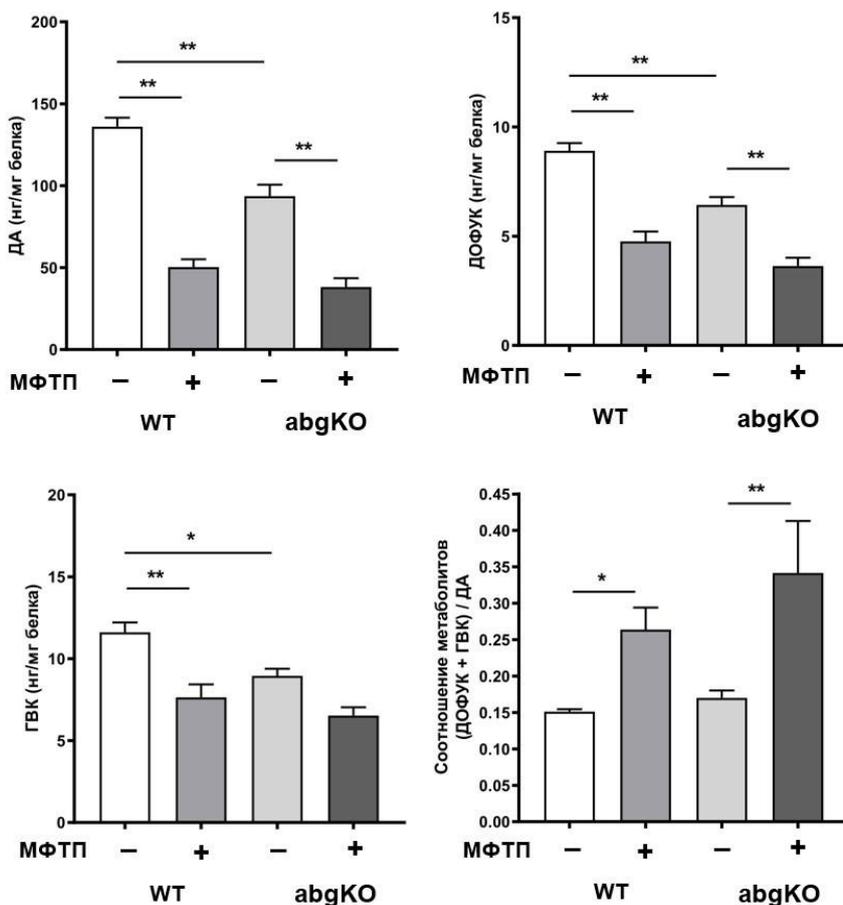


Рисунок 15. ВЭЖХ-анализ уровней дофамина и его метаболитов в стриатуме мышей после введения МФТП линии бессинуклеиновых мышей ($M \pm SEM$, $n = 10$; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$).

One-way ANOVA) с применением критерия множественных сравнений Тьюки.

Сравнительный морфометрический анализ ДА-ергических нейронов ЧС и ВОП у мышей линии *abg-KO* и животных с немодифицированным геномом

Для выяснения влияния других гомологичных членов семейства синуклеинов на выживаемость ДА-ергических нейронов ЧС и ВОП в условиях МФТП-нейротоксичности был проведён сравнительный морфометрический анализ числа ТГ-позитивно окрашенных клеток в соответствующих анатомических структурах, избирательно поражаемых при БП.

У бессинуклеиновых мышей и контрольных животных дикого типа, получавших МФТП, было показано практически одинаковое достоверное снижение числа нейронов в компактной части чёрной субстанции (**Рис. 16**).

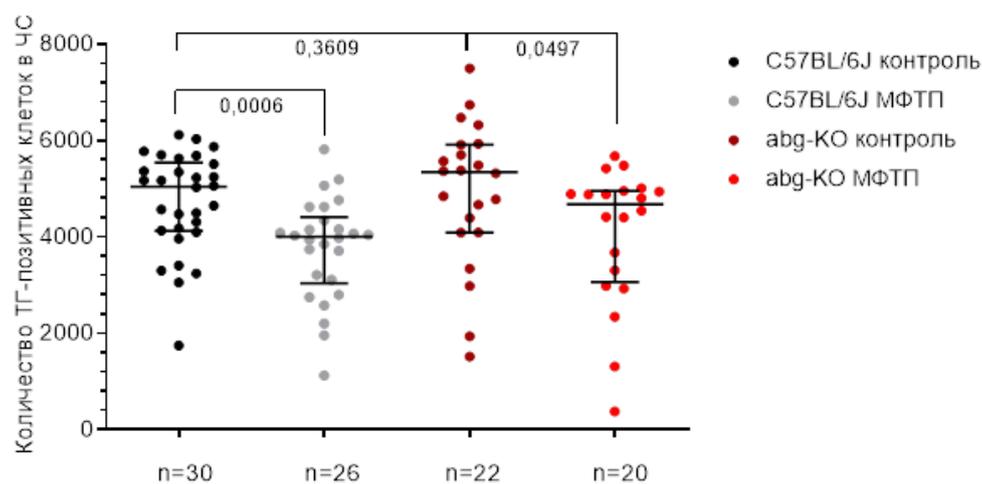


Рисунок 16. Популяция ДА-ергических нейронов ЧС у бессинуклеиновых и контрольных мышей с немодифицированным геномом. Ме [25%; 75%] числа стереологически подсчитанных нейронов в компактной части ЧС животных каждого генотипа.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что наличие в геноме всех членов семейства синуклеинов не является необходимым для МФТП-индуцированной гибели ДА-ергических нейронов. Однако недавно было установлено, что β -синуклеин способен активизировать VMAT-2-зависимый захват дофамина и структурно подобных ему молекул (например, конечный метаболит МФТП – 1-метил-4-фенил пиридиний (МФП⁺)) синаптическими везикулами для дальнейшей их секвестрации [Ninkina N. et al., 2021]. Таким образом, вероятно, повышенная активность β -синуклеина в синаптических везикулах, а не дефицит других синуклеинов как таковых, объясняет пониженную чувствительность ДА-ергических нейронов ЧС к токсическому эффекту МФТП у альфа-синуклеин нокаутных животных.

Морфометрический анализ ТГ-позитивных клеток в вентральной области покрышки среднего мозга показал, что ДА-ергические нейроны ВОП

мышей линии abg-KO более устойчивы к токсическому воздействию нейротоксина МФТП. В свою очередь у бессинуклеиновых животных, принимавших физраствор, не наблюдается изменений в числе ДА-ергических нейронов ВОП по сравнению с животными дикого типа (**Рис. 17**).

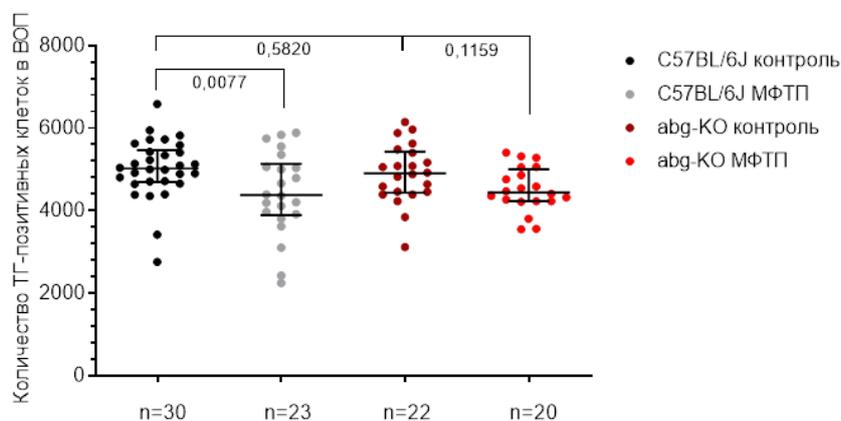


Рисунок 17. Популяция ДА-ергических нейронов ВОП у бессинуклеиновых и контрольных мышей с немодифицированным геномом. $M \pm SEM$ числа стереологически подсчитанных нейронов в ВОП. One-way ANOVA в сочетании с критерием Фишера (PLSD post-hoc).

Соответственно, при генетическом «выключении» всех белков-синуклеинов в условиях МФТП-нейротоксичности развиваются типичные патоморфологические особенности паркинсонического синдрома. Важно отметить, что ДА-ергические нейроны вентральной области покрышки у мышей линии abg-KO менее чувствительны к действию МФТП относительно контрольных животных дикого типа.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, на основании всех исследований предполагается, что различия в чувствительности к нейротоксину МФТП обусловлены и являются следствием онтогенетической селекции ранних нейронов с последующей компенсацией бета-синуклеином, оптимизирующим захват ДА синапсами, за счет механизмов пластичности эмбрионального мозга. Это подтверждается данными по МФТП-токсичности на бессинуклеиновых животных с инактивированием всех 3-х генов синуклеинов. В сравнении с одиночными нокаутами по альфа- или гамма-синуклеину у животных с тройным нокаутом чувствительность ДА-ергических нейронов к токсическому воздействию МФТП выше и почти не отличается от чувствительности у контрольных животных дикого типа, что согласуется с другими исследованиями.

Полученные нами результаты указывают на важную роль альфа-синуклеина и других членов семейства синуклеинов в обороте дофамина в пресинаптических окончаниях, выживаемости дофаминергических нейронов, а также проявлении ранних признаков паркинсонизма, что в сочетании с уже имеющимися в настоящее время данными позволяет рассматривать белки этого

семейства в качестве перспективных молекулярных мишеней для разработки терапии, направленной на оптимизацию функции синапсов ДА-ергических нейронов. А использованные в работе генетически «бесследовые» нокаутные линии Δ Floх-КО и abg-КО – в качестве перспективных модельных систем для исследования механизмов нейродегенеративных процессов при синуклеинопатиях.

ВЫВОДЫ

1. На МФТП-индуцированной модели паркинсонического синдрома у мышей с генетическим нокаутом альфа-синуклеина показано, что выраженность проявлений гипокинезии (интенсивность нажатия конечностей на пластину) сходна с таковой у животных с немодифицированным геномом.
2. Выявлено снижение общего количества ДА-ергических нейронов в ЧС взрослых мышей Abel-КО и Δ Floх-КО на 20-22% относительно контрольных мышей дикого типа (C57BL/6J). Введение МФТП вызвало снижение числа ДА-ергических нейронов компактной части ЧС на 25% у мышей дикого типа, на 2,7% у мышей линии Abel-КО, а в линии Δ Floх-КО снижения числа нейронов в популяции не отмечено, что иллюстрирует устойчивость альфа-синуклеин нокаутных линий к токсическому эффекту МФТП.
3. Установлено, что общее число ДА-ергических нейронов вентральной области покрышки (ВОП) в двух линиях с избирательной инактивацией альфа-синуклеина снижается на ~30% относительно животных с немодифицированным геномом. В этой популяции также отмечается устойчивость к токсическому воздействию МФТП.
4. Показано снижение уровня дофамина (ДА) и его метаболитов (ДОФУК и ГВК) у альфа-синуклеин нокаутных мышей в условиях МФТП-индуцированного паркинсонического синдрома, причем данный эффект в линии Abel-КО был менее выраженным. Изменений уровня серотонина во всех линиях исследуемых мышей не отмечено.
5. Показано, что генетическая инактивация всех трёх членов семейства синуклеинов в условиях МФТП-индуцированного паркинсонизма не влияет на выживаемость ДА-ергических нейронов ЧС и ВОП, а также на уровень дофамина и продуктов его метаболизма, по всей вероятности, вследствие дефицита бета-синуклеина, регулирующего VMAT-2-зависимый захват моноаминов синаптическими пузырьками.
6. Генетические модификации локуса альфа-синуклеина в линии Δ Floх-КО не влияют на уровни экспрессии соседнего гена мультимерин 1, в то время как привнесённые посторонние регуляторные последовательности в линии Abel-КО повышают уровни экспрессии этого гена в коре головного мозга в 35 раз.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Использование линии ΔFlox-КО является наиболее предпочтительным для моделирования потери функции альфа-синуклеина.
2. Элементы технологии CatWalk могут стать перспективной основой для разработки высокочувствительного неинвазивного метода ранней диагностики двигательных нарушений при БП.

СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ

Статьи в рецензируемых научных изданиях по специальности

3.3.3 – патологическая физиология, и приравненные к ним публикации

1. Tarasova T.V., Lytkina O.A., **Goloborshcheva V.V.**, Skuratovskaya L.N., Antohin A.I., Ovchinnikov R.K., Kukharsky M.S. Genetic inactivation of alpha-synuclein affects embryonic development of dopaminergic neurons of the substantia nigra, but not the ventral tegmental area, in mouse brain // PeerJ. – 2018. – V. 6. – P. e4779; DOI: 10.7717/peerj.4779; IF = 2.2 (JCR) **Q2**
2. Нинкина Н.Н., Тарасова Т.В., Чапров К.Д., **Голоборщева В.В.**, Бачурин С.О., Бухман В.Л. Дефицит синуклеинов снижает эффективность захвата дофамина синаптическими везикулами. // Доклады Академии наук. – 2019. – Т. 486. – № 1. – С. 114-117. DOI: 10.31857/S0869-5652486114-117
3. **Goloborshcheva V.V.**, Chaprov K.D., Teterina E.V., Ovchinnikov R., Buchman V.L. Reduced complement of dopaminergic neurons in the substantia nigra pars compacta of mice with a constitutive genetic knockout of alpha-synuclein // Mol Brain. – 2020. – V. 13. – № 1. – P. 75. DOI: 10.1186/s13041-020-00613-5; **Q1**
4. Чапров К.Д., **Голоборщева В.В.**, Тарасова Т.В., Тетерина Е.В., Корокин, М.В., Солдатов В.О., Покровский М.В., Кучеряну В.Г., Морозов С.Г., Овчинников Р.К. Повышение экспрессии гена мультимерина-1 в нервной системе мышей как результат геномной модификации локуса альфа-синуклеина. Доклады Академии наук. Науки о жизни. – 2020. – Т. 494 – С. 537–540. Doi: 10.31857/S2686738920050078
5. Чапров К.Д., Тетерина Е.В., Роман А.Ю., Иванова Т.А., **Голоборщева В.В.**, Кучеряну В.Г., Морозов С.Г., Лысикова Е.А., Лыткина О.А., Королева И.В., Попова Н.Я., Антохин А.И., Овчинников Р.К., Кухарский М.С. Сравнительный анализ нейротоксического эффекта МФТП на двух линиях мышей с конститутивным нокаутом гена альфа-синуклеина // Молекулярная биология – 2021. – Том 55, №1, с. 152-163. DOI: 10.31857 / S0026898421010031
6. **Голоборщева В.В.**, Воронина Н.А., Овчинников Р.К., Кучеряну В.Г., Морозов С.Г. Моделирование МФТП-индуцированного паркинсонизма на генетически модифицированных мышах // Патогенез. – 2021. –Т. 19, № 2. – С. 12-23. DOI: 10.25557/2310-0435.2021.02.12-23
7. **Голоборщева В.В.**, Воронина Н.А., Овчинников Р.К., Кучеряну В.Г., Морозов С.Г. Морфометрический анализ дофаминергических нейронов черной субстанции головного мозга мышей с генетическим нокаутом альфа-синуклеина при МФТП-индуцированном паркинсонизме // Патогенез. – 2021. – Т. 19. – №3 – С. 32-37. DOI: 10.25557/2310-0435.2021.03.32-37

Материалы конференций (тезисы)

1. **Голоборщева В.В.** Активация экспрессии мультимерина-1 вследствие модификации локуса альфа-синуклеина в геноме мыши. Сборник тезисов докладов VIII Конференции Молодых Учёных ИФАВ РАН/ под редакцией С.Г. Клочкова и М.Е. Негановой. – Черногоровка, 14 декабря 2018. ISBN 978-5-91845-084-0. УДК 616.894-053.8; 541.69:54(091), стр 6.
2. Е.В. Тетерина, **В.В. Голоборщева**, Р.К. Овчинников, А.Ю. Роман, В.Л. Бухман. Исследование роли дефицита альфа-синуклеина в механизме токсического повреждения дофаминергических нейронов черной субстанции. // АСТА NATURAE. - 2019. – Т. 11, № S2. – С. 229-230; ISBN 978-5-00150-521-1
3. Тетерина Е.В., **Голоборщева В.В.**, Иванова Т.А. Овчинников Р.К. Исследование роли альфа-синуклеина в механизме токсического повреждения дофаминергических нейронов черной субстанции // Актуальные проблемы биомедицины – 2020 Секция «Патофизиология»: Сборник тезисов XXVI Всероссийской конференции молодых учёных с международным участием, Санкт-Петербург, 26-27 марта 2020 г. – СПб.: РИЦ ПСПбГМУ, 2020. – 180 - 182 с. ISBN 978-5-88999-640-8
4. Чапров К.Д., **Голоборщева В.В.**, Тетерина Е.В., Кучеряну В.Г., Морозов С.Г., Овчинников Р.К. Исследование роли белков семейства синуклеинов в механизме токсического повреждения дофаминергических нейронов черной субстанции // Нейронаука для медицины и психологии: XVI Международный междисциплинарный конгресс. Судак, Крым, Россия; 3–13 июня 2020 г.: Труды Конгресса – Москва: МАКС Пресс, 2020. – 505-506 с. ISBN 978-5-317-06406-8 // e-ISBN 978-5-317-06407-5 <https://doi.org/10.29003/m1325.sudak.ns2020-16/505-506>
5. **Valeria V. Goloborshcheva**, Ruslan K. Ovchinnikov, Victor B. Narkevich, Vladimir S. Kudrin, Kirill D. Chaprov. Similarities and differences in the responses of wild type and triple synuclein knockout mice to sub-chronic MPTP treatment// NEURONUS 2020 IBRO Neuroscience Forum 8-11 December 2020
6. **Голоборщева В.В.**, Тетерина Е.В., Воронина Н.А., Овчинников Р.К., Кучеряну В.Г., член-корреспондент РАН Морозов С.Г. Исследование чувствительности Дофаминергических нейронов к МФТП у мышей с избирательной инактивацией гена альфа-синуклеина // Симпозиум «Нейродегенеративные заболевания: от фундаментальных знаний механизмов патогенеза до диагностики и лечения». VII Съезд физиологов СНГ с международным участием в Сочи (Дагомыс) 3-7 октября 2021г.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

БП – болезнь Паркинсона
 ДА – дофаминергические нейроны
 ЧС – черная субстанция
 ВОП – вентральная область покрышки
 ПЦР – полимеразная цепная реакция
 МФТП – 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридин
 ТГ (ТН) – тирозингидроксилаза
 КО (англ. knock out) – нокаут
 ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография
 ДОФУК – диоксифенилуксусная кислота
 ГВК – гомованилиновая кислота
 Snca – ген, кодирующий альфа-синуклеин
 Mmrn1 – ген, кодирующий мультимерин
 ДТ/WT (англ. wild type) – дикий тип, мыши линии C57Bl/6J
 ИГХ – иммуногистохимическое окрашивание