

Кохан Виктор Сергеевич

Характеристика фенотипических особенностей нокаутных мышей с направленной инактивацией генов семейства синуклеинов

03.01.04 – биохимия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

Черноголовка – 2012

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте физиологически активных веществ Российской академии наук и в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук.

Научный руководитель:

кандидат биологических наук
Нинкина Наталья Николаевна

Официальные оппоненты:

Ярыгин Константин Никитич
доктор биологических наук, профессор,
член-корреспондент РАН, ФГБУ «ИБМХ»
РАН, заведующий лабораторией

Дейкин Алексей Васильевич
кандидат биологических наук, ФГБУН
Институт биологии гена РАН, научный
сотрудник

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное
учреждение «Научно-исследовательский
институт нормальной физиологии им. П.К.
Анохина» Российской академии медицинских
наук

Защита состоится «12» апреля 2012 г. в 14 часов на заседании диссертационного совета Д 001.010.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н.Ореховича» Российской академии медицинских наук (ФГБУ «ИБМХ» РАН) по адресу: 119121, Москва, ул. Погодинская, 10 стр. 8.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБУ «ИБМХ» РАН.

Автореферат разослан « » _____ 2012 года.

Ученый секретарь
диссертационного совета, к.х.н.

Е.А.Карпова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Белки синуклеины участвуют в патогенезе целого ряда нейродегенеративных заболеваний. В частности, нарушение метаболизма α -синуклеина является важным звеном патогенеза болезни Паркинсона, деменции с диффузными тельцами Леви, мультисистемной атрофии, некоторых форм болезни Альцгеймера и других нейродегенеративных состояний. Заболевания, в основе которых лежит патологическая агрегация синуклеинов, получили общее название синуклеинопатий. Синуклеинопатии часто сопровождаются психо-эмоциональными и когнитивными расстройствами. Интенсивное изучение семейства синуклеинов позволило получить многочисленные данные о роли синуклеинов в патологических процессах, однако не привели к окончательному пониманию нормальной функции этих белков. В настоящее время имеются данные о роли синуклеинов в рециркуляции синаптических везикул и функционировании моноаминергической нейромедиаторной передачи, получены данные, указывающие на их возможную шаперонную активность. При этом мало изученным остаётся вопрос об участии синуклеинов в регуляции функций высшей нервной деятельности, модуляции психо-эмоциональных состояний – таких процессов, патологическое нарушение которых часто сопровождает течение синуклеинопатий.

Генетически модифицированные животные в настоящее время широко используются в качестве модельных систем для изучения функций синуклеинов. На данный момент создано множество как клеточных, так и животных трансгенных и нокаутных по генам синуклеинов моделей для изучения нормальных функций этих белков и для разработки терапевтических средств для лечения заболеваний с нарушением нормальных функций синуклеинов.

Цель и задачи исследования. Целью работы являлось изучение эффектов хронического нарушения функции пресинаптических белков синуклеинов с использованием линий нокаутных мышей, в геноме которых инактивированы гены α -синуклеина, β -синуклеина, γ -синуклеина или все три члена семейства одновременно. В задачи работы входило:

1. Исследование влияния хронического нарушения функции синуклеинов на метаболизм дофамина в нигростриарной системе нокаутных по генам α - и γ -синуклеинов стареющих мышей.

2. Анализ содержания синаптических маркерных белков в стриатуме нокаутных по генам α - и γ -синуклеинов стареющих мышей.

3. Изучение локомоторной и амфетамин-индуцированной локомоторной активностей α - и γ -синуклеин-нокаутных мышей разных возрастных групп с целью оценки состояния их дофаминергической системы.

4. Исследование влияния недостаточности синуклеинов на эмоциональный статус и когнитивные способности мышей.

Научная новизна работы. В ходе выполнения работы впервые:

- показано, что отсутствие α -синуклеина приводит к снижению уровня дофамина и его метаболита, гомованилиновой кислоты, в стриатуме стареющих модельных мышей;
- установлено, что дефицит α -синуклеина ведёт к уменьшению содержания амфифизина и синаптотагмина в стриатуме стареющих мышей, что является указанием на нарушение синаптической пластичности;
- показано, что в условиях хронической недостаточности синуклеинов изменяется функциональное состояние дофаминергической нейромедиаторной системы при старении;
- показано, что истощение нормальной функции синуклеинов сопровождается нарушением когнитивной функции и изменениями в эмоциональном статусе модельных животных.

Практическая значимость. Характеристика линий мышей с направленной инактивацией генов семейства синуклеинов, выполненная в рамках данной работы, позволила выявить новые аспекты физиологических функций белков синуклеинов. Установленные нарушения рециркуляции синаптических везикул, а также гомеостаза дофамина в нигростриарной системе в отсутствие α -синуклеина могут служить новой фармакологической мишенью при терапии синуклеинопатий. Полученные данные о роли синуклеинов в формировании

психо-эмоционального статуса и развитии когнитивных способностей позволяют объяснить нарушение этих функций при нейродегенеративных процессах, что может быть использовано не только для отбора препаратов – корректоров расстройств настроения и ноотропных веществ, но и для дальнейшего изучения генетических основ поведения. Охарактеризованные линии мышей с инактивированными генами α - и γ -синуклеинов могут быть применены в качестве моделей при изучении новых аспектов нейродегенерации, сопровождающей синуклеинопатии.

Апробация работы. Основные результаты диссертационной работы были представлены на 3-й Международной конференции "Новейшие научные достижения" (София, Болгария, 2010), на 14-ой Мультидисциплинарной международной конференции по нейронаукам и биопсихиатрии "Стресс и поведение" (Санкт-Петербург, Россия, 2010), на Всероссийской молодёжной школе-конференции "Нейробиология интегративных функций мозга" (Санкт-Петербург, Россия, 2011), на конференции по научному направлению Российской академии наук "Фундаментальные науки – Медицине" в 2011 году, на 19-ом Международном конгрессе по болезни Паркинсона и сопутствующим заболеваниям (Шанхай, Китай, 2011).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 9 печатных работ, в том числе 4 статьи в периодических изданиях, включённых в перечень ВАК, и 5 публикаций в сборниках докладов научных конференций.

Структура и объём работы. Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов, обсуждения, выводов и списка цитированной литературы. Работа изложена на 157 страницах, иллюстрирована 31 рисунком и 9 таблицами. Список цитированной литературы включает 285 источников.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Экспериментальные животные. В работе использовали линии генетически модифицированных мышей с направленной инактивацией генов α -синуклеина (α -

КО), β -синуклеина (β -КО) или γ -синуклеина (γ -КО) на генетическом фоне C57Bl6J (Charles River Laboratories, США). Линия мышей с тройной делецией генов α -, β - и γ -синуклеинов ($\alpha\beta\gamma$ -КО) была получена путём перекрёстного скрещивания нокаутных по каждому из синуклеинов животных. Контрольные животные, не содержащие модификаций генома (WT), были на том же генетическом фоне.

Генотипирование. Геномную ДНК выделяли из биопсий уха или хвоста исследуемого животного методом фенольной экстракции. Генотипирование проводили методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с последующим разделением фрагментов в агарозном геле.

Анализ белков методом иммуноблоттинга. Образцы тканей гомогенизировали в двукратном буфере для нанесения в системе денатурирующего полиакриламидного гель-электрофореза (ПААГ) по Лэммли и инкубировали 5 мин при 100⁰С. Для каждого образца объединяли материал, полученный как минимум от 4-х животных. Общий белок в лизатах определяли методом Бредфорда. Оценку содержания α - и γ -синуклеинов проводили в тканях чёрной субстанции и прилежащих участках среднего мозга. Оценку содержания остальных белков проводили в тканях стриатума. Анализируемые образцы (в пересчёте на 10 мкг общего белка) разделяли в 8%-, 12%-, 16%- или 18%-ном ПААГ. После разделения в геле белки переносили на Hybond-P мембрану (Amersham, Великобритания) в приборе для полусухого электроблоттинга, после чего мембрану инкубировали с первичными антителами против исследуемых белков: γ -синуклеина (поликлональные, клон SK23 разведение 1:500), α -синуклеина (поликлональные, клон AB5334P, Chemicon, США, разведение 1:1000), тирозингидроксилазы (ТН) (моноклональные, клон ТН-2, Sigma, разведение 1:5000), транспортера дофамина (DAT) (поликлональные, Sigma, разведение 1:500), амфифизина (моноклональные, клон 15, BD Transduction Laboratories, США, разведение 1:10000), синаптофизина (моноклональные, клон 2, BD Transduction Laboratories, разведение 1:25000), синаптотагмина (моноклональные, клон ASV48, QED, США, разведение 1:5000), SNAP-25

(моноклональные, клон 20, BD Transduction Laboratories, разведение 1:1000), CSP (поликлональные, Santa Cruz, разведение 1:1000), глиального фибриллярного кислого белка (поликлональные Sigma, разведение 1:500). В качестве внутренних контролей использовали антитела против тубулина (моноклональные, клон DM1A, Sigma, США, разведение 1:10000), β -актина (моноклональные, клон AC-15, Sigma, США), или глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (GFAP) (моноклональные, клон 6C5, Santa Cruz Biotechnology, США). Детекцию проводили методом хемилюминесценции. Количественную оценку содержания белка осуществляли с помощью программного обеспечения AlphaImager 2200 (AlphaInnotech Corporation, США).

Определение содержания дофамина и его метаболитов. В возрасте 24-26 месяцев проводили эвтаназию экспериментальных животных путём введения летальной дозы пентобарбитала натрия внутрибрюшинно. Препарирование головного мозга и диссекцию стриатума проводили на льду. Ткани стриатума дезинтегрировали ультразвуком с использованием насадки 3 мм в течение 3 сек, перед проведением дезинтеграции к каждому образцу добавляли 95 мкл 0,4 М HClO_4 и 5 мкл раствора N- ω -5-НТ с концентрацией 40 мкг/мл (внешний стандарт). После ультразвуковой обработки образцы центрифугировали при 20000 g 25 мин при 4⁰С. Осадок замораживали и сохраняли для количественной оценки общего белка с помощью стандартного BCA protein assay reagent kit (Pierce, США). Супернатант использовали для анализа методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). Использовали обращённо-фазовую колонку (4.6x150 мм Microsorb C18, Varian). Детекцию проводили на приборе Decade II ECD (Antec Leyden, Нидерланды).

Поведенческие модели и тесты. Для оценки двигательной активности, когнитивных функций и эмоционального статуса использовали стандартные поведенческие тесты с некоторыми модификациями.

Амфетамин-индуцированный локомоторный ответ. Локомоторную активность регистрировали в установке Activity cage (Ugo Basile, Италия). В течение первых 30 мин мыши позволяли адаптироваться к новой обстановке,

затем вводили внутривенно водный раствор амфетамина 0.8 мг/мл из расчёта 4 мг/кг и регистрировали двигательную активность в течение 90 мин.

Оценку исследовательской активности, тревожности и депрессивно-подобного поведения проводили с помощью следующих тестов: *новая клетка* (камера 21.5x27.5 см), *тёмно-светлая камера* (OpenScience, Россия), *О-образный приподнятый лабиринт* (OpenScience, Россия), *открытое поле* (TruScan, CoulBourn instruments, США), *подвешивание за хвост* (Т-образный штатив с перекладиной на высоте 30 см), *Т-образный лабиринт* (высота стенок 12 см, ширина аллеи 5 см).

Оценку когнитивных способностей проводили с помощью следующих методик: *узнавание нового объекта и новой локации объекта*, *выработка условного рефлекса пассивного избегания (УРПИ)*, *выработка условного рефлекса активного избегания (УРАИ)*, *электростимул: однополярные прямоугольные импульсы напряжением 30 В и частотой 100 Гц, условный стимул: свет*), *водный лабиринт Морриса*.

Статистическая обработка. Статистическую обработку результатов проводили с помощью статистического пакета Statistica 8.0 (StatSoft Inc., США). Первоначально проводили проверку статистических гипотез распределения с помощью критерия Шапиро-Уилка. В зависимости от принятой гипотезы распределения признака и анализируемых групп статистическую обработку проводили с помощью параметрического t-критерия Стьюдента для зависимых или независимых выборок, непараметрических U-критерия Манна-Уитни или T-критерия Вилкоксона.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Формирование репрезентативных групп экспериментальных животных.

На первом этапе была проведена работа по созданию репрезентативных экспериментальных групп мышей разного возраста и соответствующих генотипов, которые формировались в соответствии с результатами генотипирования (рис. 1).

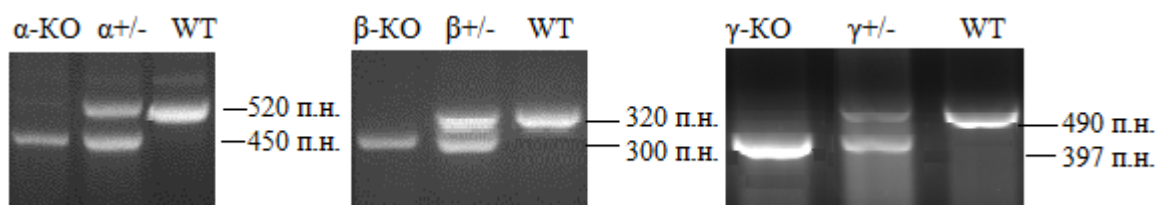


Рисунок 1. Генотипирование: анализ ПЦР-фрагментов в агарозном геле.

Анализ содержания α -синуклеина и γ -синуклеина в тканях мозга нокаутных мышей. В тканях мозга α -КО мышей содержание γ -синуклеина не отличалось существенно от такового в мозге WT мышей. В тканях мозга γ -КО также не выявлено заметного повышения содержания α -синуклеина (рис. 2). Таким образом, полученные нами в нокаутных моделях данные не являются результатом компенсаторного повышенного содержания в клетке одного из синуклеинов.

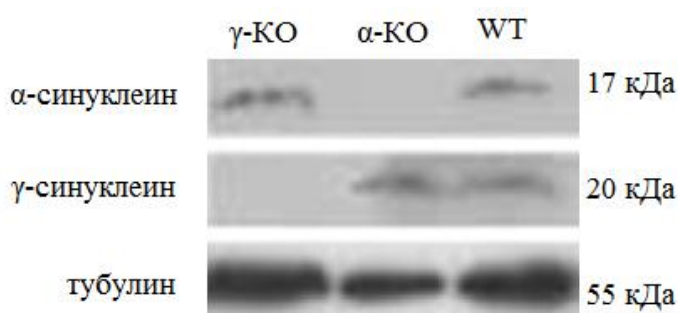


Рисунок 2. Детекция белков α - и γ -синуклеинов в тканях среднего мозга мышей методом иммуноблоттинга. Для анализа использовали 10 мкг тотального белка каждого генотипа.

Анализ уровня дофамина и его метаболитов в стриатуме. Одной из центральных задач данного исследования являлось изучение состояния синапсов дофаминергических нейронов (DA-нейроны) у стареющих животных и выявление патологических изменений, развивающихся с возрастом при нарушении функции синуклеинов. Поскольку синапсы DA-нейронов чёрной субстанции мозга лежат в стриатуме, было проанализировано содержание дофамина (DA), 3,4-диоксифенилуксусной (DOPAC) и гомованилиновой (HVA) кислот в этой морфологической области мозга.

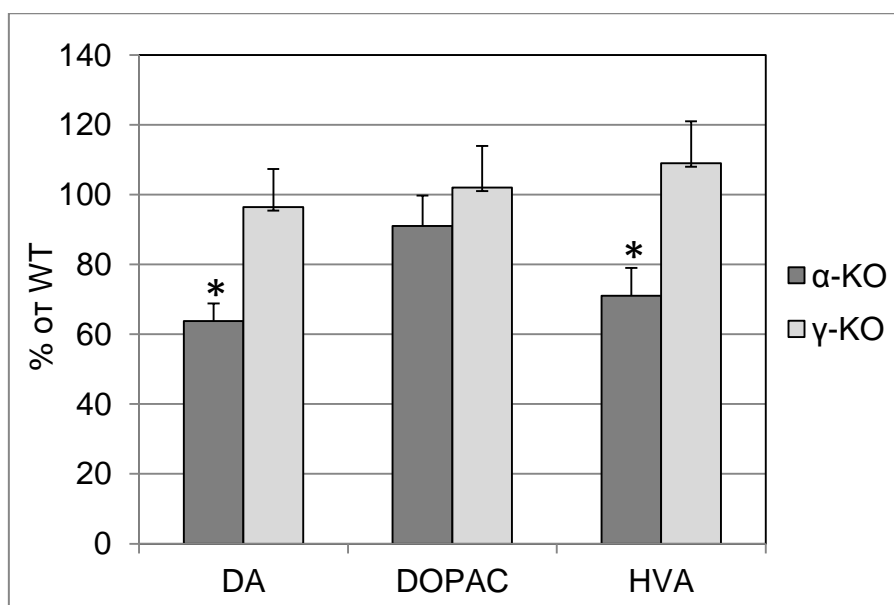


Рисунок 3. Уровень дофамина и его метаболитов в стриатуме стареющих мышей α -КО и γ -КО. Приведены относительные значения DA, DOPAC и HVA в сравнении с их количеством в стриатуме мышей WT того же возраста. $n_{WT} = 16$, $n_{\alpha-KO} = 11$, $n_{\gamma-KO} = 10$. Здесь и далее * – звёзд на строке: * – $p < 0.05$, ** – $p < 0.01$, *** – $p < 0.001$ (t -критерий Стьюдента, U -критерий Манна-Уитни или T -критерий Вилкоксона в зависимости от анализируемых переменных).

Уровни DA и его конечного продукта катаболизма, HVA, были значительно снижены в стриатуме стареющих α -КО мышей по сравнению с уровнями WT животных (рис. 3). Этот факт может свидетельствовать о дефиците DA-нейромедиаторной передачи в условиях отсутствия α -синуклеина. В то же время, мы не выявили изменения в концентрации DA и его метаболитов в стриатуме стареющих γ -КО мышей (рис. 3).

Анализ содержания маркеров дофаминергической нейромедиаторной передачи в стриатуме стареющих мышей. Общепринятым маркером для анализа уровня дофамина является содержание фермента тирозингидроксилазы (TH), катализирующего синтез DA. Одновременно, определение экспрессии DAT позволяет оценить функциональную активность DA-передачи, так как транспортер непосредственно участвует в прекращении потенцирования и поддержании гомеостаза DA, регулируя его обратный захват из синаптической щели. Нами было проанализировано содержание TH и DAT в образцах тотального белка из тканей стриатума стареющих животных.

У α -КО мышей был обнаружен выраженный дефицит TH (рис. 4), что может объяснять выявленный нами низкий уровень DA в стриатуме стареющих α -КО мышей. При этом, дефицит α -синуклеина также ведёт к снижению содержания DAT, что на фоне недостаточности синтеза DA может являться компенсаторным механизмом, обеспечивающим поддержание уровня DA в синаптической щели при общем нарушении DA-гомеостаза.

Напротив, отсутствие γ -синуклеина ведёт к увеличению содержания DAT в стриатуме γ -КО мышей (рис. 4), что также свидетельствует об изменениях в DA-передаче.

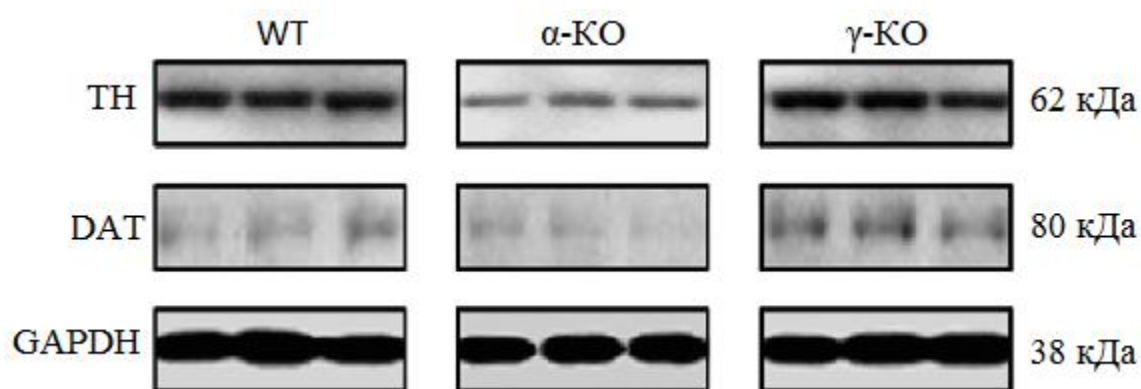


Рисунок 4. Анализ содержания TH и DAT в стриатуме синуклеин-дефицитных мышей методом иммуноблоттинга. GAPDH использован в качестве внутреннего контроля. $n_{WT} = 10$, $n_{\alpha-KO} = 10$, $n_{\gamma-KO} = 10$.

Анализ содержания синаптических белков в стриатуме стареющих мышей. Для характеристики синапсов в стриатуме стареющих животных было исследовано содержание синапс-специфических белков (рис. 5).

Содержание белка амфифизина, который участвует в эндоцитозе синаптических везикул, было существенно снижено у α -КО мышей и составляло 56.3% от количества, определяемого у WT мышей. Одновременно было снижено до уровня 71.5% содержание и другого синаптического белка – синаптотагмина. Синаптотагмин участвует в Ca^{2+} -зависимом связывании везикул с SNARE комплексом, которое необходимо для их экзоцитоза. Таким образом, в механизме синаптической недостаточности при хроническом дефиците α -синуклеина важным элементом является нарушение мембранного взаимодействия с

везикулами, что на фоне изменённого гомеостаза DA, должно вести к развитию патологии DA-опосредованной синаптической пластичности у α -КО мышей. Такого рода патология сопровождается поздние стадии синуклеинопатий, к которым относятся распространенные НДЗ – болезнь Паркинсона, деменция с тельцами Леви и др.

В данном исследовании отклонений в процессах экзо- и эндоцитоза синаптических везикул в синапсах стриатума γ -КО животных выявлено не было (рис. 5).

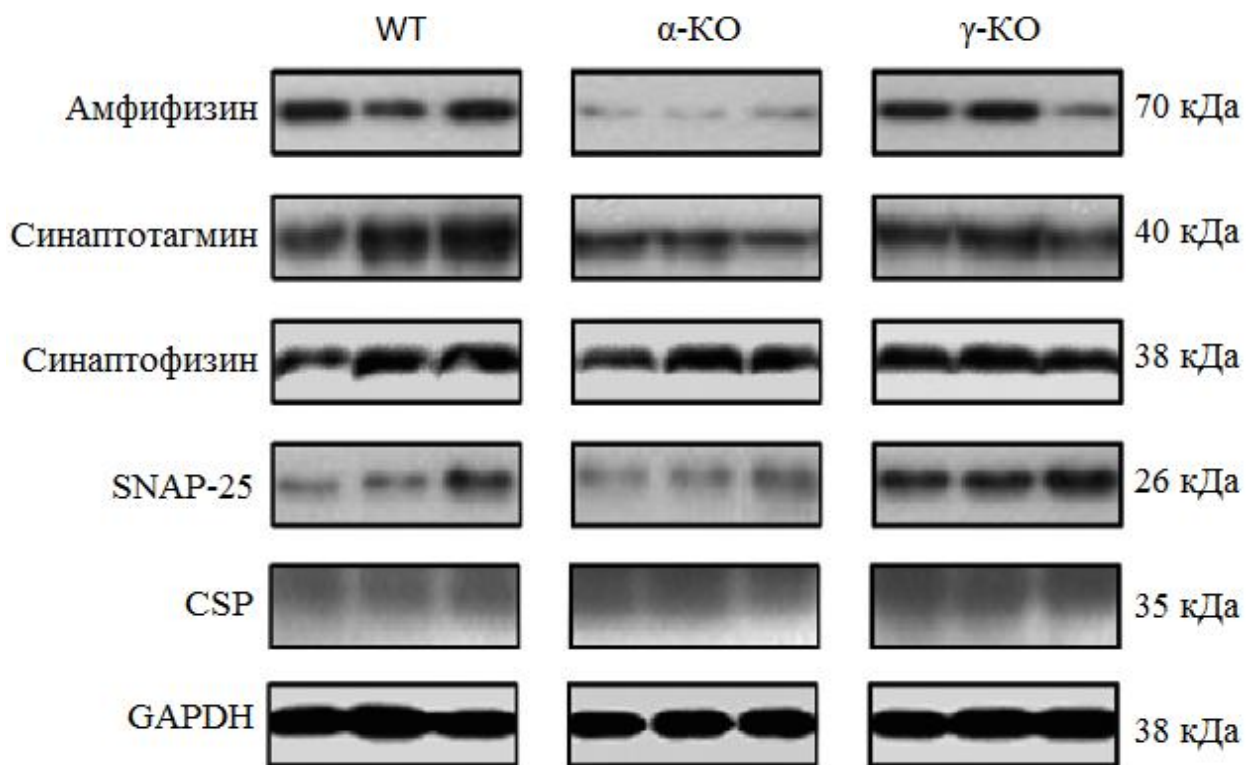


Рисунок 5. Анализ содержания синаптических белков в стриатуме стареющих мышей. В качестве внутреннего контроля на нижней панели приведены данные повторного инкубирования мембраны с антителами против GAPDH. $n_{WT} = 10$, $n_{\alpha-KO} = 10$, $n_{\gamma-KO} = 10$.

Исследование признаков специфической нейровоспалительной реакции в нервной системе стареющих мышей. Нейродегенеративные процессы часто сопровождаются нейровоспалительной реакцией. Если хроническое нарушение функции синуклеинов способствует развитию нейродегенеративных изменений в нервной системе модельных животных, то можно ожидать активацию маркеров нейровоспалительной реакции. Нами был проанализирован уровень GFAP в мозге

стареющих животных различного генотипа и было выявлено его повышенное содержание, как у α -КО, так и у γ -КО мышей на 22% по сравнению с уровнем WT животных (рис. 6).

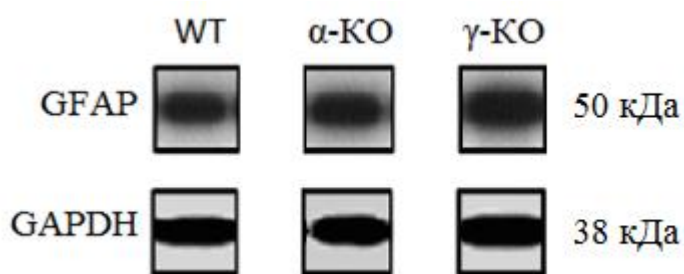


Рисунок 6. Содержание GFAP в тканях среднего мозга стареющих α -КО и γ -КО мышей.

Анализ функционального состояния дофаминергической нейромедиаторной системы у синуклеин-дефицитных мышей. Обнаруженные нами возрастные изменения дофаминового гомеостаза в стриатуме синуклеин-дефицитных мышей могут быть выявлены и подтверждены в специфических поведенческих тестах. Амфетамин стимулирует выброс DA в синаптическую щель, а также инвертирует действие DAT. Таким образом, содержание DA в синаптической щели стабильно повышается, что отражается на двигательной активности экспериментальных животных. Применение амфетамина позволяет перевести в синаптическую щель существенную часть имеющегося в пресинапсе DA (в том числе и из резервных пулов) и после этого оценить его общее содержание по параметрам двигательной активности в поведенческих тестах. Для валидации содержания DA в пресинаптических окончаниях синуклеин-дефицитных мышей нами был исследован амфетамин-индуцированный локомоторный ответ животных соответствующих генотипов (рис. 7, 8).

Повышенная локомоторная активность $\alpha\beta\gamma$ -КО отмечается с самого начала тестирования. В первые 30 минут перед введением амфетамина – время, необходимое для адаптации животных к экспериментальной камере, помещенные в новую обстановку $\alpha\beta\gamma$ -КО мыши гиперактивны, что обычно ассоциировано с индукцией DA системы, то есть увеличенной концентрацией DA в синаптической щели. Животные, у которых инактивирован только один из синуклеинов: α -КО, β -КО, γ -КО, до введения амфетамина практически не отличаются от контрольных

животных дикого типа. После введения амфетамина локомоторная активность контрольных мышей с немодифицированным геномом резко возрастает, так же ведут себя в тесте и β -КО животные. Однако, при недостаточности функции α -синуклеина или γ -синуклеина локомоторный ответ на введение амфетамина существенно снижен, и соответствует таковому, наблюдаемому у безсинуклеиновых $\alpha\beta\gamma$ -КО животных. При этом увеличен латентный период от введения препарата до начала регистрации локомоторного ответа (рис. 7).

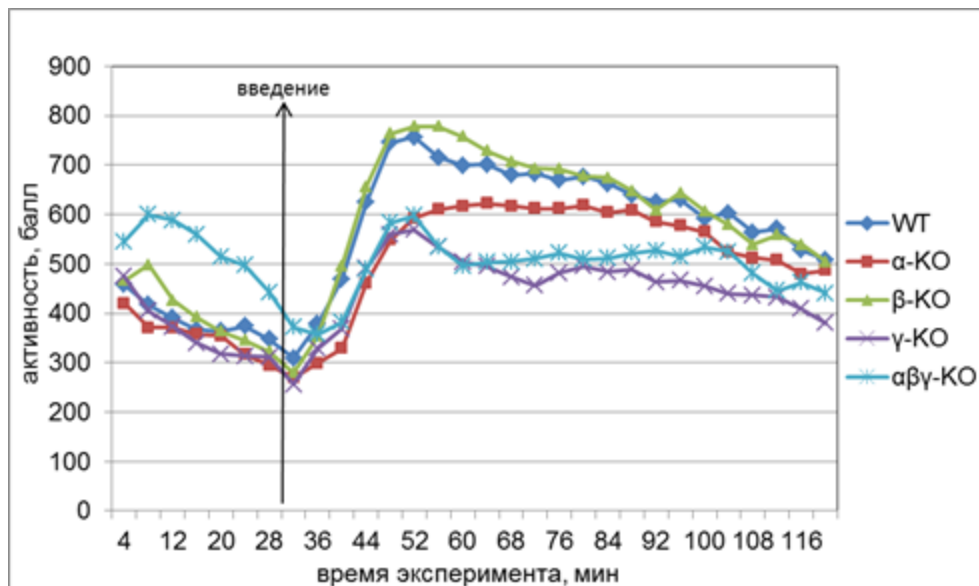


Рисунок 7. Амфетамин-индуцированный локомоторный ответ, возраст 4 мес. Введение – временная точка введения амфетамина. $n_{WT} = 25$, $n_{\alpha-KO} = 19$, $n_{\beta-KO} = 19$, $n_{\gamma-KO} = 16$, $n_{\alpha\beta\gamma} = 14$.

С возрастом дефицит функции α - и γ -синуклеинов приводит к ещё более выраженным изменениям DA гомеостаза. На рисунке 8 представлены результаты тестирования локомоторной активности у стареющих мышей при отсутствии γ -синуклеина или всех трёх синуклеинов.

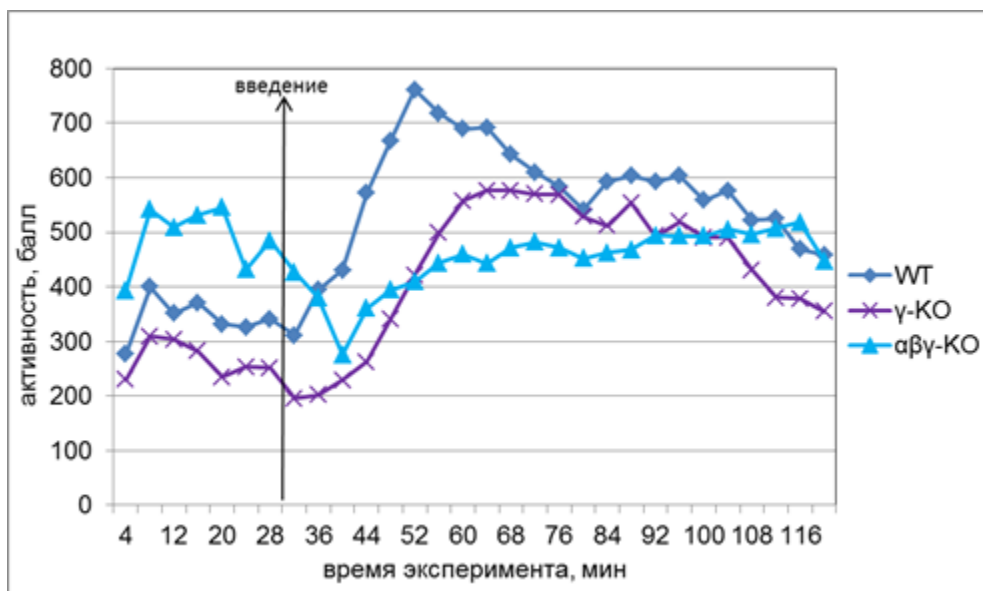


Рисунок 8. Амфетамин-индуцированный локомоторный ответ, возраст 24 мес. Введение – временная точка введения амфетамина. $n_{WT} = 15$, $n_{\gamma-KO} = 12$, $n_{\alpha\beta\gamma} = 11$.

Аналогичный локомоторный ответ на введение амфетамина γ -КО такому же α -КО, в свете выявленных нами фактов, не может объясняться сниженным уровнем DA или нарушением выброса везикул. Наблюдаемая картина могла бы объясняться нарушением транспорта и представления DAT на пресинаптической мембране, хотя мы и выявили его повышенную концентрацию в тканях стриатума; либо изменениями в иных нейромедиаторных системах, так как имеются литературные данные о DA-независимом ответе на амфетамин.

Анализ исследовательской активности, тревожности и депрессивно-подобного поведения. Синуклеинопатии часто сопряжены с психоэмоциональными расстройствами, которые играют решающую роль в их ранней диагностике. Нами был выполнен ряд тестов для оценки особенностей поведения синуклеин-дефицитных мышей. Результаты наиболее показательных тестов представлены на рисунке 9. При тестировании α -КО мышей нами не было обнаружено отличий от группы WT в большинстве использованных парадигм (рис. 9). Лишь в тесте открытое поле стареющие α -КО не продемонстрировали ответ на повышенную освещённость (рис. 10), что свидетельствует о дефиците

ДА-передачи, резкая активация которой является центральной компонентой ответа на стресс. γ -КО характеризовались значительными возраст-зависимыми отличиями поведенческих реакций по сравнению с WT мышами. Так, у молодых животных была отмечена повышенная склонность к риску и высокие показатели исследовательско-ориентировочного поведения в целом, но при старении γ -КО мышей эти различия нивелировались. Однако, они сохраняли низкий уровень ситуативной тревожности (рис. 9б) и более выраженную реакцию привыкания на всех временных этапах тестирования (рис. 9а, г).

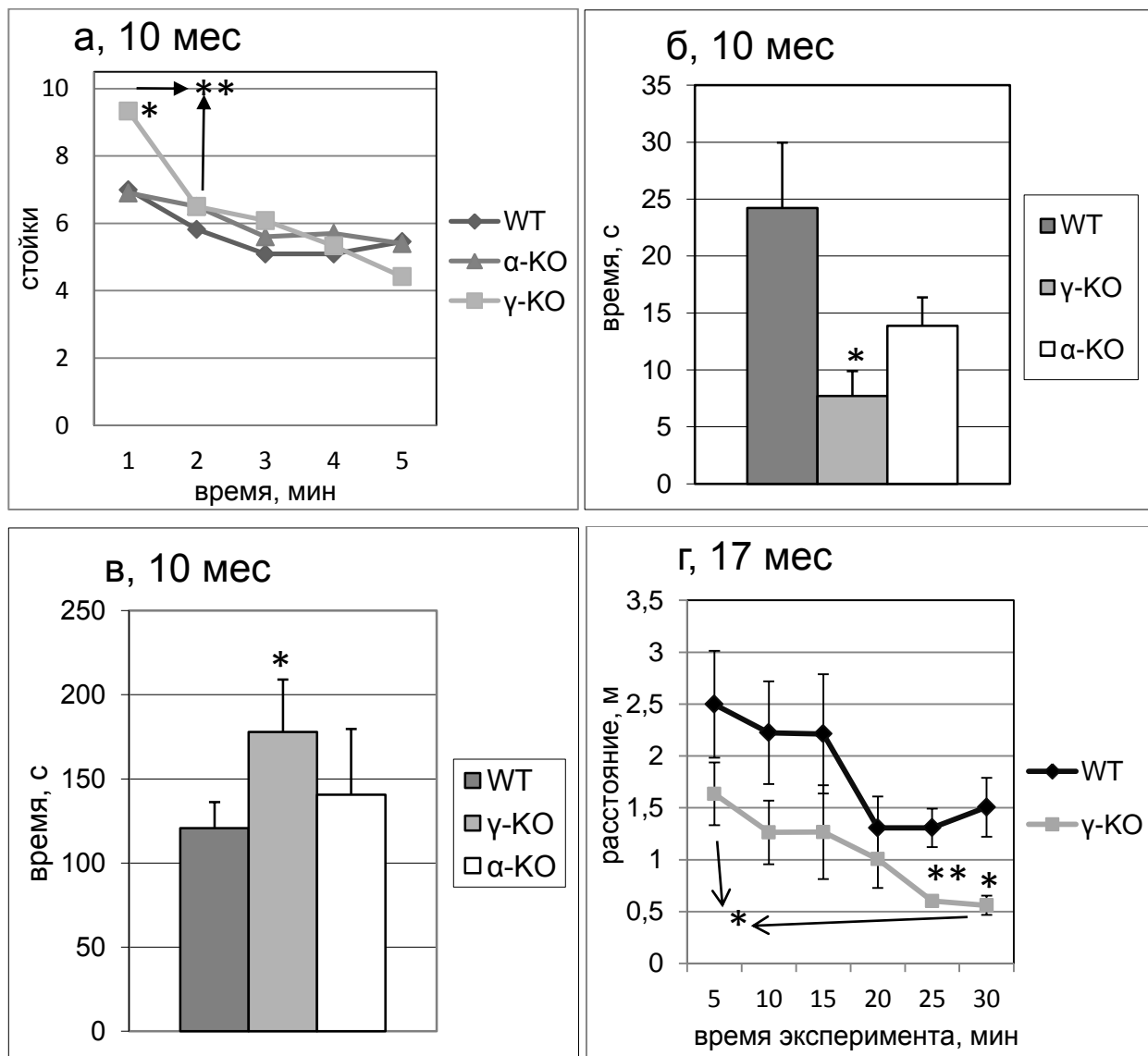


Рисунок 9. Особенности поведенческих реакций α -КО и γ -КО мышей в тестах: а) новая клетка (число вертикальных стоек); б – тёмно-светлая камера (латентное время выхода в светлый отсек, с); в – о-образный приподнятый лабиринт (латентное время выхода на неогороженный сегмент, с); г – открытое поле (общая пройденная дистанция, м).

Вместе с тем, общая двигательная активность стареющих γ -КО животных была снижена по сравнению с WT (рис. 9г). Кроме того, в тесте открытое поле γ -КО животные также не показали ответа на повышенную освещённость (рис. 10), что может указывать на нарушения DA-передачи. В то же время, выявленные нами поведенческие отличия не могут объясняться лишь нарушением DA-передачи. Мы предполагаем, что наблюдаемые эффекты связаны с влиянием дефицита γ -синуклеина также и на иные нейромедиаторные системы.

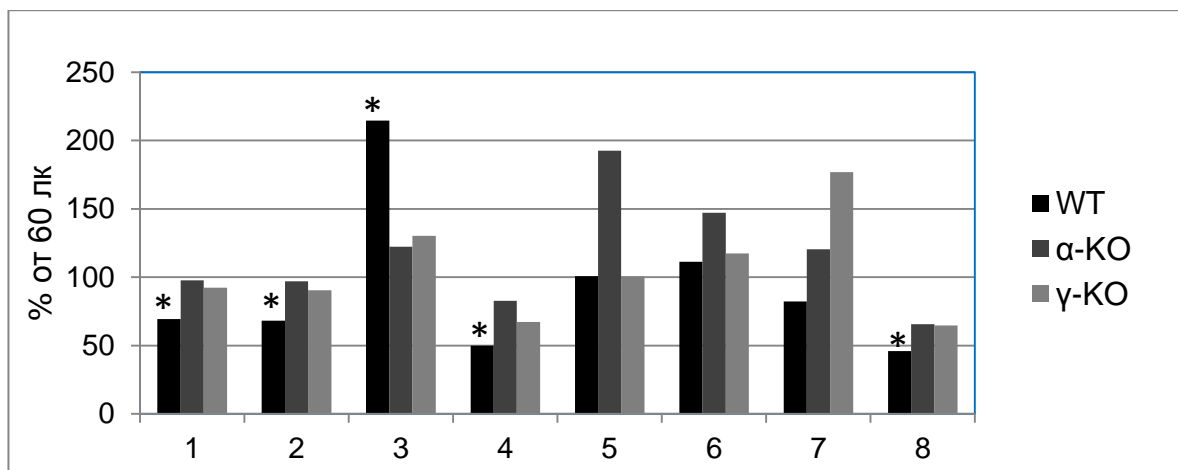


Рисунок 10. Стресс-индуцированная реакция α -КО и γ -КО мышей в тесте «открытое поле». Ответ на повышенную освещённость, 10 мес. 1 – общая пройденная дистанция; 2 – скорость движения; 3 – неподвижный момент (время без движения); 4 – дистанция в периметре; 5 – дистанция в центре; 6 – время в центре; 7 – число посещений центра; 8 – общее время в стойках. Значения выражены в % от показателей, наблюдаемых при 60 лк. $n_{WT}=9$, $n_{\alpha-KO}=6$, $n_{\gamma-KO}=9$.

Анализ когнитивных способностей синуклеин-дефицитных мышей.

Когнитивные расстройства часто сопровождают нейродегенеративные состояния, в том числе и при синуклеинопатиях. В батарее поведенческих тестов нами были получены характеристики памяти и обучения у синуклеин-дефицитных мышей.

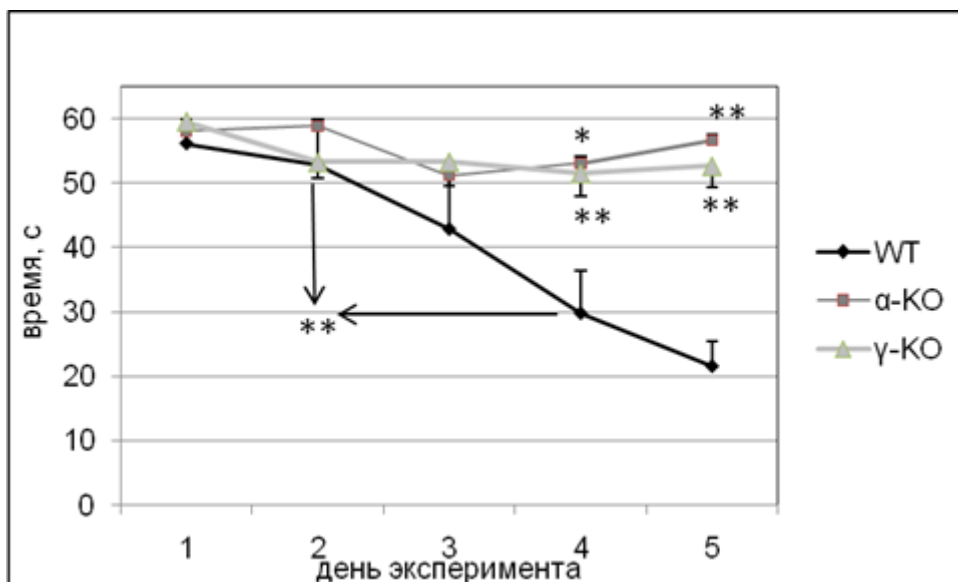


Рисунок 11. Анализ пространственной памяти мышей (возраст 10 мес.) в водном лабиринте Морриса. Размер бассейна 180 см, платформа расположена стационарно. На оси ординат указано время, затраченное животными на поиск платформы при последовательных тестированиях в течение 5 дней. $n_{WT}=7$, $n_{\gamma-KO}=9$, $n_{\alpha\beta\gamma}=8$.

Водный лабиринт Морриса является классическим инструментом для оценки пространственной памяти, зависящей от функции гиппокампа. Результаты анализа пространственной памяти животных, полученные в этом тесте продемонстрировали значительную разницу между α -КО, γ -КО мышами и контрольной группой (рис. 11). Начиная со 2-го дня обучения время, которое требовалось контрольным животным для нахождения платформы, достоверно сокращалось, в то время как в группах синуклеин-дефицитных мышей оно оставалось таким же, как на 1-й день обучения. Отсутствие достоверной динамики научения у α -КО и γ -КО указывает на то, что хроническая недостаточность α - и γ -синуклеинов может приводить к нарушению пространственной памяти.

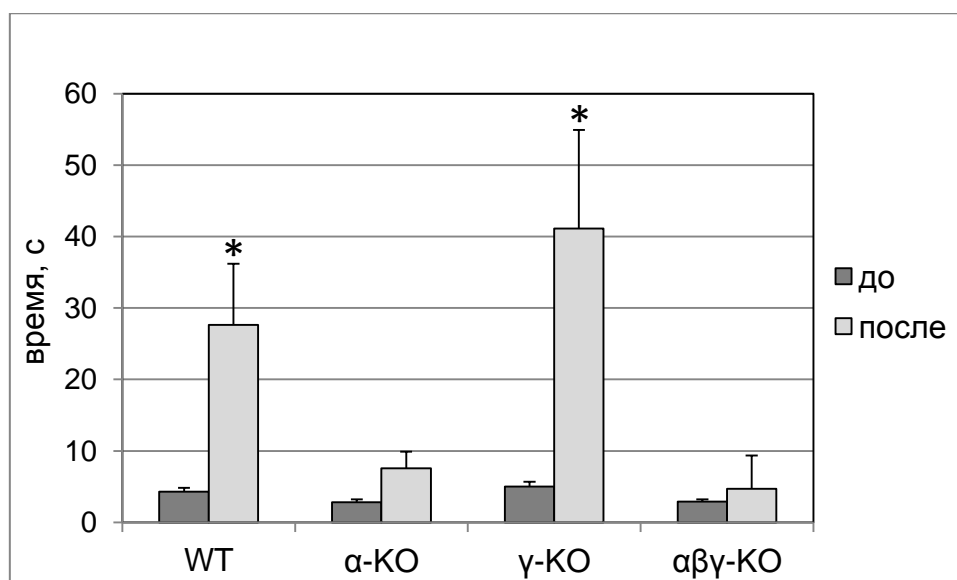


Рисунок 12. Выработка условного рефлекса пассивного избегания у синуклеин-дефицитных мышей (возраст 14 мес.). На оси ординат указано латентное время схода с платформы до отрицательного стимула и после него. $n_{WT}=24$, $n_{\alpha-KO}=16$, $n_{\gamma-KO}=22$, $n_{\alpha\beta\gamma-KO}=16$.

Для оценки рабочей памяти использовали несколько тестов, наиболее показательными из которых являлись УРПИ и УРАИ. Следует отметить, что избегание негативного стимула в использованных тестах не связано со страхом. Было показано, что в тесте УРПИ латентное время схода с платформы после обучения у α -КО и $\alpha\beta\gamma$ -КО мышей не менялось (рис. 12), что может являться свидетельством нарушения у них функционирования рабочей памяти. В группе γ -КО мышей, напротив, были выявлены более высокие показатели научения, базирующиеся на рабочей памяти (рис.12). Это было подтверждено и в тесте УРАИ, который, в отличие от УРПИ, более чувствителен к эмоциональному статусу животного, а также к уровню базовой и ситуативной тревожности; в то же время, этот тест более строго позволяет оценить способность к обучению, задействующего рабочую память. В первые 4-е дня обучения в тесте УРАИ показатели обучаемости животных не различались. Начиная с 7-го дня обучения γ -КО демонстрировали большее количество правильных переходов, по сравнению с группой WT (рис. 13). Тогда как в группе α -КО, начиная с 5-го дня обучения, стабильно регистрировался меньший процент правильных переходов по сравнению с группой контрольных животных (рис. 13).

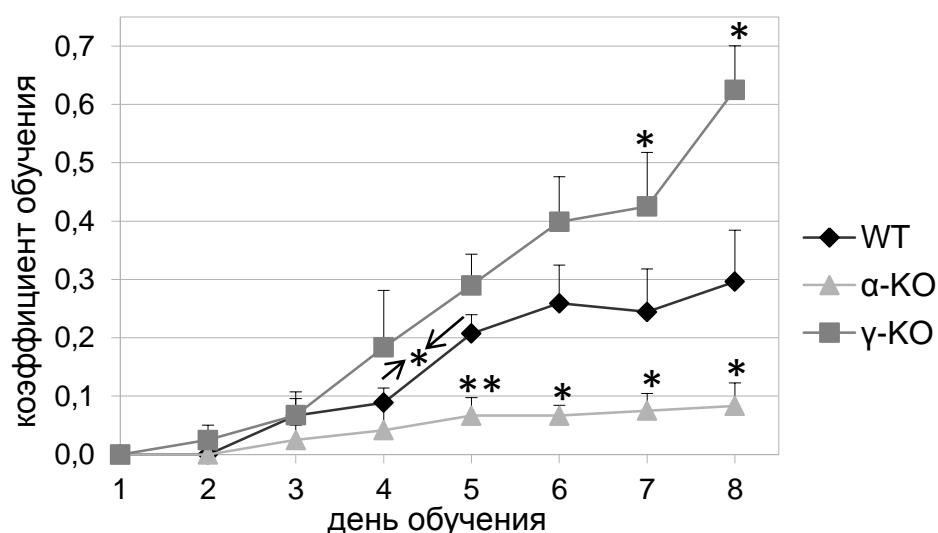


Рисунок 13. Выработка условного рефлекса активного избегания, 10 мес. Коэффициент обучения – отношение числа правильных переходов к общему числу переходов в рамках одного дня обучения. $n_{WT}=10$, $n_{\alpha-KO}=8$, $n_{\gamma-KO}=9$.

Таким образом, полученные нами в трёх независимых тестах данные указывают на то, что у стареющих животных потеря нормальной функции α -синуклеина может приводить к нарушению когнитивных функций. Тогда как потеря нормальной функции γ -синуклеина приводит к нарушению процесса обучения, требующего функционирования пространственной памяти и, в то же время, формированию фенотипа с высокопроизводительным обучением, базирующимся на рабочей памяти. Эти результаты γ -КО мышей могут свидетельствовать о нарушении DA-передачи в гиппокампе – структуре, вовлечённой в функционирование пространственной памяти. В то же время, они указывают на наличие для γ -синуклеина иных, отличных от таковых для α -синуклеина, функциональных мишеней, изменение активности которых влияет на когнитивные способности.

В литературе приводятся данные о том, что синуклеины, и, в первую очередь, α -синуклеин, непосредственно вовлечены в передачу сигнала в химических синапсах. Дефицит функции синуклеинов ведёт к нарушению процессов синаптической передачи, осуществляемой посредством нейромедиаторов, и в процессе старения вызывает развитие синаптической недостаточности. Многие

нейродегенеративные патологические процессы начинаются в пресинаптических окончаниях, поэтому функциональная недостаточность α -синуклеина, одной из функций которого является регуляция эффективного выброса нейромедиатора путём модуляции образования SNARE-комплексов на пресинаптической мембране, ведёт к снижению эффективности синаптической передачи. Если у молодых животных эта недостаточность компенсируется путем частичного замещения функции другими синуклеинами или активацией иных пресинаптических механизмов, то в стареющем мозге способность к такой компенсации значительно снижена, и функциональная недостаточность синуклеинов приводит к развитию выраженной патологии синапсов. Наши данные показывают, что молекулярно-клеточные изменения, описанные в синуклеин-дефицитных модельных системах, могут быть причиной нарушения формирования и/или воспроизведения памятного следа в процессе старения на уровне целого организма.

Список сокращений

DA – дофамин

DAT – транспортер дофамина

DOPAC – 3,4-диоксифенилуксусная кислота

GFAP – глиальный фибриллярный кислый белок

HVA – гомованилиновая кислота

КО – нокаут (от англ. knockout)

ТН – тирозингидроксилаза

WT – дикий тип (от англ. wild type)

ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография

НДЗ – нейродегенеративные заболевания

ПЦР – полимеразная цепная реакция

УРПИ – выработка условного рефлекса пассивного избегания

УРАИ – выработка условного рефлекса активного избегания

ВЫВОДЫ

1. Направленная инактивация гена, кодирующего γ -синуклеин, не влияет на уровень дофамина в стриатуме нокаутных мышей, в то время как направленная инактивация гена, кодирующего α -синуклеин, приводит к снижению уровня этого нейромедиатора у стареющих нокаутных мышей.
2. Уровень ряда белков, принимающих участие в дофаминергической нейромедиаторной передаче (TH, DAT, амфифизин, синаптотагмин) снижен в стриатуме стареющих мышей-нокаут по гену α -синуклеина.
3. Инактивация как α -синуклеина, так и γ -синуклеина приводит к нарушению дофаминергической нейромедиаторной передачи. Кроме того, инактивация α -синуклеина приводит к нарушению взаимодействия везикул с пресинаптической мембраной.
4. Отсутствие белка α -синуклеина приводит к прогрессивному развитию нарушений функционирования пространственной и рабочей памяти, что сопровождается снижением когнитивной функции у стареющих мышей.
5. Отсутствие белка γ -синуклеина приводит к формированию фенотипа, характеризующегося выраженной реакцией привыкания и эмоциональной реактивностью с одновременной редукцией тревожного поведения и нарушением функционирования пространственной памяти.
6. Установлено, что полная или частичная потеря нормальной пресинаптической функции синуклеинов, сопровождающая патогенез ряда нейродегенеративных болезней, вносит существенный вклад в развитие локомоторных и когнитивных нарушений, характерных для этих заболеваний.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Кохан В. С., Болкунов А. В., Иванова Н.А., Ванькин Г. И. Некоторые особенности поведения мышей – нокаутов по гену гамма-синуклеин.// Материалы 3-й Международной конференции "Новейшие научные достижения". София, Болгария. 2010. С. 16-19.
2. Kokhan V.S., A.V. Volkunov, G. I. Van'kin, N. N. Ninkina, S. O. Bachurin. Emotionally challenged behavior in γ -synuclein knock-out mice.// Materials of the 14-th Multidisciplinary International Conference on Neuroscience and Biological Psychiatry "Stress and Behavior". Санкт-Петербург, Россия. 2010. С. 22.
3. Кохан В.С., Болкунов А. В., Устюгов А. А., Ванькин Г. И., Шелковникова Т.А, Редкозубова О.М., Стрекалова Т.В., Бухман В.Л, Нинкина Н.Н., Бачурин С.О. Направленная инактивация гена, кодирующего гамма-синуклеин, влияет на уровень тревожности и исследовательской активности мышей.// Жур. высш. нервн. деят. 2011. Т. 61(1). С. 85–93.
4. Бачурин С.О., Кохан В.С., Болкунов А.А., Устюгов А.А., Нинкина Н.Н., Шелковникова Т.А.// Разработка оригинальных генетических моделей нейродегенеративных заболеваний (протеинопатий) с целью изучения механизма развития нейродегенерации и поиска на этой основе новых лекарственных препаратов, действующих на патогенез заболевания.// Материалы конференции по научному направлению Российской Академии Наук "Фундаментальные науки - Медицине". 2011. С. 225-226.
5. Устюгов А.А., Шелковникова Т.А, Кохан В.С., Хританкова И.В., Петерс О., Бухман В.Л., Бачурин С.О., Нинкина Н.Н. Димебон снижает содержание агрегированных форм амилоидогенного белка в детергент-нерастворимых фракциях in vivo.// БЭБиМ. 2011. Т. 152(12). С. 675-679.
6. Кохан В.С., Ванькин Г.И., Нинкина Н.Н., Шелковникова Т.А., Бачурин С. О. Нарушение пространственной и рабочей памяти у стареющих мышей с направленной инактивацией гена α -синуклеина.// Доклады Академии наук: Физиология. 2011. Т. 441(2). С. 269-272.

7. Кохан В. С., Ванькин Г. И., Нинкина Н. Н. Оценка рабочей и пространственной памяти гамма-синуклеин нокаутных мышей.// Материалы Всероссийской молодёжной конференции-школы "Нейробиология интегративных функций мозга". Медицинский академический журнал (спец. выпуск). Т. 11. Санкт-Петербург, Россия. 2011. С. 34-35.
8. Kokhan V. S., Van`kin G. I., Neganova M. E., Ninkina N. N. Spatial and working memory is impaired in alpha-synuclein knockout mice.// Materials of the XIX World Congress on Parkinson's Disease and Related Disorders. Шанхай, Китай. 2011. С. S194.
9. Кохан В. С., Ванькин Г. И., Нинкина Н. Н., Бачурин С.О., Шамакина И. Ю. Синуклеины: возможная роль в патогенезе зависимости от психоактивных веществ.// Вопросы наркологии. 2012. №1. С. 87-95.

Работа выполнена при поддержке Государственных контрактов с Минобрнауки.