

**ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОЕ ИНГИБИРОВАНИЕ АКТИВНОСТИ
ВОДНОГО КАНАЛА AQP4 ВЫЗЫВАЕТ УСИЛЕНИЕ
АЛЬФА-СИНУКЛЕИНОВОЙ ПАТОЛОГИИ В ЧЕРНОЙ СУБСТАНЦИИ
В МОДЕЛИ БОЛЕЗНИ ПАРКИНСОНА У КРЫС**

© 2023 г. К. В. Лапшина¹, *, М. В. Ханина¹, М. П. Кайсманова¹, И. В. Екимова¹

¹*Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН,
Санкт-Петербург, Россия*

**E-mail: ksenia.lapshina@gmail.com*

Поступила в редакцию 03.10.2023 г.

После доработки 07.10.2023 г.

Принята к публикации 07.10.2023 г.

Нарушение фолдинга белка α -синуклеина, способствующее образованию нейротоксичных олигомеров и агрегатов, является одной из основных причин гибели дофамин (ДА)-ергических нейронов компактной части черной субстанции (кчЧС) при болезни Паркинсона (БП). Ранее мы установили, что фармакологическое ингибирование активности водного канала аквапорина-4 (AQP4), участвующего в механизмах очистки мозга от амилоидогенных белков, усиливало процесс нейродегенерации в нигростриатной системе и вызывало появление моторных нарушений в лактацистиновой модели БП. Предполагается, что прогрессирование нейродегенерации происходит из-за избыточного накопления патологических форм α -синуклеина в кчЧС вследствие снижения активности AQP4. Задача данного исследования – выяснить, приводит ли фармакологическое ингибирование активности водного канала AQP4 в головном мозге к усилению α -синуклеиновой патологии в кчЧС в модели БП у крыс. Эксперименты выполнены на самцах крыс популяции Вистар. Активность AQP4 подавляли с помощью ингибитора TGN-020, введя его в боковой желудочек головного мозга. Для воспроизведения модели БП использовали специфический ингибитор протеасом лактацистин (ЛЦ), который вводили билатерально в кчЧС. В исследовании применены иммуноблоттинг и конфокальная микроскопия. Модель БП характеризовалась патологическим накоплением общей водорастворимой и фосфорилированной по Ser129 форм α -синуклеина в ткани кчЧС и образованием нерастворимых агрегатов α -синуклеина в ДА-ергических нейронах кчЧС. Введение TGN-020 приводило к усугублению α -синуклеиновой патологии в модели БП, проявлявшемуся повышением уровней водорастворимой и модифицированной форм α -синуклеина, а также увеличением количества агрегатов α -синуклеина в черной субстанции в 1.9 раза. Предполагается, что дисфункция AQP4 является одним из механизмов, приводящих к нейродегенерации и накоплению амилоидогенных белков в паренхиме головного мозга при БП. Водный канал AQP4 может явиться перспективной мишенью для разработки терапевтических подходов, направленных на ослабление цитотоксичности, аккумуляции и распространения α -синуклеина в головном мозге при развитии Паркинсон-подобной патологии.

Ключевые слова: аквапорин-4, α -синуклеин, нейродегенерация, убиквитин-протеасомная система, черная субстанция, болезнь Паркинсона

DOI: 10.31857/S0869813923110079, **EDN:** GNBBKL

ВВЕДЕНИЕ

Болезнь Паркинсона (БП) – прогрессирующее хроническое нейродегенеративное заболевание, является одной из актуальнейших биомедицинских проблем современности. Это связано с тем, что БП, несмотря на активный поиск терапевтических подходов, по-прежнему остается неизлечимой, а ее распространенность неуклонно растет [1, 2]. Для решения этой проблемы необходимы исследования, направленные на дальнейшее изучение патогенеза этого заболевания.

Характерной чертой БП является обширная дегенерация дофамин (ДА)-ергических нейронов компактной части черной субстанции (кЧС) и других структур головного мозга, что приводит к развитию комплекса моторных и немоторных симптомов [3]. Согласно современной точке зрения, ключевым патогенетическим звеном этого заболевания является избыточное накопление в клетках и межклеточном пространстве токсичных форм белка α -синуклеина. Физиологическая функция α -синуклеина в клетке до сих пор до конца не выяснена. Однако в связи с тем, что он локализован в основном в аксонах и пресинаптических окончаниях нейронов, предполагается, что он принимает участие в регуляции везикулярного пула и передачи нервного импульса [4]. Особенностью данного белка является наличие сайтов для модификаций (в частности, фосфорилирования) и способность к образованию олигомеров, обладающих выраженным цитотоксическим действием, а также фибрилл и агрегатов. Известно, что α -синуклеин может покидать нейроны, выходить во внеклеточное пространство, передаваться другим нейронам по прион-подобному механизму, а также захватываться астроцитами и микроглиоцитами путем рецептор-опосредованного эндоцитоза и фагоцитоза [5–7]. В связи с этим поиск фармакологических препаратов или иных подходов, целью которых будет снижение цитотоксичности, предотвращение накопления и распространения α -синуклеина, представляется весьма важным и актуальным направлением.

Одним из факторов, приводящих к аккумуляции α -синуклеина в нейронах, является развивающееся с возрастом снижение эффективности работы систем деградации белков – убиквитин-протеасомной системы (УПС) и аутофаголизосомной системы, обеспечивающих протеолиз внутриклеточных aberrантных белков и их агрегатов [8]. Другим предрасполагающим к накоплению α -синуклеина фактором может быть ухудшение клиренса различных метаболитов (и в том числе – амилоидогенных белков) из паренхимы головного мозга, происходящее в результате снижения качества работы механизма, получившего название “глимфатическая система” [9, 10]. Согласно предложенной гипотезе, эта система обеспечивает выведение метаболитов и амилоидогенных белков в ликвор, откуда потом они могут элиминироваться при участии менингеальных лимфатических сосудов и глубоких шейных лимфатических узлов [9–11]. Предполагается, что ликвор может поступать в толщу мозга вдоль артериол, окруженных отростками астроцитов, формирующими гематоэнцефалический барьер. На отростках астроцитов располагается селективный водный канал аквапорин-4 (aquaporin-4, AQP4), являющийся наиболее распространенным в центральной нервной системе представителем семейства аквапоринов. Входящая в состав ликвора вода с помощью AQP4 поступает в ткань мозга, способствуя выведению метаболитов из ткани мозга в ликвор для последующей элиминации при участии лимфатической системы. Однако следует отметить, что механизмы, за счет которых достаточны крупные белки могут быть выведены в ликворную систему, все еще не изучены. Несмотря на огромный интерес исследователей к глимфатической системе и ее роли в развитии различных неврологических расстройств, представления о ней пока нельзя назвать окончательно сформированными из-за ряда противоречий и пробелов в знании относительно механизмов ее функционирования и организации [11, 12].

Водный канал AQP4 является ключевым участником глимфатической системы, и его важнейшей физиологической функцией можно назвать участие в регуляции водного и ионного баланса в ткани мозга [13]. В настоящее время активно исследуется роль AQP4 в патогенезе нейродегенеративных заболеваний, однако пока основное внимание сосредоточено на болезни Альцгеймера. Показано, что глимфатическая система обеспечивает выведение амилоидогенных белков из паренхимы головного мозга в моделях болезни Альцгеймера у животных [14, 15]. Однако степень воздействия этой системы на удаление патологических форм α -синуклеина из мозга и прогрессирование Паркинсон-подобных признаков БП остается плохо изученной. Данные, имеющиеся в литературе, предполагают наличие взаимосвязи между функциональной активностью AQP4 и БП. Выявлена отрицательная корреляция между содержанием α -синуклеина и уровнем экспрессии AQP4 в височной коре головного мозга у пациентов с БП [16]. Кроме того, было обнаружено, что определенные варианты однонуклеотидного полиморфизма гена *Aqp4* сопряжены с более высоким риском развития БП и появлением когнитивных нарушений [17, 18].

Связь между дисфункцией глимфатического клиренса и патологией БП постепенно подтверждается и в моделях БП у животных. Показано, что при введении нокаутированным по AQP4 мышам фибрилл α -синуклеина в дорсальный стриатум через 3 месяца отмечается усиленное накопление фосфорилированного по Ser129 α -синуклеина в составе агрегатов в дорсальном стриатуме, коре мозга и кЧЧС, сопровождающееся увеличением числа погибших DA-ергических нейронов и усугублением моторных нарушений [19]. Следует отметить, что через 6 месяцев в кЧЧС, в отличие от других исследуемых структур, было отмечено снижение количества агрегатов α -синуклеина, однако их содержание у нокаутированных по AQP4 все равно было выше, чем у мышей дикого типа. Авторы приходят к выводу, что снижение экспрессии AQP4 может усугублять Паркинсон-подобную патологию, и возможной причиной является нарушение глимфатического пути. В другом исследовании было показано, что у нокаутированных по AQP4 мышей, у которых индуцировали сверхэкспрессию человеческого A53T α -синуклеина в кЧЧС, отмечается усиленное накопление мономеров α -синуклеина через 2 недели после начала эксперимента, что, по мнению авторов, указывает на тесное взаимодействие между AQP4-опосредованной глимфатической системой и α -синуклеином, находящимся в паренхиме мозга [20].

Однако для более полного понимания роли AQP4 в выведении из паренхимы головного мозга патологических форм α -синуклеина, характерных для БП, необходимо использование не только нокаутированных по AQP4 животных, но и других подходов, направленных на нарушение функционирования AQP4. Кроме того, такие исследования предусматривают использование разных по патогенетической значимости моделей БП у животных. Ранее в нашей лаборатории на основе угнетения активности УПС в головном мозге с помощью лактацистина, созданы модели доклинической и клинической стадий БП у крыс [21]. Эта модель патогенетически обоснована и позволяет воспроизвести признаки α -синуклеиновой патологии, а также другие патоморфологические, нейрохимические и поведенческие признаки БП [8, 22–25]. В исследовании, выполненном нами ранее, было установлено, что фармакологическое ингибирование активности водного канала AQP4 в лактацистиновой модели доклинической стадии БП у крыс приводит к прогрессированию нейродегенерации в нигростриатной системе и признаков моторного дефицита [26]. Нами высказана гипотеза, что прогрессирование нейродегенерации и моторных нарушений происходит из-за усиленного накопления патологических форм белка α -синуклеина в ткани кЧЧС вследствие снижения активности AQP4-опосредованной глимфатической системы. Задача настоящего исследования — выяснить, при-

водит ли фармакологическое ингибирование активности водного канала AQP4 в головном мозге к усилению α -синуклеиновой патологии в кЧС в модели БП у крыс.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Животные

Эксперименты были выполнены на взрослых самцах крыс популяции Вистар в возрасте 6–7 мес. и массой тела 350–400 г, выращенных в виварии Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН. Животных содержали в виварии Института с неограниченным доступом к пище и воде при естественном освещении и температуре воздуха 21–23°C.

Дизайн эксперимента и применяемые препараты

Для исследования нами была выбрана хроническая модель БП у крыс, разработанная в лаборатории сравнительной термофизиологии и созданная путем угнетения активности УПС в нигростриатной системе [21]. Данная модель позволяет воспроизвести основные патофизиологические признаки доклинической и клинической стадий БП у крыс (развитие α -синуклеиновой патологии, нейродегенеративного процесса в нигростриатной системе и моторных нарушений). Для угнетения активности протеасом использовали специфический ингибитор их ферментативной активности лактацистин (ЛЦ) (Enzo Life sciences, Великобритания). Введение ЛЦ осуществляли двукратно и билатерально в кЧС в дозах 0.4 мкг/мкл (первая микроинъекция ЛЦ) и 4.0 мкг/мкл (вторая микроинъекция ЛЦ). Интервал между введениями составлял 7 дней. Для исследования влияния фармакологического ингибирования AQP4 мы применяли ингибитор 2-(никотинамид)-1,3,4-тиадиазол (2-(nicotinamide)-1,3,4-thiadiazole, TGN-020). Препарат был синтезирован В.А. Полукеевым (АО “Вектон”, Санкт-Петербург) в виде натриевой соли для повышения растворимости согласно методическим протоколам разработчиков препаратов [27]. Решение отказаться от коммерчески доступного TGN-020 было обусловлено тем, что это вещество плохо растворяется в водных растворах. Для его разведения нужен диметилсульфоксид, применение которого для введения в ликворную систему было нежелательно из-за возможного токсического эффекта. TGN-020 вводили в боковой желудочек мозга в дозе 40 мкг и в объеме 6 мкл за 15 мин до введения ЛЦ. Используемая доза была подобрана при выполнении предшествующего исследования [26]. Используемые в исследовании препараты растворяли в стерильном фосфатно-солевом буфере (phosphate buffered saline (PBS), пропущенном через фильтр-насадку на шприц (PVDF, 0.22 мкм, Jet Biofil, Корея). Стерильный PBS применялся в качестве контрольного раствора.

Для выполнения исследования путем простой рандомизации были сформированы следующие группы животных:

Группа 1. Контроль PBS + PBS ($n = 6$ (иммуноблоттинг) и $n = 6$ (иммуногистохимическое исследование (ИГХ)); введение PBS (контрольного раствора) в левый боковой желудочек и в кЧС);

Группа 2. TGN-020 + PBS ($n = 6$ (иммуноблоттинг) и $n = 6$ (ИГХ); введение TGN-020 в левый боковой желудочек и PBS в кЧС);

Группа 3. LC + PBS ($n = 6$ (иммуноблоттинг) и $n = 6$ (ИГХ); введение PBS в левый боковой желудочек и ЛЦ (LC) в кЧС);

Группа 4. LC + TGN-020 ($n = 6$ (иммуноблоттинг) и $n = 6$ (ИГХ); введение TGN-020 в левый боковой желудочек и ЛЦ (LC) в кЧС).

При проведении данного исследования и обработке результатов слепые методы не применялись.

*Проведение операции по вживлению проводящих канюль
и техника выполнения микроинъекций препаратов*

Для установки проводящих канюль животных наркотизировали с использованием препарата Золетил (Zoletil®, Virbac, Франция), в дозе 60 мг/кг, внутримышечно и помещали в стереотаксическое устройство (Narishige, Япония). Канюли располагали согласно данным атласа головного мозга для крыс линии Вистар [28] по координатам: кЧЧС – 5 мм каудальнее брегмы и 2 мм слева и справа от саггитального шва и на глубину 5.5–6 мм, левый боковой желудочек – 0.5 мм каудальнее брегмы, 1.5 мм латерально, 4 мм вглубь. Для того, чтобы зафиксировать канюли на поверхности черепа, применяли зубной цемент “Акродент” (“Стома”, Украина). После окончания операции канюли закрывали мандренами.

Введение препаратов начинали не ранее чем через 7–10 дней после операции. Перед выполнением микроинъекций крыс наркотизировали золетилом (внутримышечно, 45 мг/кг), фиксировали в стереотаксическом устройстве (Narishige, Япония) и вводили препараты с помощью шприца Hamilton. Скорость введения препаратов в канюлю составляла 0.5 мкл/мин (для TGN-020) и 0.1 мкл/мин (для ЛЦ). Через 21 день после начала введения препаратов животных наркотизировали с использованием хлоралгидрата (400 мг/кг), декапитировали и извлекали мозг для подготовки проб для иммуноблоттинга или препаратов для иммуногистохимического исследования.

Вестерн-блоттинг

Для оценки содержания в кЧЧС белка α -синуклеина и его формы, фосфорилированной в положении Ser129, был использован Вестерн-блоттинг. Образцы ткани мозга, содержащие кЧЧС, гомогенизировали с помощью пестика и лизировали с применением буфера Radioimmunoprecipitation Assay (RIPA) buffer с добавлением коктейля ингибиторов протеаз (Sigma, США) и фосфатаз PhosStop (Roche, Швейцария). Затем лизаты ткани центрифугировали и измеряли концентрацию белка в супернатанте с помощью набора для колориметрического определения белка с использованием бицинхониновой кислоты (BCA) (Servicebio, Китай). Пробы растворяли в однократном буфере для нанесения проб (SDS – 2%, TrisHClpH 6.8–62.5 мМ, глицерол – 10%, бромфеноловый синий, β -меркаптоэтанол – 10%), после чего выполняли термическое демаскирование антигена при температуре 99°C в течение 8 мин. Количество белка, вносимого в лунку, составляло 20 мкг. Каждый гель содержал пробы, полученные и от контрольных, и от экспериментальных животных. Разделение белков производили в 11%-ном полиакриламидном геле по Лэммли с помощью электрофореза в камере Mini-Protean (Bio-Rad, США). После разделения белки из геля переносили на PVDF-мембрану (Bio-Rad, США) с размером пор 0.22 мкм. Для того чтобы предотвратить неспецифическое связывание антител, мембраны инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре в PBS с добавлением 0.1% Tween-20 и 5% обезжиренного сухого молока. Для выполнения иммунопомеченния применяли первичные моноклональные антитела мыши к общему α -синуклеину (1 : 900, Santa-Cruz, США), поликлональные антитела кролика к α -синуклеину, фосфорилированному в положении Ser129 (1 : 700; Elk, Китай) и контролю нагрузки GAPDH (1 : 3000; Affinity, Китай). Инкубацию выполняли в течение ночи при 4°C и постоянном бережном перемешивании на шейкере. В работе использованы вторичные антитела козы к кролику и мыши, конъюгированные с пероксидазой хрена (1 : 10000; Jackson's Laboratories, США), инкубацию проводили в течение 1 ч при комнатной температуре. Для выявления пероксидазной реакции применяли набор ECL Immuno-Cruz (Santa-Cruz, США) и систему геле-документирования ChemiDoc TM (Bio-Rad, США). Денситометрический анализ изображе-

ний, полученных с помощью системы гель-документирования, осуществлялся с помощью программы ImageJ/Fiji (НИН, США). Уровень серого белковых дорожек, иммунореактивных к общему α -синуклеину и α -синуклеину, фосфорилированному в положении Ser129, был скорректирован по фоновому сигналу и нормирован на сигнал контроля нагрузки. Сигнал белка интереса контрольной группы принимали за 100% и сопоставляли с ними сигналы остальных экспериментальных групп.

Метод ловушки на фильтре (Filter trap assay)

Метод ловушки на фильтре был применен с целью оценки количества агрегатов α -синуклеина в ткани кЧС. Лизаты кЧС крыс инкубировали в 2%-ном растворе SDS при 98°C в течение 5 мин. Затем в лунки камеры для дот-блоттинга Bio-Dot (BioRad, США), на дне которой была расположена ацетат-целлюлозная мембрана с диаметром пор 0.22 мкм, вносили по 200 мкг каждого образца. Камеру соединяли с вакуумным насосом, под действием которого растворенные белки проходили сквозь мембрану, а нерастворимые белковые агрегаты оставались на ней. После этого мембрану промывали буферным раствором (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 0.1% SDS) и затем при комнатной температуре в течение 1 ч инкубировали в блокирующем растворе (PBS с 0.1% Tween-20 и 5% обезжиренное сухое молоко). Для иммуномечения мембрану инкубировали с первичными поликлональными антителами мыши к общему α -синуклеину (1 : 900; Santa-Cruz, США) в течение ночи при 4°C при постоянном бережном перемешивании на орбитальном шейкере. Далее были применены вторичные антитела козы к мыши, конъюгированные с пероксидазой хрена (1 : 10000; Jackson's Laboratories, США), период инкубации составлял 1 ч при комнатной температуре. Визуализацию проводили с применением набора ECL Immuno-Cruz (Santa-Cruz, США) и системы гель-документирования ChemiDoc TM ((Bio-Rad, США). Анализ изображения также проводился с помощью программы ImageJ/Fiji (НИН, США). Уровень серого при окрашивании белка в экспериментальных группах сопоставлялся с уровнем серого в контрольной группе.

Двойное иммуномечение и конфокальная микроскопия

Для выполнения иммуногистохимических исследований на криостате (Leica, Германия) при температуре -21... -23°C были приготовлены чередующиеся серии фронтальных срезов головного мозга, содержащие кЧС. Толщина срезов составляла 10 мкм, локализация кЧС осуществлялась согласно атласу для крыс Wistar [28]. Срезы мозга, нанесенные на адгезивные предметные стекла EpreDia SuperFrost (Fischer Scientific, США), сушили в течение суток при комнатной температуре в вертикальном положении и хранили в морозильной камере при температуре -20°C. Для того чтобы выяснить, происходит ли накопление α -синуклеина именно в DA-ергических нейронах кЧС при фармакологическом ингибировании AQP4 в головном мозге в модели БП, нами было выполнена процедура двойного иммуномечения с использованием первичных поликлональных антител кролика против тирозингидроксилазы (ТГ), скорость-лимитирующего фермента синтеза моноаминов и маркера DA-ергических нейронов (1 : 1000; Abcam, Великобритания) и моноклональных антител мыши к α -синуклеину (1 : 100, Santa-Cruz, США). Инкубация проводилась в течение 12 ч при 4°C. В этом исследовании были применены вторичные антитела осла против IgG кролика, конъюгированные с CF568 (красный сигнал, 1 : 500; Sigma, США) и вторичные антитела козы против IgG мыши, конъюгированные с CF488 (зеленый сигнал, 1 : 500; Sigma, США). Препараты исследовали на конфокальном микроскопе Leica TCS SL (Leica, Германия). Захват изображения производили на 2 независимых каналах. Результирующие изображения получали с помощью программы Leica LAS-AF-Lite, дополнительный анализ

области смешанного сигнала и подтверждение колокализации осуществлялся с помощью программы ImageJ/Fiji (НИН, США).

Статистическая обработка результатов

Анализ полученных результатов проводился в программе GraphPad Prism 8. Нормальность распределения проверяли с помощью критерия Шапиро–Уилка, подходящего для анализа малых выборок. Статистическую обработку результатов осуществляли с помощью *t*-критерия Стьюдента и двухфакторного дисперсионного анализа ANOVA, с последующим Tukey post-hoc анализом. Различия результатов между группами считали достоверными при уровне значимости $p < 0.05$, результаты представлены в виде $mean \pm SEM$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Проведенное исследование показало, что введение в ликворную систему головного мозга ингибитора водного канала AQP4 соединения TGN-020 не приводило к изменению уровней общей водорастворимой и модифицированной (Ser129) форм α -синуклеина в кЧС (рис. 1a, 1b) по сравнению с контрольной группой (PBS + PBS). Согласно данным, полученным с помощью метода “ловушки на фильтре” и конфокальной микроскопии, TGN-020 не вызывает патологической агрегации белка с формированием нерастворимых включений α -синуклеина в кЧС (рис. 1c). На результирующем изображении срезов кЧС в DA-ергических нейронах при введении TGN-020 не обнаруживаются агрегатов α -синуклеина (рис. 2a–2c). Полученные данные свидетельствуют о том, что само по себе применение TGN-020 не вызывает развития признаков α -синуклеиновой патологии. Ранее нами было установлено, что выбранная доза TGN-020 не приводила к развитию нейродегенеративного процесса в nigrostriatной системе и появлению моторных дисфункций [26].

Далее мы показали, что в группе крыс, которым вводили ингибитор протеасом ЛЦ (PBS + LC) для моделирования БП, отмечается увеличение уровня общей водорастворимой и фосфорилированной по Ser129 форм α -синуклеина в ткани кЧС с формированием нерастворимых агрегатов α -синуклеина (рис. 1a–1c), что характерно для БП. Агрегаты α -синуклеина средних размеров визуализировались не только в цитоплазме, но и в ядрах DA-ергических нейронов кЧС (рис. 2h, 2i). Агрегация была специфической особенностью DA-нейронов и не наблюдалась в мозге животных, получавших только PBS. Сходные результаты были получены нами ранее при моделировании БП у крыс с помощью ЛЦ [21, 22]. В исследовании, выполненном нами ранее, было показано, что используемая ЛЦ-модель характеризовалась допороговым уровнем нейродегенеративного процесса в nigrostriatной системе (менее 50% погибших нейронов в кЧС) и не сопровождалась развитием моторных нарушений, что свидетельствовало о соответствии доклинической стадии БП [26]. Выяснено, что введение ингибитора AQP4 животным в модели БП

Рис. 1. Влияние TGN-020 на содержание общей и фосфорилированной в положении Ser129 форм α -синуклеина и на количество его агрегатов в черной субстанции в лактацетиновой модели БП у крыс.

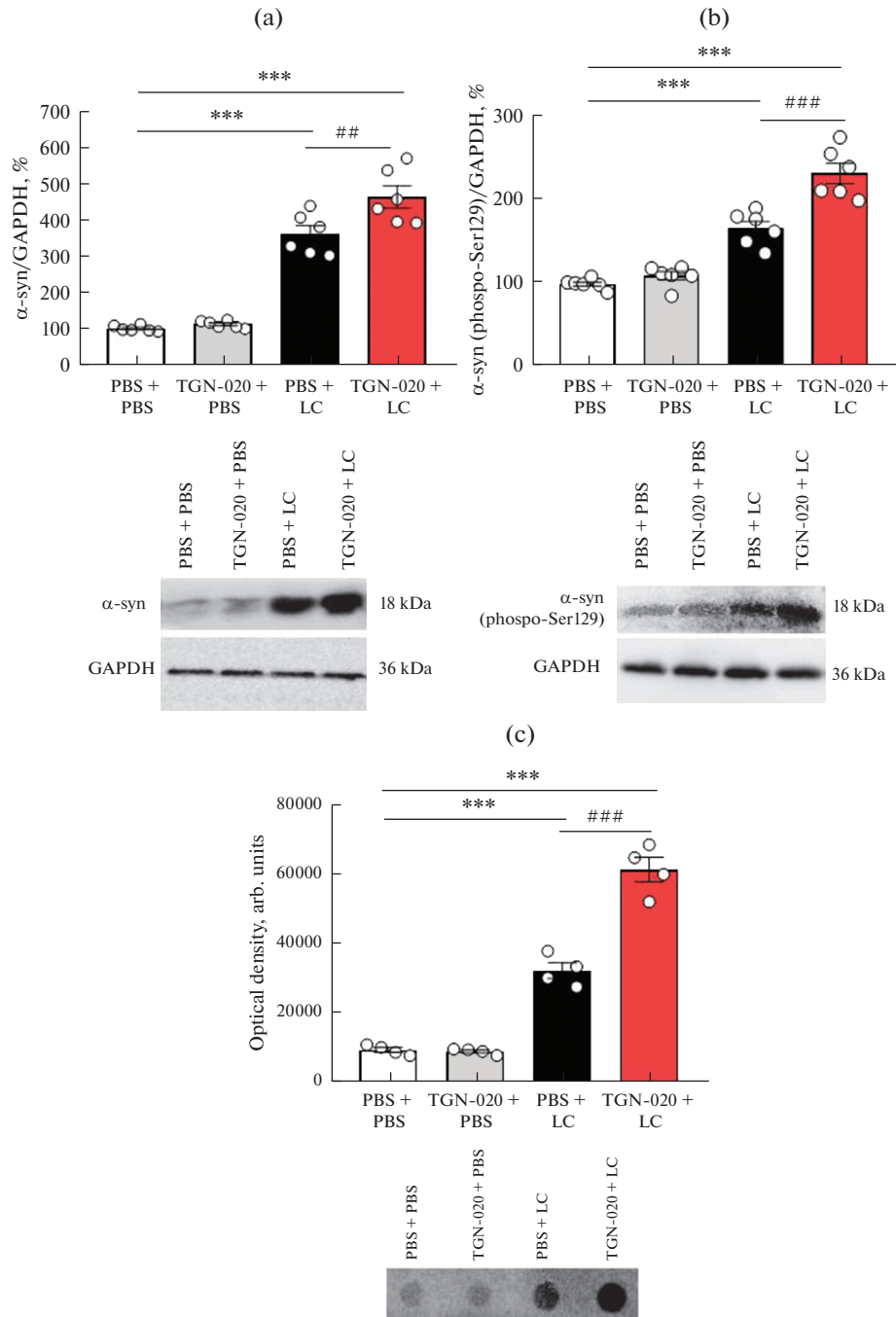
(a) – α -синуклеин (общая форма); для каждой группы $n = 6$ (Interaction F(1, 20) = 5.6; $p = 0.03$; “TGN-020” factor F(1, 20) = 8.7, $p = 0.008$; “LC” factor F(1, 20) = 253.6; $p < 0.001$).

(b) – α -синуклеин (фосфорилированная форма), для каждой группы $n = 6$ (Interaction F(1, 20) = 12.6; $p = 0.002$; “TGN-020” factor F(1, 20) = 22.8, $p < 0.001$; “LC” factor F(1, 20) = 144.2; $p < 0.001$).

(c) – α -синуклеин (количество агрегатов), для каждой группы $n = 4$ (Interaction F(1, 12) = 48.9; $p < 0.001$; “TGN-020” factor F(1, 12) = 46.1, $p < 0.001$; “LC” factor F(1, 12) = 324.6; $p < 0.001$).

*** – $p < 0.001$ – достоверность различий по сравнению с контролем;

– $p < 0.01$, ### – $p < 0.001$ – достоверность различий между ЛЦ и TGN-020 + ЛЦ.



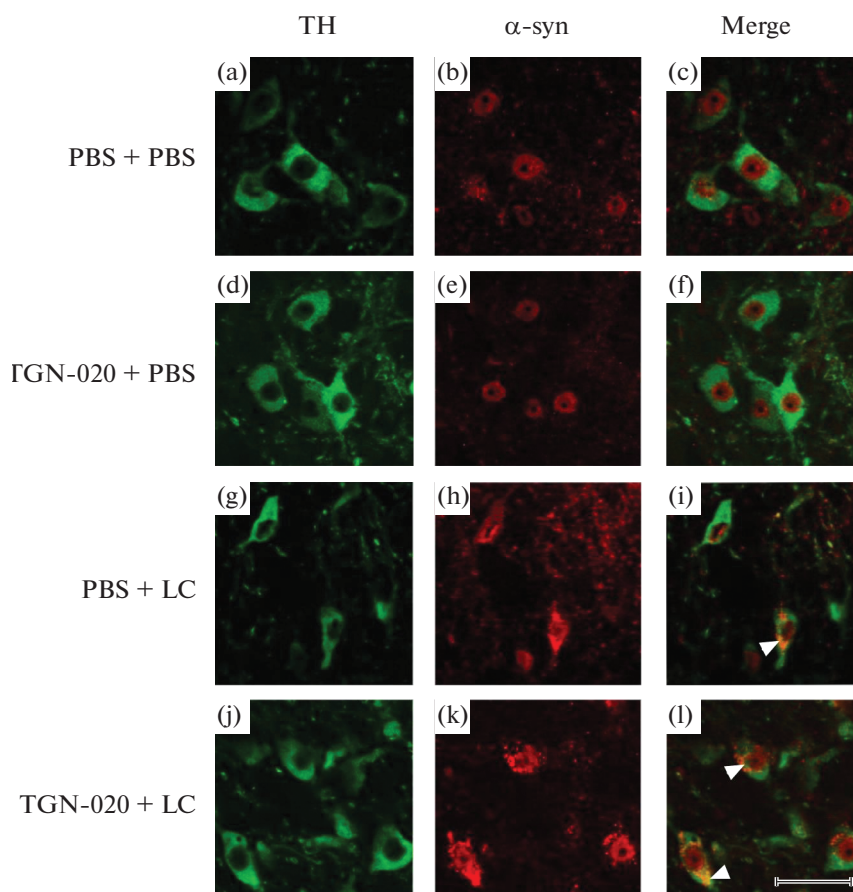


Рис. 2. Влияние TGN-020 на содержание α -синуклеина в ДА-ергических нейронах компактной части черной субстанции в лактацетиновой модели БП у крыс.

Конфокальная микроскопия, масштаб 50 мкм: двойное иммуномечение с применением антител против тирозингидроксилазы (ТГ; зеленый сигнал) и α -синуклеина (красный сигнал). На результирующих изображениях стрелками показаны агрегаты α -синуклеина.

(TGN-020 + LC) вызывает более выраженное накопление патологических форм α -синуклеина. Мы отмечаем прирост уровней общей водорастворимой формы α -синуклеина в 1.3 раза и фосфорилированной Ser129 формы – в 1.4 раза (рис. 1a, 1b) в кЧС по сравнению с модельными животными, не получавшими TGN-020. Кроме того, в этих опытах отмечено ускоренное агрегирование α -синуклеина, о чем свидетельствовало увеличение количества нерастворимых агрегатов α -синуклеина в кЧС в 1.9 раза (рис. 1c). Об этом свидетельствовала интенсивность окрашивания следов нерастворимого α -синуклеина, который остался на ацетат-целлюлозной мембране после фильтрации (рис. 1c). Эти данные согласуются с результатами морфологического анализа, свидетельствующего о накоплении агрегатов α -синуклеина в ДА-ергических нейронах кЧС при введении TGN-020 (рис. 2j–l). Таким образом, можно заключить, что фармакологическое ингибирование активности водного канала приводит к усилению характерных для БП признаков α -синуклеиновой патологии. Эти данные согласуются с результатами предшествующего исследования, в ходе которого нами было показано, что применение TGN-020 в условиях ЛЦ-мо-

дели БП вызывало усиление нейродегенеративного процесса в нигростриатной системе, снижение содержания ТГ в ДА-ергических нейронах, развитие сенсомоторного дефицита и появление признаков дисфункции тонкой моторики передних конечностей, рта и языка [26].

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Для того чтобы выяснить, приводит ли фармакологическое ингибирование активности водного канала AQP4 в головном мозге к усиленному накоплению в кЧС патологических форм α -синуклеина, мы применили ЛЦ-модель БП у крыс, для которой характерны признаки α -синуклеиновой патологии. Это проявлялось увеличением содержания общей водорастворимой формы α -синуклеина и образованием нерастворимых агрегатов α -синуклеина в ДА-ергических нейронах кЧС. Эти данные согласуются с уже опубликованными исследованиями по этой модели [21, 22, 25]. Следует отметить, что в ЛЦ-модели БП мы также наблюдали увеличение содержания фосфорилированной по Ser129 формы α -синуклеина, что характерно для БП. Согласно распространенной точке зрения, данная модификация α -синуклеина является одной из наиболее нейротоксичных и может способствовать агрегированию белка [29, 30].

Мы обнаружили, что фармакологическое ингибирование активности AQP4 в ЛЦ-модели БП у крыс значительно ускоряет патологическое накопление α -синуклеина в кЧС; уровни растворимых мономерных форм α -синуклеина и модифицированной (Ser129) формы значительно превышали уровни, характерные для контрольных модельных животных. При этом накопление α -синуклеина в кЧС было сопряжено с увеличением количества его агрегатов в кЧС, что указывает на ускорение процесса агрегирования белка. Возможно, это являлось следствием чрезмерного накопления фосфорилированной (Ser129) формы α -синуклеина. Предполагается, что усиление α -синуклеиновой патологии при ингибировании активности AQP4 в модели БП может быть одной из причин прогрессирования нейродегенерации в нигростриатной системе и появления моторных нарушений, свидетельствующих об ускорении перехода от доклинической стадии БП к клинической [26]. Полученные данные указывают на то, что AQP4-опосредованная лимфатическая система играет важную роль в удалении растворимого α -синуклеина из ткани кЧС и являются еще одним подтверждением, что дисфункция водного канала AQP4 может быть одним из механизмов патогенеза БП.

Прогрессирование патологических признаков БП при дисфункции водного канала AQP4 отмечено и в других исследованиях. Так, в модели α -патологии у мышей, нокаутированных по AQP4 (AQP4^{+/-}), обнаружено ускоренное накопление патологического α -синуклеина и особенно его нерастворимой формы, содержащей фосфорилированный α -синуклеин Ser129 в стриатуме, черной субстанции и моторной коре [19]. Похожие результаты были получены в другом исследовании, где было установлено, что индукция оверэкспрессии человеческого A53T- α -синуклеина в ЧС у мышей, нокаутированных по AQP4, приводила к усилению накопления α -синуклеина, сопровождавшемуся увеличением числа погибших ДА-ергических нейронов и усилением моторных нарушений [20]. Недавно показано, что ингибирование активности водного канала AQP4 с помощью TGN-020 в 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридин (МФТП)-модели БП у мышей усугубляло не только процесс нейродегенерации в нигростриатной системе, но и реактивный астроглиоз [31]. Усиление амилоидогенеза и нейродегенерации при введении ингибитора TGN-020 отмечено и в животных моделях болезни Альцгеймера [14, 15].

Таким образом, полученные нами экспериментальные данные и данные литературы подтверждают значимость водного канала AQP4 для выведения амилоидных

белков по лимфатическому пути. Нарушение работы AQP4 может значительно снизить эффективность лимфатического клиренса α -синуклеина из межклеточного пространства, приведя тем самым к усилению его распространения, интернализации другими клетками и усугублению нейродегенеративного процесса. В пользу этой версии свидетельствуют результаты экспериментов с введением α -синуклеина с флуоресцентной меткой в дорсальный стриатум и кЧС нокаутированным по AQP4 мышам, где было отмечено замедление выведения трейсера [19, 20]. Похожий эффект был обнаружен при микроинъекциях меченого α -синуклеина в кЧС мышам, которым вводили ингибитор AQP4 ацетазоламид [20]. Однако точные механизмы выведения α -синуклеина и других амилоидогенных белков из ткани мозга в ликвор остаются неизвестными и для того, чтобы их выяснить, требуется продолжение исследований в этой области. Так как AQP4 вовлечен в регуляцию водного обмена в мозге, можно предположить, что его дисфункция может привести к нарушению гидростатического давления и ионного баланса, изменению микроциркуляции жидкости между параваскулярным, межклеточным и внутриклеточным пространством [32]. Дефицит AQP4 может приводить к снижению внеклеточного содержания ионов калия и накоплению внеклеточного глутамата и эксайтотоксичности, которая, в свою очередь, может способствовать гибели DA-ергических нейронов при БП [32, 33]. Кроме того, установлено, что нокаутированные по AQP4 мыши характеризовались более высоким уровнем окислительного стресса в головном мозге [34]. Окислительный стресс известен как один из факторов, предрасполагающих к посттрансляционной модификации α -синуклеина и агрегации [35]. Таким образом, ухудшение работы AQP4 приводит к разнообразным нарушениям микроокружения и функционирования нейронов и других клеток мозга. Накопление α -синуклеина и других амилоидогенных белков может быть одним из последствий этих событий. Известно, что важную роль в очистке межклеточного пространства от нейротоксичных форм α -синуклеина и других aberrantных белков играют астроциты, однако дисфункция AQP4 может нарушить способность этих клеток к захвату и деградации α -синуклеина, а также вызвать их гибель [6]. Микроглиоциты также могут поглощать α -синуклеин, однако при этом они также способны продуцировать экзосомы, содержащие этот белок, что способствует дальнейшему распространению α -синуклеиновой патологии и развитию нейровоспаления [36].

Таким образом, результаты наших экспериментов являются еще одним подтверждением существования взаимосвязи между дисфункцией AQP4 и накоплением α -синуклеина в головном мозге при развитии Паркинсон-подобной патологии. Дальнейшее исследование роли AQP4 в контроле водного гомеостаза, обеспечении благоприятных условий для функционирования клеток мозга и своевременной “очистки” ткани мозга от цитотоксических форм α -синуклеина и других белков, участвующих в патогенезе неизлечимых нейродегенеративных заболеваний, представляется весьма актуальным. Поиск путей воздействия на функционирование, внутриклеточную транспортировку и локализацию этого канала может внести значимый вклад в разработку новых методов, направленных на предотвращение или замедление развития Паркинсон-подобных патологий и других нейродегенеративных заболеваний.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Манипуляции с животными соответствовали принципам Базельской декларации и протоколу № 1-14/2022 заседания № 1 комиссии по биоэтике Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН от 27.01.2022 г.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование выполнено при поддержке Российского научного фонда (проект № 22-25-00607).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы декларируют отсутствие конфликта интересов.

ВКЛАД АВТОРОВ

Идея работы и планирование эксперимента (К.В.Л., И.В.Е.), проведение экспериментов (М.В.Х, М.П.К., К.В.Л.), обработка данных (К.В.Л.), написание и редактирование манускрипта (К.В.Л., И.В.Е.).

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность В.А. Полукееву (АО “Вектон”, Санкт-Петербург) за синтез водорастворимой формы TGN-020 и В.Н. Шипилову (ИЭФБ РАН, Санкт-Петербург) за проведение лиофилизации этого препарата. При выполнении данного исследования был применен ряд приборов, принадлежащих Центру коллективного пользования ИЭФБ РАН: лиофильная сушилка (Labconco, США), система гель-документирования ChemiDoc ТМ (Bio-Rad, США), конфокальный микроскоп Leica TCS SL (Leica, Германия).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Ou Z, Pan J, Tang S, Duan D, Yu D, Nong H, Wang Z* (2021) Global trends in the incidence, prevalence, and years lived with disability of Parkinson's disease in 204 countries/territories from 1990 to 2019. *Front Public Health* 9: 776847. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2021.776847>
2. *Montemurro N, Aliaga N, Graff P, Escribano A, Lizana J* (2022) New targets and new technologies in the treatment of Parkinson's disease: A narrative review. *Int J Environ Res Public Health* 19(14): 8799. <https://doi.org/10.3390/ijerph19148799>
3. *Raza C, Anjum R, Shakeel NUA* (2019) Parkinson's disease: Mechanisms, translational models and management strategies. *Life Sci* 226: 77–90. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2019.03.057>
4. *Calabresi P, Mechelli A, Natale G, Volpicelli-Daley L, Di Lazzaro G, Ghiglieri V* (2023) Alpha-synuclein in Parkinson's disease and other synucleinopathies: from overt neurodegeneration back to early synaptic dysfunction. *Cell Death Dis* 14(3): 176. <https://doi.org/10.1038/s41419-023-05672-9>
5. *Masuda-Suzukake M, Nonaka T, Hosokawa M, Oikawa T, Arai T, Akiyama H, Mann DM, Hasegawa M* (2013) Prion-like spreading of pathological α -synuclein in brain. *Brain* 136(Pt 4): 1128–1138. <https://doi.org/10.1093/brain/awt037>
6. *Sorrentino ZA, Giasson BI, Chakrabarty P* (2019) α -Synuclein and astrocytes: tracing the pathways from homeostasis to neurodegeneration in Lewy body disease. *Acta Neuropathol* 138(1): 1–21. <https://doi.org/10.1007/s00401-019-01977-2>
7. *Song N, Chen L, Xie J* (2021) Alpha-synuclein handling by microglia: Activating, combating, and worsening. *Neurosci Bull* 7(6): 751–753. <https://doi.org/10.1007/s12264-021-00651-6>
8. *Frankowska N, Lisowska K, Witkowski JM* (2022) Proteolysis dysfunction in the process of aging and age-related diseases. *Front Aging* 3: 927630. <https://doi.org/10.3389/fragi.2022.927630>
9. *Ilijff JJ, Wang M, Liao Y, Plogg BA, Peng W, Gundersen GA, Benveniste H, Vates GE, Deane R, Goldman SA, Nagelhus EA, Nedergaard M* (2012) A paravascular pathway facilitates CSF flow through the brain parenchyma and the clearance of interstitial solutes, including amyloid β . *Sci Transl Med* 4(147): 147ra111. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3003748>
10. *Nedergaard M* (2013) Neuroscience. Garbage truck of the brain. *Science* 340(6140): 1529–1530. <https://doi.org/10.1126/science.1240514>

11. *Semyachkina-Glushkovskaya OV, Postnov DE, Khorovodov AP, Navolokin NA, Kurthz JHG* (2023) Lymphatic drainage system of the brain: a New player in neuroscience. *J Evol Biochem Phys* 59: 1–19.
<https://doi.org/10.1134/S0022093023010015>
12. *Ding Z, Fan X, Zhang Y, Yao M, Wang G, Dong Y, Liu J, Song W* (2023) The glymphatic system: a new perspective on brain diseases. *Front Aging Neurosci* 15: 1179988.
<https://doi.org/10.3389/fnagi.2023.1179988>
13. *Hubbard JA, Szu JI, Binder DK* (2018) The role of aquaporin-4 in synaptic plasticity, memory and disease. *Brain Res Bull* 136: 118–129.
<https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2017.02.011>
14. *Harrison IF, Ismail O, Machhada A, Colgan N, Ohene Y, Nahavandi P, Ahmed Z, Fisher A, Mef-tah S, Murray TK, Ottersen OP, Nagelhus EA, O'Neill MJ, Wells JA, Lythgoe MF* (2020) Impaired glymphatic function and clearance of tau in an Alzheimer's disease model. *Brain* 143(8): 2576–2593.
<https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2018.04.012>
15. *Rosu GC, Catalin B, Balseanu TA, Laurentiu M, Claudiu M, Kumar-Singh S, Daniel P* (2020) In-hibition of aquaporin 4 decreases amyloid A β 40 drainage around cerebral vessels. *Mol Neuro-biol* 57(11): 4720–4734.
<https://doi.org/10.1007/s12035-020-02044-8>
16. *Hoshi A, Tsunoda A, Tada M, Nishizawa M, Ugawa Y, Kakita A* (2017) Expression of aquaporin 1 and aquaporin 4 in the temporal neocortex of patients with Parkinson's Disease. *Brain Pathol* 27(2): 160–168.
<https://doi.org/10.1111/bpa.12369>
17. *Fang Y, Dai S, Jin C, Si X, Gu L, Song Z, Gao T, Chen Y, Yan Y, Yin X, Pu J, Zhang B* (2022) Aquaporin-4 polymorphisms are associated with cognitive performance in Parkinson's disease. *Front Aging Neurosci* 13: 740491.
<https://doi.org/10.3389/fnagi.2021.740491>
18. *Sun X, Tian Q, Yang Z, Liu Y, Li C, Hou B, Xie A* (2023) Association of AQP4 single nucleotide polymorphisms (rs335929 and rs2075575) with Parkinson's disease: A case-control study. *Neu-rosci Lett* 797: 137062.
<https://doi.org/10.1016/j.neulet.2023.137062>
19. *Cui H, Wang W, Zheng X, Xia D, Liu H, Qin C, Tian H, Teng J* (2021) Decreased AQP4 expres-sion aggravates α -synuclein pathology in Parkinson's disease mice, possibly via impaired glym-phatic clearance. *J Mol Neurosci* 71: 1–14.
<https://doi.org/10.1007/s12031-021-01836-4>
20. *Zhang Y, Zhang C, He XZ, Li ZH, Meng JC, Mao RT, Li X, Xue R, Gui Q, Zhang GX, Wang LH* (2023) Interaction between the glymphatic system and α -synuclein in Parkinson's disease. *Mol Neurobiol* 60(4): 2209–2222.
<https://doi.org/10.1007/s12035-023-03212-2>
21. *Ekimova IV, Belan DV, Lapshina KV, Pastukhov YuF* (2023) The use of the proteasome inhibitor lactacystin for modeling Parkinson's disease: Early neurophysiological biomarkers and candi-dates for intranigral and extranigral neuroprotection. In: *Handbook of Animal Models in Neu-rological Disorders*. (Eds) Martin CR, Patel VB, Preedy VR. Acad Press, Elsevier. 507–523.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-323-89833-1.00008-2>
22. *Ekimova IV, Plaksina DV, Pastukhov YF, Lapshina KV, Lazarev VF, Mikhaylova ER, Polonik SG, Pani B, Margulis BA, Guzhova IV, Nudler E* (2018) New HSF1 inducer as a therapeutic agent in a rodent model of Parkinson's disease. *Exp Neurol* 306: 199–208.
<https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2018.04.012>
23. *McNaught KS, Perl DP, Brownell AL, Olanow CW* (2004) Systemic exposure to proteasome in-hibitors causes a progressive model of Parkinson's disease. *Ann Neurol* 56(1): 149–162.
<https://doi.org/10.1002/ana.20186>
24. *Vernon AC, Johansson SM, Modo MM* (2010) Non-invasive evaluation of nigrostriatal neuropathology in a proteasome inhibitor rodent model of Parkinson's disease. *BMC Neurosci* 11: 1.
<https://doi.org/10.1186/1471-2202-11-1>
25. *Savolainen MH, Albert K, Airavaara M, Myöhänen TT* (2017) Nigral injection of a proteasomal inhibitor, lactacystin, induces widespread glial cell activation and shows various phenotypes of Parkinson's disease in young and adult mouse. *Exp Brain Res* 235(7): 2189–2202.
<https://doi.org/10.1007/s00221-017-4962-z>
26. *Lapshina KV, Abramova YY, Guzeev MA, Ekimova IV* (2022) TGN-020, an inhibitor of the water channel aquaporin-4, accelerates nigrostriatal neurodegeneration in the rat model of Parkin-son's disease. *J Evol Biochem Phys* (58): 2035–2047.
<https://doi.org/10.1134/S0022093022060308>

27. Nakamura Y, Suzuki Y, Tsujita M, Huber VJ, Yamada K, Nakada T (2011) Development of a novel ligand, [C]TGN-020, for aquaporin 4 positron emission tomography imaging. *ACS Chem Neurosci* 2(10): 568–571.
<https://doi.org/10.1021/cn2000525>
28. Paxinos G, Watson C (2007) *The rat brain in stereotaxic coordinates*. 6th Ed. San Diego. Acad Press.
29. Sato H, Arawaka S, Hara S, Fukushima S, Koga K, Koyama S, Kato T (2011) Authentically phosphorylated α -synuclein at Ser129 accelerates neurodegeneration in a rat model of familial Parkinson's disease. *J Neurosci* 31(46): 16884–16894.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3967-11.2011>
30. Kawahata I, Finkelstein DI, Fukunaga K (2022) Pathogenic impact of α -synuclein phosphorylation and its kinases in α -synucleinopathies. *Int J Mol Sci* 23(11): 6216.
<https://doi.org/10.3390/ijms23116216>
31. Si X, Dai S, Fang Y, Tang J, Wang Z, Li Y, Song Z, Chen Y, Liu Y, Zhao G, Zhang B, Pu J (2023) Matrix metalloproteinase-9 inhibition prevents aquaporin-4 depolarization-mediated glymphatic dysfunction in Parkinson's disease. *J Adv Res* 20: S2090–S1232.
<https://doi.org/10.1016/j.jare.2023.03.004>
32. Vandebroek A, Yasui M (2020) Regulation of AQP4 in the Central Nervous System. *Int J Mol Sci* 21(5): 1603.
<https://doi.org/10.3390/ijms21051603>
33. Zhang Y, Tan F, Xu P, Qu S (2016) Recent advance in the relationship between excitatory amino acid transporters and Parkinson's disease. *Neural Plast* 2016: 8941327.
<https://doi.org/10.1155/2016/8941327>
34. Liu L, Lu Y, Kong H, Li L, Marshall C, Xiao M, Ding J, Gao J, Hu G (2012) Aquaporin-4 deficiency exacerbates brain oxidative damage and memory deficits induced by long-term ovarian hormone deprivation and D-galactose injection. *Int J Neuropsychopharmacol* 15(1): 55–68.
<https://doi.org/10.1017/S1461145711000022>
35. Won SJ, Fong R, Butler N, Sanchez J, Zhang Y, Wong C, Tambou Nzoutchoum O, Huynh A, Pan J, Swanson RA (2022) Neuronal oxidative stress promotes α -synuclein aggregation in vivo. *Antioxidants (Basel)* 11(12): 2466.
<https://doi.org/10.3390/antiox11122466>
36. Song N, Chen L, Xie J (2021) Alpha-synuclein handling by microglia: activating, combating, and worsening. *Neurosci Bull* 37(6): 751–753.
<https://doi.org/10.1007/s12264-021-00651-6>

Pharmacological Inhibition of the AQP4 Water Channel Activity Causes an Aggravation of Alpha-Synuclein Pathology in the Substantia Nigra in a Rat Model of Parkinson's Disease

K. V. Lapshina^{a,*}, M. V. Khanina^a, M. P. Kaismanova^a, and I. V. Ekimova^a

^a*Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry of the Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russia*

^{*}*e-mail: ksenia.lapshina@gmail.com*

The misfolding of the protein α -synuclein, which leads to the formation of neurotoxic oligomers and aggregates, is one of the main causes of loss of dopaminergic (DA) neurons within the substantia nigra pars compacta (SNpc) in Parkinson's disease (PD). We previously found that pharmacological inhibition of the water channel aquaporin-4 (AQP4), participating in the mechanisms of brain clearance of amyloidogenic proteins, caused the aggravation of neurodegeneration in the nigrostriatal system and the development of motor disturbances in a lactacystin model of PD. It was hypothesized that the progression of neurodegeneration can be a result of the excessive accumulation of pathologic forms of α -synuclein due to the AQP4 inhibition. The aim of this study is to determine whether pharmacological inhibition of AQP4 activity in a rat model of preclinical PD leads to an aggravation in α -synuclein pathology. The experiments were performed on male Wistar rats. AQP4 activity was suppressed using the intracerebroventricular injection of inhibitor TGN-020. To reproduce the model of the preclinical stage of PD, a specific proteasome inhibitor lactacystin (LC) was used. It was injected bilaterally into the SNpc. Immunoblotting methods and confocal microscopy were applied. The LC

model of PD was characterized by a pathologic accumulation of total water-soluble and Ser129-phosphorylated forms of α -synuclein, as well as by formation of insoluble α -synuclein aggregates in the DA-neurons of SNpc. TGN-020 caused a significant aggravation of α -synuclein pathology in the LC model of PD. It was manifested by a marked increase in the level of water-soluble and modified forms of α -synuclein and by the 1.9-fold rise in the amount of α -synuclein aggregates in SN. We suppose that the disfunction of AQP4 which is involved in glymphatic system functioning, can be one of the mechanisms leading to the neurodegeneration and accumulation of amyloidogenic proteins in brain parenchyma during PD. The water channel AQP4 might be a target for the development of new therapeutic approaches aimed at attenuation of the cytotoxicity, accumulation and distribution of α -synuclein during the development of PD-like pathology.

Keywords: aquaporin-4, α -synuclein, neurodegeneration, ubiquitin-proteasome system, substantia nigra, Parkinson's disease