

Нейропротекторный потенциал β - и γ -синуклеинов в условиях МФТП-индуцированного паркинсонизма при прижизненной инактивации α -синуклеина

Хизева Анастасия Андреевна

Болезнь Паркинсона является вторым по распространенности нейродегенеративным заболеванием, патогенез которого тесно связан с дисфункцией пресинаптического белка альфа-синуклеина, патологическая агрегация которого приводит к образованию телец Леви и селективной гибели дофаминергических нейронов черной субстанции. Альфа-синуклеин играет ключевую роль в оптимизации синаптической передачи, регуляции оборота дофамина и кластеризации синаптических везикул. Высокая степень гомологии с другими представителями семейства — бета- и гамма-синуклеинами, а также их эволюционный консерватизм позволяют предположить наличие компенсаторных механизмов в центральной нервной системе, способных частично замещать функции альфа-синуклеина при его дисфункции. Изучение этих механизмов на ранних, досимптоматических стадиях патологии открывает перспективы для поиска новых биомаркеров и разработки нейропротекторных стратегий.

Целью данного исследования является комплексная оценка восприимчивости дофаминергических нейронов и компенсаторного потенциала белков бета- и гамма-синуклеинов при субхроническом токсическом воздействии нейротоксина МФТП (1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридин) на фоне прижизненной инактивации гена альфа-синуклеина (*SNCA*) у мышей разного возраста и пола.

Исследование выполнено на оригинальной линии мышей с генетической конструкцией, позволяющей осуществлять прижизненную нейрон-специфичную инактивацию гена альфа-синуклеина (*SNCA*). Линия была получена путем серии скрещиваний коровой линии, второй экзон гена *SNCA* которой фланкирован двумя *loxP*-сайтами, со вспомогательной линией, несущей трансгенную кассету, содержащую Стрекомбиназу, конъюгированную с эстрогеновым рецептором, под контролем нейрон-специфичного промотора, осуществляющую сайт-специфическую рекомбинацию. Применение данной модели позволяет индуцировать делецию гена на любой точке постнатального развития, что дает возможность изучать роль альфа-синуклеина в зрелом организме, избегая эффектов его отсутствия в ходе развития.

Инактивацию гена *SNCA* индуцировали у животных в возрасте 9 и 12 месяцев путем внутрибрюшинного введения тамоксифена в дозе 100 мг/кг ежедневно в течение пяти дней. По прошествии трех месяцев – времени, необходимого для выведения остаточного белка

альфа-синуклеина - проводили моделирование паркинсонического синдрома. С этой целью проводили субхроническое внутрибрюшинное введение нейротоксина 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридина (МФТП) в дозе 30 мг/кг (в 0,9% растворе NaCl) на протяжении пяти последовательных дней. Данный протокол введения позволяет воспроизвести постепенную, апоптотическую гибель дофаминергических нейронов, характерную для ранних стадий нейродегенеративного процесса у человека. В эксперимент были включены разновозрастные животные обоего пола для оценки потенциальных возраст-ингендерзависимых различий в восприимчивости к нейротоксину и проявлении компенсаторных реакций.

Оценку функционального состояния животных проводили через 21 день после последней инъекции нейротоксина, когда происходит стабилизация дофаминергической системы в ответ на нейротоксическое повреждение, с помощью батареи поведенческих тестов. Для оценки базовых моторных функций и координации движений использовали тест «Перевернутая сетка», фиксирующий время удержания животного на перевернутой решетке, позволяющее судить о мышечной силе и моторном контроле. В тесте «Ускоряющийся вращающийся стержень ротарод» (UgoBasile, Италия) регистрировали латентное время падения с ускоряющегося цилиндра, что позволяет оценить способность животных к поддержанию равновесия и адаптации к меняющимся двигательным нагрузкам. Исследовательскую активность и уровень тревожности оценивали в тесте «Открытое поле» в течение 30 минут с использованием системы видеотрекинга EthoVision (Noldus, Нидерланды). Анализировали общее пройденное расстояние, динамику двигательной активности по пятиминутным интервалам и время, проведенное в центральной зоне арены. Для выявления тонких двигательных нарушений локомоции и постуральных особенностей, не детектируемых базовыми тестами, проводили высокочувствительный анализ походки с применением автоматизированной системы CatWalk XT (Noldus, Нидерланды). Данный подход позволяет количественно оценить около 200 параметров походки и выявить скрытые нарушения, которые могут служить ранними маркерами моторных отклонений. Полученный многомерный массив данных подвергали снижению размерности с помощью анализа главных компонент (РСА) для выявления групп животных, различающихся по двигательным паттернам.

По завершении поведенческого тестирования производили эвтаназию животных с последующим забором биологического материала. В дорзальном стриатуме методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) определяли уровни дофамина (ДА) и его основных метаболитов: 3,4-дигидроксифенилуксусной кислоты (DOPAC), гомованилиновой кислоты (HVA) и 3-метокситирамина (3-МТ). Содержание

нейромедиаторов и их метаболитов нормализовали на общий белок и выражали в пмоль/мг белка. Анализ соотношения метаболитов позволяет дифференцировать вклад внутри- и внесинаптических путей катаболизма дофамина в стабилизацию дофаминергической системы в ответ на введение нейротоксина и косвенно оценивать функциональную активность дофаминергических терминалей. В префронтальной коре методом количественной ПЦР в реальном времени (qPCR) анализировали относительную экспрессию генов альфа-, бета- и гамма-синуклеинов, а также генов тирозингидроксилазы и синаптофизина. Оценка транскрипционной активности членов семейства синуклеинов необходима для выявления компенсаторных изменений в экспрессии гомологичных белков. Изменение экспрессии тирозингидроксилазы и синаптофизина позволяет судить о нарушениях в синтезе дофамина и целостности синаптических окончаний.

Для оценки сохранности дофаминергических нейронов проводили морфометрический анализ. Выполняли иммуногистохимическое окрашивание серии срезов антителами против тирозингидроксилазы (ТГ). Морфометрический подсчет ТГ-положительных нейронов осуществляли в компактной части черной субстанции и вентральной области покрышки. Количественная оценка популяции нейронов в этих ключевых структурах нигростриарной и мезокортикальной дофаминергических систем, наиболее уязвимых при развитии патологии, является прямым методом определения степени нейродегенерации и позволяет соотнести поведенческие и нейрохимические изменения с гибелью клеток.

Исследование выполнено в рамках гранта РФФИ № 25-74-10084.