
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

**НОКДАУН AQP4 В ЧЕРНОЙ СУБСТАНЦИИ УСУГУБЛЯЕТ
 α -СИНУКЛЕИНОВУЮ ПАТОЛОГИЮ, НЕЙРОДЕГЕНЕРАЦИЮ
И МОТОРНЫЕ НАРУШЕНИЯ В МОДЕЛИ БОЛЕЗНИ ПАРКИНСОНА
У КРЫС**

© 2025 г. К. В. Лапшина¹*, М. В. Ханина¹, М. А. Гузеев¹,
М. П. Кайсманова¹, И. В. Екимова¹

¹Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН,
Санкт-Петербург, Россия
*E-mail: ksenia.lapshina@gmail.com

Поступила в редакцию 25.07.2025 г.
После доработки 02.09.2025 г.
Принята к публикации 03.09.2025 г.

Водный канал аквапорин-4 (AQP4) является важнейшим участником молекулярно-клеточных механизмов, обеспечивающих выведение из ткани мозга различных метаболитов и амилоидных белков. Предполагается, что дисфункция AQP4 может провоцировать развитие болезни Паркинсона (БП) и приводить к ее усугублению. Цель данного исследования – выяснить, влияет ли снижение экспрессии AQP4 в компактной части черной субстанции (кЧС) на развитие α -синуклеиновой патологии, нейродегенерации и моторных нарушений в модели клинической стадии БП у крыс. Эксперименты выполнены на самцах крыс популяции Вистар (6–7 месяцев). Для подавления экспрессии AQP4 в кЧС вводили лентивирусную конструкцию, содержащую нуклеотидную последовательность, кодирующую шпилечную РНК (shRNA) к мРНК AQP4 (AQP4-LVC). Для воспроизведения модели клинической стадии БП билатерально вводили в кЧС ингибитор протеасом лактацистин (LC) через 4 недели после введения AQP4-LVC. Для решения поставленной задачи использованы поведенческие тесты, иммуногистохимический метод и иммуноблоттинг. Применение AQP4-LVC вызывало снижение содержания белка AQP4 в кЧС на 42% через 4 недели. LC-модель БП характеризовалась появлением моторных нарушений, гибелью 57% дофамин (ДА)-ергических нейронов в кЧС и 56% их аксонов в стриатуме, ослаблением компенсаторных процессов, направленных на поддержание уровня ДА в нигростриатной системе, увеличением содержания общей водорастворимой формы α -синуклеина и его агрегированной и фосфорилированной (Ser129) форм. Снижение экспрессии AQP4 в кЧС в LC-модели БП вызывало усиление моторных нарушений и появление признаков дистрофии, свидетельствующих о развитии терминальной фазы клинической стадии БП. Быстрое нарастание симптомов паркинсонизма было связано с усилением нейродегенерации и истощением компенсаторных процессов в нигростриатной системе, сопряженных с ускорением образования патологических агрегированных форм α -синуклеина. Полученные данные свидетельствуют о том, что дефицит AQP4 в кЧС ускоряет развитие Паркинсон-подобной патологии.

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

ВВЕДЕНИЕ

Болезнь Паркинсона (БП) является хроническим прогрессирующим нейродегенеративным заболеванием, которое широко распространено среди пожилых людей во всем мире и занимает второе место по встречаемости после болезни Альцгеймера [1]. Отличительной чертой БП является обширная гибель дофамин (ДА)-ергических нейронов компактной части черной субстанции (кчЧС), приводящая к развитию постуральной неустойчивости, тремора, ригидности и брадикинезии [2]. В настоящее время достигнуты некоторые успехи в разработке терапевтических подходов, направленных на коррекцию двигательных нарушений при БП, однако препаратов, нацеленных на предотвращение или замедление дегенерации нейронов головного мозга до сих пор не создано. Поэтому БП на сегодняшний день остается неизлечимой, и ее распространенность неуклонно растет в связи с увеличением числа долгожителей [3, 4]. В связи с этим изучение патогенетических механизмов БП с целью поиска молекулярных мишеней для нейропротекции при БП не теряет своей актуальности.

Известно, что важнейшим фактором в патогенезе БП является аккумуляция в клетках и во внеклеточном пространстве ткани головного мозга токсичных форм белка α -синуклеина (в частности, α -синуклеина, фосфорилированного в положении Ser129), возникающих в результате нарушения его конформации [5]. Накоплению α -синуклеина может способствовать характерное для процессов старения и развития БП снижение активности убиквитин-протеасомной системы (УПС) и аутофаголизосомной систем, участвующих в утилизации поврежденных белков внутри клетки [6]. Кроме того, предполагается, что определенный вклад в усиление α -синуклеиновой патологии при БП может вносить уменьшение эффективности работы лимфатической и лимфатической систем головного мозга, обеспечивающих удаление различных метаболитов и амилоидных белков из ткани головного мозга [7–10]. Дисфункция лимфатической системы может быть связана с нарушением работы ее основного компонента – белка водного канала аквапорина-4 (aquaporin-4, AQP4), локализующегося в основном на отростках астроцитов, окружающих кровеносные сосуды [8, 11, 12]. AQP4 поддерживает быстрый двунаправленный транспорт воды, входящей в состав ликвора и интерстициальной жидкости ткани мозга, контролируя водный гомеостаз и функционирование клеток ткани головного мозга и способствуя выведению накопленных метаболитов в ликвор. Далее поступившие в ликвор “отходы” могут элиминироваться менингеальной лимфатической системой [13, 14]. Однако стоит отметить, что лимфатическая теория вызывает разногласия в научном сообществе, поскольку остается много открытых вопросов в отношении ее работы во время сна, функционально-анатомической организации и других аспектов [13, 15, 16]. Тем не менее ряд данных дает основание предполагать наличие взаимосвязи между нарушением функционирования AQP4 и прогрессированием БП [17–21]. Проведенные исследования показали, что снижение экспрессии AQP4 в астроцитах сопряжено с более выраженным накоплением α -синуклеина у пациентов с БП [17]. Мыши, частично нокаутированные по AQP4, демонстрируют усугубление патологических признаков БП в хронической синуклеиновой модели и нейротоксической модели с использованием 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридина (МРТР). В этих исследованиях показано, что дефицит AQP4 ускоряет патологическое отложение α -синуклеина и усиливает нейродегенерацию и микроглиоз у мышей, что способствует развитию двигательных расстройств [22–24]. Можно предположить, что это происходит за счет сбоя в работе AQP4-зависимых клеточно-молекулярных механизмов головного мозга, приводящих к прогрессированию α -синуклеиновой патологии и развитию нейродегенеративных процессов [25].

Следует отметить, что работы, посвященные изучению роли AQP4 в патогенезе БП, немногочисленны. Такие исследования проводились всего лишь на двух моделях БП (МРТР-модель и модель α -синуклеиновой патологии) у нокаутированных и частично

нокаутированных по AQP4 мышей [22–24, 26], а также в нашей лаборатории в лактастининовой модели БП у крыс с применением фармакологического ингибирования AQP4 2-(никотинамид)-1,3,4-тиадиазолом (TGN-020) [28, 29]. Однако этих данных может быть недостаточно для подтверждения гипотезы об участии AQP4 в развитии заболевания, учитывая многогранность патогенеза БП. Недостатками использования генетически модифицированных животных является трудоемкость и высокая стоимость таких экспериментов, частичная воспроизводимость патогенетических признаков болезни, возможность развития компенсаторных процессов и ряд других факторов. Применение ингибиторов AQP4 может быть сопряжено с недостаточной специфичностью и развитием побочных эффектов. По этой причине представляется важной разработка иных подходов, влияющих на функции AQP4, а также использование различных патогенетически обоснованных моделей БП. Для изучения роли AQP4 в патогенезе БП авторы данной работы применили метод РНК-интерференции, обеспечив локальный нокдаун AQP4 в кЧЧС, которая патогенетически значима для БП. Мы использовали разработанную ранее в лаборатории модель клинической стадии БП на основе угнетения активности УПС в головном мозге с помощью ингибитора протеасом лактастинина (LC). Достоинством этой модели является возможность воссоздать ключевые признаки БП – развитие α -синуклеиновой патологии и нейровоспаления, нейродегенеративный процесс в нигростриатной системе, нарушение моторного поведения и др. [29, 30]. В реальной жизни пациенты в большинстве случаев обращаются к врачу уже на клинической стадии БП, и это обстоятельство диктует необходимость применения таких моделей для исследования факторов, влияющих на скорость прогрессирования БП и поиска молекулярных мишеней и подходов, направленных на замедление нейродегенеративного процесса.

Задача настоящего исследования заключалась в том, чтобы выяснить, влияет ли снижение экспрессии AQP4 в компактной части черной субстанции на развитие α -синуклеиновой патологии, нейродегенерации и моторных нарушений в LC модели клинической стадии БП у крыс.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Животные. В работе использованы половозрелые самцы крыс популяции Вистар массой 380–420 г в возрасте 6 месяцев, выращенные в виварии Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова. Во время эксперимента животные содержались в виварии в индивидуальных клетках при естественном освещении, температуре воздуха 23 ± 1 °C и с неограниченным доступом к воде и пище.

Препараты и дизайн эксперимента. Для локального подавления экспрессии AQP4 в кЧЧС применяли лентивирусную конструкцию, включающую шпилечную РНК AQP4 (AQP4-LVC) (sc-156007-V rat, Santa-Cruz Biotechnologies, США). Суспензию, содержащую AQP4-LVC (25000 вирусных частиц в объеме 5 мкл), вводили крысам билатерально в кЧЧС по следующим координатам: 5.0 мм каудальнее брегмы, 2.0 мм латерально слева и справа от сагиттального шва и 7.5 мм ниже поверхности черепа [31]. Для наркотизации животных перед выполнением микроинъекций использовали золетил (Zoletil® (Virbac, Франция), в дозе 50 мг/кг внутримышечно). Введение препаратов осуществляли с применением стереотаксического устройства (Narishige, Япония) и шприца для микроинъекций (Hamilton Company, США).

В качестве контрольных растворов использовали контрольную лентивирусную конструкцию, содержащую шпилечную РНК, не приводящую к деградации известных мРНК (con-LVC (scrambled), sc-108080, Santa-Cruz Biotechnology, США), или стерильный фосфатно-солевой буфер (phosphate-buffered saline, PBS), пропущенный через фильтр-насадку на шприц (PVDF 0.22 мкм, JetBiofil, Корея) в объеме 5 мкл. Для

оценки распространения лентивируса отдельной группе крыс также была введена конструкция, несущая ген зеленого флуоресцентного белка *scGFP-LVC* (*sc-108084*, Santa-Cruz Biotechnology, США).

Перед выполнением основной экспериментальной задачи были проведены предварительные опыты, целью которых являлась оценка изменения содержания AQP4 в кЧС методом Вестерн-блоттинга при частичном подавлении экспрессии и выбор временной точки для воспроизведения модели БП. Данная серия включала группы крыс, которым вводили PBS ($n = 4$), *con-LVC* ($n = 4$) и *AQP4-LVC* ($n = 4$). Через 4 недели животных наркотизировали с использованием хлоралгидрата (внутрибрюшинно, 400 мг/кг), декапитировали и забирали образцы мозга, содержащие кЧС. Чтобы выяснить, вызывает ли применение лентивирусных конструкций развитие нейродегенеративных изменений в кЧС, у аналогичных групп животных (*PBS* ($n = 5$), *con-LVC* ($n = 5$) и *AQP4-LVC* ($n = 5$)) через 4 недели забирали головной мозг для последующего патоморфологического анализа.

При выполнении основной серии экспериментов в рамках данного исследования через 4 недели после введения PBS или лентивирусных конструкций животным вводили билатерально в кЧС специфический ингибитор активности протеасом LC (*Enzo Lifesciences*, Великобритания) в дозе 4 мкг и в объеме 1 мкл, еще через неделю микроинъекцию повторяли. Контрольный раствор PBS (применявшийся в качестве растворителя для LC) вводили в кЧС в объеме 1 мкл в том же режиме. Данная модель клинической стадии БП у крыс основана на угнетении активности УПС в нигростриатной системе и была ранее разработана в лаборатории [30].

Через 14 дней после второй микроинъекции LC были проведены тесты для оценки моторных функций, после которых животных наркотизировали с помощью хлоралгидрата (внутрибрюшинно, 400 мг/кг), декапитировали и забирали образцы мозга, разделяя на половинки (для иммуногистохимического исследования и иммуноблоттинга). На протяжении всего эксперимента животных взвешивали каждую неделю.

Путем простой рандомизации были сформированы следующие экспериментальные группы:

- 1) *PBS* – контрольная группа (введение PBS в начале эксперимента и через 4 недели) ($n = 6$);
- 2) *con-LVC* – контрольная группа (введение контрольной лентивирусной конструкции *con-LVC* в начале эксперимента и введение PBS через 4 недели) ($n = 6$);
- 3) *AQP4-LVC* – нокдаун AQP4 (введение целевой лентивирусной конструкции *AQP4-LVC* в начале эксперимента и введение PBS через 4 недели) ($n = 6$);
- 4) LC – модель БП (введение PBS в начале эксперимента и введение LC через 4 недели) ($n = 6$);
- 5) *AQP4-LVC + LC* – модель БП в условиях нокдауна AQP4 (введение целевой лентивирусной конструкции *AQP4-LVC* и введение LC через 4 недели) ($n = 7$).

Изучение моторного поведения

Тест с семенами подсолнечника (Sunflower seed test) использовали для оценки мелкой моторики передних конечностей, рта и языка [32]. В период содержания крыс в виварии в их рацион периодически добавляли небольшое количество семян подсолнечника. За сутки до тестирования крыс не кормили. В день эксперимента не менее чем за 1 ч до проведения теста животных переносили в экспериментальную комнату для адаптации. В начале эксперимента каждая крыса получала 10 семян подсолнечника. В результате эксперимента с применением видеорегистрации для каждого животного определяли среднее время, затрачиваемое им на манипуляции, необходимые для поедания одного семени (взятие семечка передними конечностями, вскрытие кожуры, извлечение и поедание).

Тест открытое поле (open field test) дает возможность выявить признаки гипокинезии и акинезии по изменению общей двигательной активности животного [33]. Не менее чем за 1 ч до проведения теста животных переносили в экспериментальную комнату для адаптации. Крысу помещали в центр открытого поля (ООО “НПК Открытая Наука”, Россия), запускали программу видеотрекинга EthoVision (Noldus, США) и наблюдали за ее поведением в течение 5 мин. После тестирования каждого животного поверхности протирали влажной губкой и дезодорировали 3%-ным раствором перекиси водорода. Для оценки изменения общей двигательной активности выполняли автоматизированное вычисление общей длины пути, пройденного каждой крысой (distance), числа вертикальных стоек (rearing), средней скорости передвижения (velocity) и латентного периода начала движения (leaving center).

Тест “Сужающаяся дорожка” (Beam-walking test). Установку “Сужающаяся дорожка” (ООО “НПК Открытая Наука”) использовали для оценки моторной функции передних и задних конечностей, на основе чего можно выявить признаки развития сенсомоторного дефицита [34]. В данном тесте животное должно пройти по постепенно сужающемуся брусу и зайти в темный отсек на другом конце бруса. Брус состоял из 2-х частей: верхней, по которой должна проходить крыса, и более широкой нижней вставки, позволяющей фиксировать соскальзывания лапок и ошибочные постановки конечностей. В течение 4–5 дней до финального тестирования проводили предварительное обучение и адаптацию животных к помещению и экспериментальной установке. В день эксперимента не менее чем за 1 ч до проведения теста животных переносили в экспериментальную комнату для адаптации. Тест “Сужающаяся дорожка” проводили с видеорегистрацией 3-х попыток прохождения для каждой крысы. При анализе результатов регистрировали постановку лапы на верхнюю или нижнюю доску и подсчитывали количество постановок конечности на нижнюю доску (ошибок), количество соскальзываний конечности с верхней доски на нижнюю и общее количество шагов животного от стартовой линии до попадания в темный отсек. Полученные по 3-м попыткам данные усредняли и далее рассчитывали степень выраженности сенсомоторного дефицита:

$$\text{Сенсомоторный дефицит, \%} = \frac{\text{ошибка} + 0.5 \times \text{соскальзывание}}{\text{общее количество шагов}} \times 100.$$

Иммуноблоттинг

Метод Вестерн-блоттинг был применен для оценки содержания в кЧС AQP4, общей водорастворимой формы белка α -синуклеина и его формы, фосфорилированной в положении Ser129. Образцы ткани мозга, содержащие кЧС, гомогенизировали с применением буфера Radioimmunoprecipitation Assay (RIPA) buffer с добавлением коктейля ингибиторов протеаз (Sigma, США) и фосфатаз PhosStop (Roche, Швейцария). Концентрацию белка в супернатанте рассчитывали с помощью набора для колориметрического определения белка с использованием бицинхониновой кислоты (BCA) (Servicebio, Китай). К супернатанту добавляли двукратный буфер для нанесения проб (SDS 10%-ный 0.35 M, 0.5 M Tris HCl pH, 6.8, 20% глицерола, 2% β -меркаптоэтанола, бромфеноловый синий), после чего пробы инкубировали при температуре 99 °C в течение 8 мин для демаскирования антигена. Количество белка, вносимого в лунку, составляло 25 мкг. Каждый гель содержал пробы, полученные и от контрольных, и от экспериментальных животных. Электрофоретическое разделение белков производили в 11%-ном полиакриламидном геле в камере Mini-Protean (Bio-Rad, США). Затем белки из геля переносили на PVDF-мембрану с размером пор 0.22 мкм (Bio-Rad, США). Для блокирования неспецифического связывания антител мембрану инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре в 5%-ном растворе обезжиренного сухого молока

на PBS с добавлением 0.1% Tween-20. В исследовании были использованы первичные поликлональные антитела кролика к AQP4 (1 : 1500, Affinity Biosciences, Китай), моноклональные антитела мыши к общему водорастворимому α -синуклеину (1 : 900, Santa-Cruz Biotechnologies, США), поликлональные антитела кролика к α -синуклеину, фосфорилированному в положении Ser129 (1 : 700; Elk, Китай) и контролям нагрузки GAPDH (1 : 3000; Affinity, Китай) или β -тубулину (Invitrogen, 1 : 1000). Инкубацию с первичными антителами проводили в течение ночи при 4 °C с постоянным аккуратным перемешиванием на орбитальном шейкере. На следующий день проводили инкубацию со вторичными антителами козы к кролику и мыши, конъюгированными с пероксидазой хрена (1 : 10000; AbClonal, Китай), в течение 1 ч при комнатной температуре. Для выявления пероксидазной реакции применяли набор ECL Clarity (Bio-Rad, США) и систему гель-документирования ChemiDoc TM (Bio-Rad). Денситометрический анализ полученных изображений осуществлялся с помощью программы ImageJ/Fiji (NIH, США). Оптическая плотность (сигнал) бэндов AQP4, общего α -синуклеина и α -синуклеина, фосфорилированного в положении Ser129, был нормирован по сигналу контроля нагрузки (GAPDH или β -тубулина). Сигнал белка интереса контрольной группы принимали за 100% и сопоставляли с ними сигналы остальных экспериментальных групп.

Метод ловушки на фильтре использовали для оценки количества агрегатов α -синуклеина в ткани кЧЧС. К лизатам ткани головного мозга крыс, содержавших кЧЧС, добавляли 2%-ный раствор SDS и затем пробы инкубировали при 98 °C в течение 5 мин. После этого образцы, содержавшие 200 мкг белка, загружали в лунки камеры для дот-блоттинга Bio-Dot (BioRad). На дно камеры помещали ацетат-целлюлозную мембрану с диаметром пор 0.22 мкм и соединяли с вакуумным насосом. Под действием насоса растворенные белки проходили сквозь мембрану, а нерастворимые белковые агрегаты оставались на ней. Затем мембрану промывали буферным раствором (10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 150 mM NaCl, 0.1% SDS) и инкубировали в блокирующем растворе (PBS с 0.1% Tween-20 и 5% обезжиренного сухого молока) при комнатной температуре в течение 1 ч. После этого мембрану инкубировали с первичными поликлональными антителами мыши к общему водорастворимому α -синуклеину (1 : 900; Santa-Cruz Biotechnologies, США) в течение ночи при 4 °C с аккуратным перемешиванием на орбитальном шейкере. Далее мембрану помещали в раствор, содержащий вторичные антитела козы к мыши, конъюгированные с пероксидазой хрена (1 : 10000; AbClonal, Китай), на 1 ч при комнатной температуре. Визуализацию проводили с применением набора ECL Clarity (Bio-Rad) и системы гель-документирования ChemiDoc TM (Bio-Rad). Анализ изображения также проводился с помощью программы ImageJ/Fiji (NIH, США). Оптическая плотность белка α -синуклеина в экспериментальных группах сопоставлялась с оптической плотностью в контрольной группе.

Иммуногистохимическое исследование

После извлечения головной мозг фиксировали в 10%-ном растворе формалина ("Бiovитрум", Россия) при температуре 4 °C в течение 3 дней, после чего промывали в PBS (pH 7.4) и помещали в 22%-ный раствор сахарозы для криопротекции на 7–10 дней при температуре 4 °C. После этого мозг замораживали в изопентане, охлажденном с помощью сухого льда до –45 °C, и далее хранили в морозильной камере при температуре –80 °C. Изготовление чередующихся серий фронтальных срезов головного мозга крыс толщиной 10 мкм осуществлялось на криостате Leica (Германия). Для того чтобы визуализировать и провести подсчет выживших ДА-ергических нейронов в кЧЧС и их аксонов в стриатуме, а также оценить изменение содержания в нейронах кЧЧС скорость-лимитирующего фермента синтеза ДА тирозингидроксилазы (ТГ), использовали биотин-стрептавидиновый метод. После выполнения стандартных подготовительных этапов срезы

кЧЧС и стриатума инкубировали с первичными поликлональными антителами кролика против ТГ (Abscam, Великобритания (1 : 700)) и оставляли на сутки при комнатной температуре во влажной камере. Затем на срезы наносили раствор вторичных антител козы против кролика, конъюгированных с биотином (Vector Laboratories, США (1 : 400)) и инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре. Далее аналогичным образом проводили инкубацию со стрептавидин-пероксидазой (Vector Laboratories, (1 : 400)). Визуализацию окрашивания осуществляли с использованием раствора 3,3'-диаминобензидина (Acros Organics, Бельгия). После стандартной проводки в спиртах восходящей концентрации препараты помещали в среду Microclearing (Diapath, Италия) и затем заключали под покровное стекло с помощью среды Витрогель (“Биовитрум”). Микрофотографии препаратов получали с помощью микроскопа Zeiss Axio Imager A1 (“Carl Zeiss”, Германия) со встроенной камерой и программным обеспечением ZEN Blue (“Carl Zeiss”). Для количественного анализа ТГ-иммунопозитивных нейронов в кЧЧС использовалось увеличение $\times 10$, для анализа изменений оптической плотности ТГ в нейронах кЧЧС применяли увеличение $\times 20$. Анализ этих показателей проводили вручную с использованием программы PhotoM 1.21 (http://www.t_lambda.chat.ru/) на 7–8 срезах от каждого животного на одном и том же уровне изучаемых структур с интервалом 50 мкм. Анализ количества ТГ-иммунопозитивных аксонов на 8–10 срезах дорсального стриатума проводили с использованием программы ImageJ 1.8 (НИН, США), позволяющей автоматически (под контролем экспериментатора) выделять аксоны, содержащие ТГ, и подсчитать их количество и площадь на микрофотографии.

Статистический анализ результатов

Анализ полученных результатов проводили в программе GraphPad Prism 8. Нормальность распределения проверяли с помощью критерия Шапиро–Уилка. Статистическую обработку результатов теста “Открытое поле” проводили с помощью теста Краскела–Уоллиса, анализ других данных осуществляли с помощью однофакторного дисперсионного анализа (one-way ANOVA) с использованием критерия Фишера и апостериорным тестом Тьюки. Различия результатов между группами считали достоверными при уровне значимости $p < 0.05$, результаты представлены в виде среднего и стандартной ошибки среднего ($mean \pm SEM$) для данных, имеющих нормальное распределение, и медианы с интерквартильным интервалом Q1–Q3 для данных с ненормальным распределением.

РУЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Проведенный анализ иммуноблотов ткани кЧЧС показал, что применение конструкции AQP4-LVC привело к снижению содержания AQP4 на 42% по сравнению с группой, которой вводили PBS ($p < 0.001$), и на 45% по сравнению с группой, получавшей con-LVC через 4 недели после микроинъекции ($p < 0.001$) (рис. 1a, b). Дополнительные эксперименты с введением маркерной конструкции conGFP-LVC показали, что через 4 недели с момента микроинъекции в кЧЧС обнаруживается зеленый флуоресцентный сигнал. На основании этих результатов данная временная точка была использована для моделирования БП в следующих сериях экспериментов. Чтобы выяснить, оказывает ли введение лентивирусных конструкций нейротоксический эффект, была проведена сравнительная оценка количества нейронов в кЧЧС у крыс, получавших PBS, con-LVC и AQP4-LVC через 4 недели после введения препаратов. Установлено, что количество ТГ-иммунопозитивных нейронов в исследуемых группах не отличалось (рис. 1c, d). Эти данные свидетельствовали о том, что применение con-LVC и AQP4-LVC не приводило к развитию нейродегенеративного процесса в кЧЧС. В связи с этим далее группа con-LVC была использована в качестве контроля к основным экспериментальным сериям.

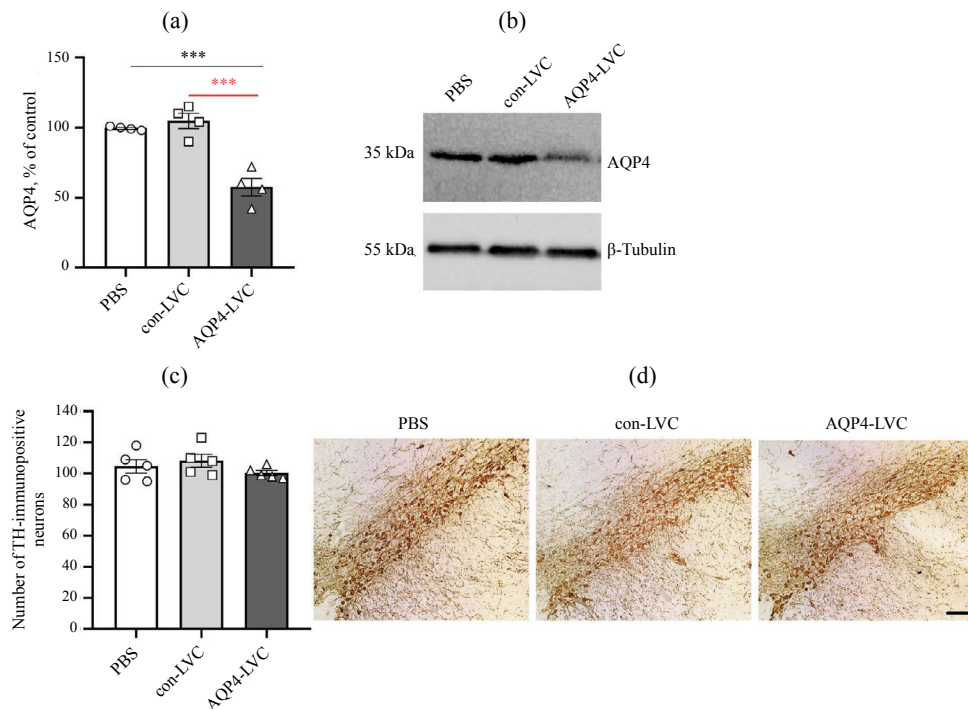


Рис. 1. Оценка содержания AQP4 и количества DA-ергических нейронов в ткани компактной части черной субстанции через 4 недели после введения PBS, контрольной лентивирусной конструкции (con-LVC) и лентивирусной конструкции, несущей шпилечную РНК AQP4 (AQP4-LVC). (a) – Изменение содержания AQP4 в ткани кЧС через 4 недели после введения PBS, con-LVC и AQP4-LVC; (b) – репрезентативный иммуноблот; (c) – число тирозингидроксилаза (ТГ)-иммунопозитивных нейронов в кЧС у крыс после введения PBS, con-LVC и AQP4-LVC; (d) – репрезентативные микрофотографии препаратов кЧС – световая микроскопия, маркер – тирозингидроксилаза, масштаб 200 мкм. *** – $p < 0.001$ – достоверность различий между группами (one-way ANOVA, post-hoc Тьюки).

Установлено, что через 7 недель подавление экспрессии AQP4 с помощью AQP4-LVC в кЧС у крыс, которым не вводили LC, не вызвало моторных нарушений по сравнению с действием con-LVC (рис. 2a–d, рис. 3a–c). Патоморфологический анализ не выявил значимого изменения числа нейронов в кЧС и их аксонов в стриатуме (рис. 4a–d), а также содержания ТГ в нейронах кЧС по сравнению с действием LVC-con (рис. 5a, b). Это свидетельствовало о том, что сам по себе нокдаун AQP4 не вызывал нейродегенеративных изменений в nigrostriatalной системе. Кроме того, не было выявлено признаков развития α -синуклеиновой патологии (увеличения содержания общей водорастворимой формы белка α -синуклеина, фосфорилированной по Ser129 формы и количества агрегатов в ткани черной субстанции) (рис. 6a–f).

Далее у отдельной группы крыс была индуцирована LC-модель клинической стадии БП. При анализе показателей моторного поведения не было выявлено значимых изменений общей двигательной активности в тесте “Открытое поле” по сравнению с контрольными крысами con-LVC (рис. 2a–d). Однако нами было обнаружено нарушение тонкой моторики рта, языка и передних конечностей, о котором свидетельствовало значительное увеличение времени, затрачиваемого крысой на вскрытие и поедание семечка, и появление признаков сенсомоторного дефицита, проявлявшегося увеличением числа ошибочных постановок и соскальзываний лапок животного в тесте “Сужающаяся дорожка” (рис. 3a–c). Особенностью данной модели БП также

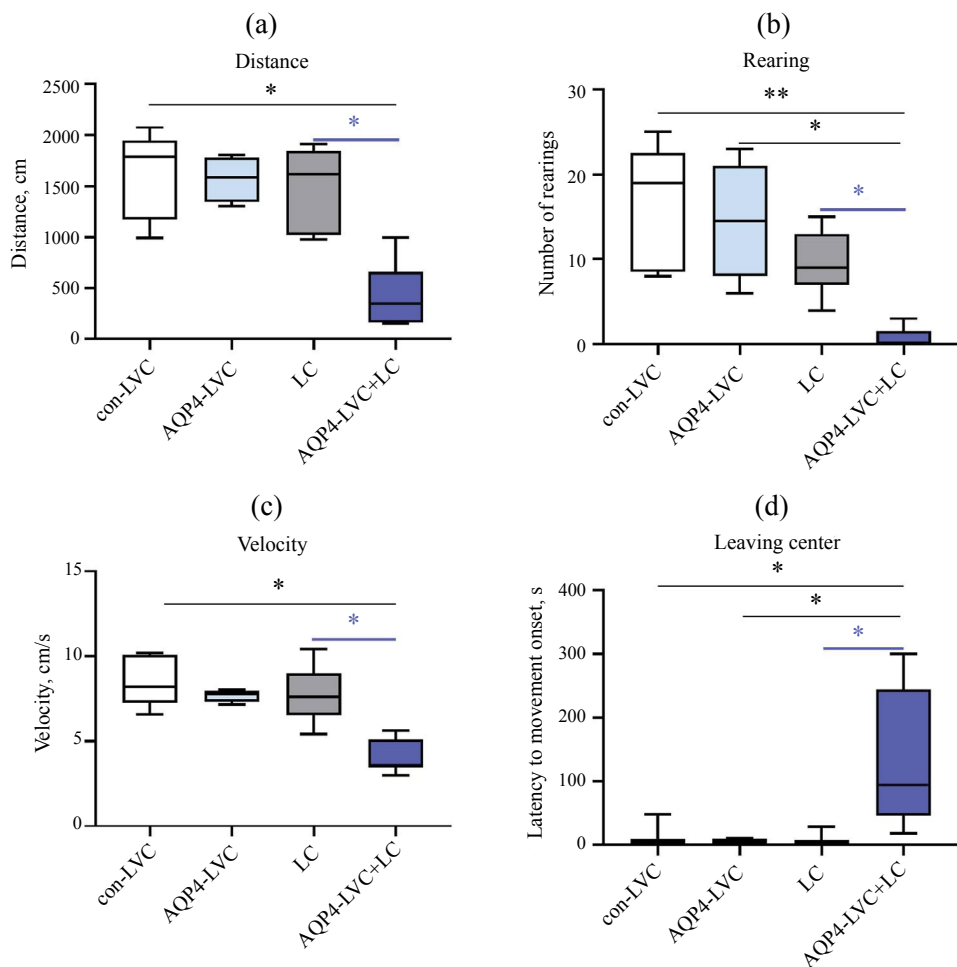


Рис. 2. Влияние нокдауна AQP4 на изменения показателей двигательной активности в тесте “Открытое поле” в модели БП у крыс. (a) – Общая пройденная дистанция; (b) – число вертикальных стоек; (c) – средняя скорость передвижения; (d) – латентный период начала движения. * – $p < 0.05$, ** – $p < 0.01$ – достоверность различий между группами (тест Краскела–Уоллиса).

явилась потеря массы тела на 16% по сравнению с контрольными животными con-LVC (с 419 ± 10 до 350 ± 11 , $p < 0.05$) к концу эксперимента. Введение LC приводило к развитию нейродегенеративного процесса в нигростриатной системе, проявлявшегося гибелью 57% DA-ергических нейронов в кЧС и 56% их аксонов в стриатуме (рис. 4a–d), а также снижением содержания ТГ в нейронах кЧС в 1.7 раза по сравнению с контролем (con-LVC) ($p < 0.001$) (рис. 5a, b). Действие LC сопровождалось развитием α -синуклеиновой патологии, проявлявшейся увеличением содержания в ткани черной субстанции общей водорастворимой формы α -синуклеина и его агрегированных и фосфорилированных по Ser129 форм (рис. 6a–f).

Установлено, что применение нокдауна AQP4 в модели клинической стадии БП приводило к значительному усугублению моторных нарушений по сравнению с группой LC. В тесте “Открытое поле” были выявлены изменения общей двигательной активности – уменьшение скорости движения и сокращение пройденной дистанции,

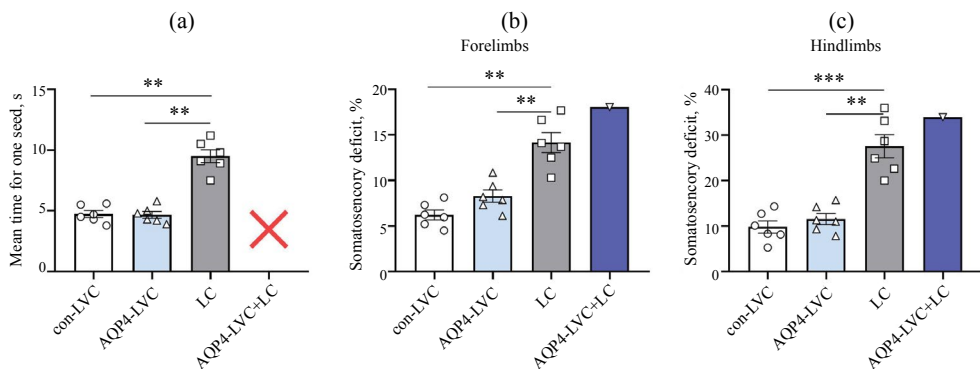


Рис. 3. Влияние нокдауна AQP4 на скорость поедания семян подсолнечника и выраженность сенсомоторного дефицита в модели БП у крыс. (a) – Среднее время, затрачиваемое мышью на вскрытие и поедания семени подсолнечника, секунды; (b) – выраженность сенсомоторного дефицита передних конечностей, %; (c) – выраженность сенсомоторного дефицита задних конечностей, %. ** – $p < 0.01$, *** – $p < 0.001$ – достоверность различий между группами (one-way ANOVA, post-hoc Тьюки).

отсутствие вертикальных стоек (с опорой и без опоры) и увеличение латентного периода начала движения по сравнению с контрольными животными con-LVC и модельными животными LC (рис. 2a–c). Кроме того, крысы в этой группе не могли поедать семечки подсолнечника из-за неспособности удерживать их и вскрывать кожуру (рис. 3a). Тест “Сужающаяся дорожка” показал, что крысы с нокдауном AQP4 в LC-модели не смогли пройти по брусу из-за выраженной дисфункции задних конечностей. Исключение составило только одно животное из этой группы, чей уровень сенсомоторного дефицита был близок к значениям этого показателя у крыс с БП (рис. 3b, c). Кроме того, у животных этой группы отмечалось стремительное ухудшение общего состояния организма, проявлявшееся еще более значительной потерей массы тела, составившей 32% ($p < 0.05$) по сравнению с контрольными животными con-LVC. Выявлено, что нокдаун AQP4 приводил к усилению LC-индуцируемой нейродегенерации в нигростриатной системе, вызывая гибель 78% DA-ергических нейронов в кЧЧС (рис. 4a, b) и 76% их аксонов в дорсальном стриатуме (рис. 4c, d). Кроме того, нами было отмечено еще более значительное снижение содержания ТГ в нейронах кЧЧС – по сравнению с действием самого LC этот показатель был снижен в 1.5 раза ($p < 0.01$) (рис. 5a, b). Установлено, что при нокдауне AQP4 в модели клинической стадии БП не происходило дополнительного роста содержания общей и фосфорилированной по Ser129 форм α -синуклеина в кЧЧС по сравнению с модельными животными LC, однако количество агрегатов α -синуклеина возрастало в 1.3 раза по сравнению с действием LC (рис. 6a–f).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Для решения поставленной задачи была воспроизведена модель клинической стадии БП у крыс, основанная на угнетении функционирования УПС головного мозга. При создании этой модели мы применяли локальные микроинъекции ингибитора протеасом LC в кЧЧС, которая патогенетически значима для БП. В основу созданной модели положено современное представление, что ослабление активности УПС является одним из ключевых молекулярных механизмов патогенеза БП [29, 30, 35]. Используемая LC-модель позволяет воссоздать основные патоморфологические и молекулярные нарушения в нигростриатной системе, характерные для БП [35, 36]: потеря

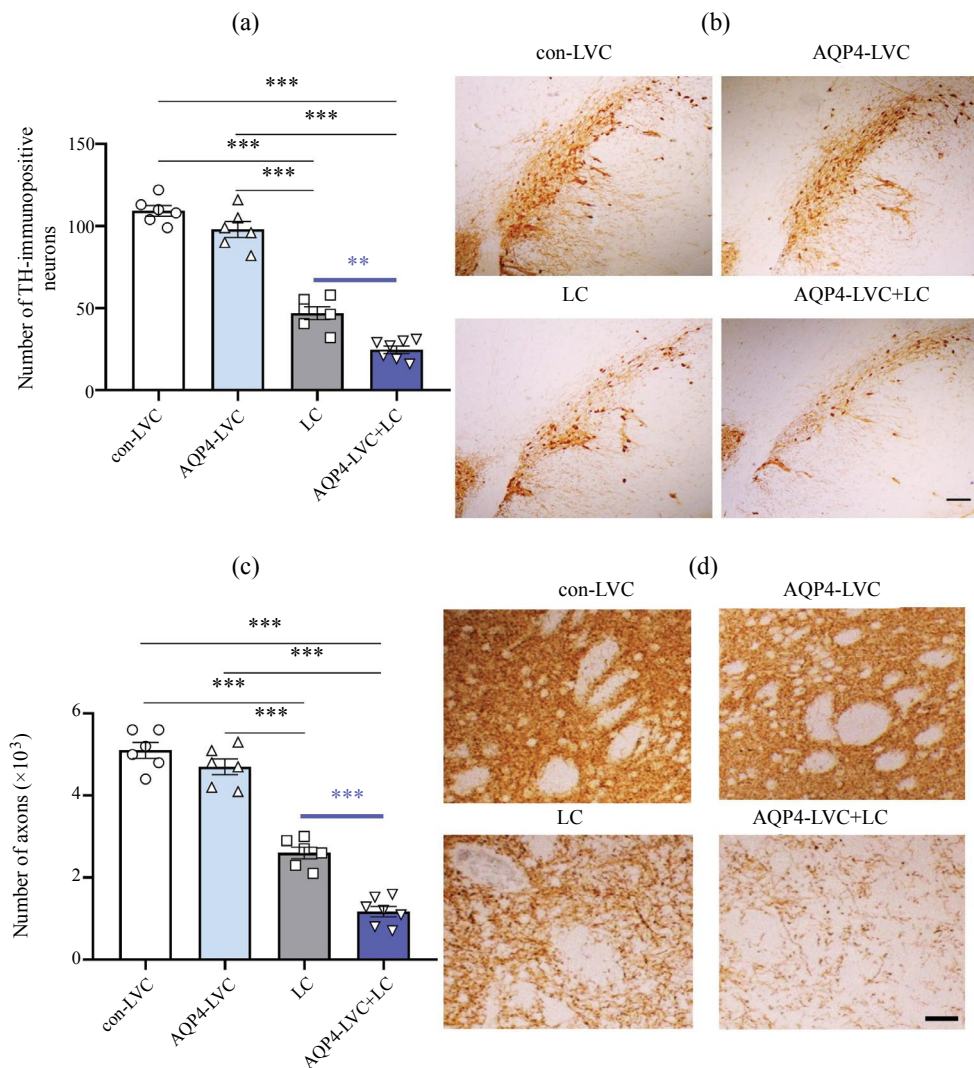


Рис. 4. Влияние нокдауна AQP4 на количество ДА-ергических нейронов в кЧС и их аксонов в дорсальном стриатуме в модели БП у крыс. (a) – Число тирозингидроксилаза (ТГ)-иммунопозитивных нейронов в кЧС и (b) – репрезентативные фотографии – световая микроскопия, масштаб 200 мкм; (c) – количество ТГ-иммунопозитивных терминалей в дорсальном стриатуме и (d) – репрезентативные фотографии (световая микроскопия, масштаб 50 мкм). ** – $p < 0.01$, *** – $p < 0.001$ – достоверность различий между группами (one-way ANOVA, post-hoc Тьюки).

ДА-ергических нейронов в кЧС и их аксонов в стриатуме в пределах 56–57%, ослабление компенсаторных процессов, направленных на поддержание уровня дофамина в нигростриатной системе, образование и накопление в кЧС патологических форм α -синуклеина (агрегаты α -синуклеина и модифицированная (фосфорилированная по Ser129) форма α -синуклеина). Кроме того, для модели клинической стадии БП были характерны моторные нарушения, которые проявлялись сенсомоторным дефицитом и нарушением тонкой моторики рта, языка и передних конечностей, что соответствует клинической стадии БП.

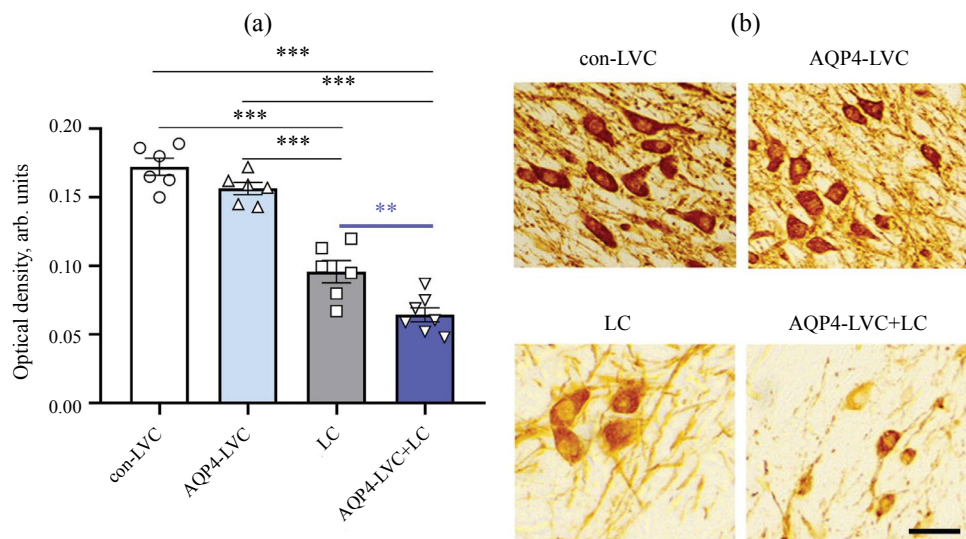


Рис. 5. Влияние нокдауна AQP4 на изменение содержания тирозингидроксилазы в нейронах кЧС в модели БП у крыс. (а) – Оптическая плотность тирозингидроксилазы в нейронах кЧС и (б) – репрезентативные фотографии (световая микроскопия, масштаб 50 мкм). ** – $p < 0.01$, *** – $p < 0.001$ – достоверность различий между группами (one-way ANOVA, post-hoc Тьюки).

Предыдущие исследования показали, что экспрессия мРНК AQP4 снижена в образцах крови пациентов с БП по сравнению с образцами здоровых людей [37]. Установлено, что увеличение риска развития БП и когнитивных нарушений может быть связано с наличием определенных вариантов однонуклеотидного полиморфизма гена *Aqp4* [18, 19]. Также была выявлена отрицательная корреляция между уровнями α -синуклеина и AQP4 в неокортексе пациентов с БП [17]. Эти данные дают основание предполагать, что существует связь между экспрессией AQP4 и БП. Чтобы понять, вовлечен ли AQP4 в патогенез БП, мы снизили его экспрессию в кЧС с помощью специфической shRNA в модели клинической стадии БП у крыс. Обнаружено, что нокдаун AQP4 вызывает усиление моторных нарушений и появление признаков гипокинезии (замедленность движений) и дистрофии (снижение аппетита, значимая потеря массы тела), свидетельствующих о развитии терминальной фазы клинической стадии БП. Быстрое нарастание симптомов паркинсонизма у модельных животных с нокдауном AQP4 было связано с накоплением в кЧС патологических агрегированных форм α -синуклеина, приводящих к усилению нейродегенерации и истощению компенсаторных процессов в nigrostriatalной системе, на что указывает увеличение числа погибших DA-ергических нейронов и низкая экспрессия ТГ в кЧС. Полученные данные свидетельствуют о том, что дефицит AQP4 в кЧС ускоряет развитие Паркинсон-подобной патологии.

Результаты нашего исследования согласуются с предыдущими исследованиями, показывающими усиление α -синуклеиновой патологии, нейродегенерации и признаков паркинсонизма у мышей, нокаутированных по AQP4 в моделях α -синуклеиновой патологии и МРТР, а также с экспериментами с применением ингибитора водного канала AQP4 в LC-модели у крыс [22, 23, 26–28, 38]. Существует несколько возможных механизмов, с помощью которых дефицит AQP4 может ускорить накопление патологических форм α -синуклеина, вызвать функциональные нарушения и в конечном итоге гибель DA-ергических нейронов. Недавно было показано, что у мышей, нокаутированных по AQP4, а также при фармакологическом ингибировании AQP4 и нарушении его

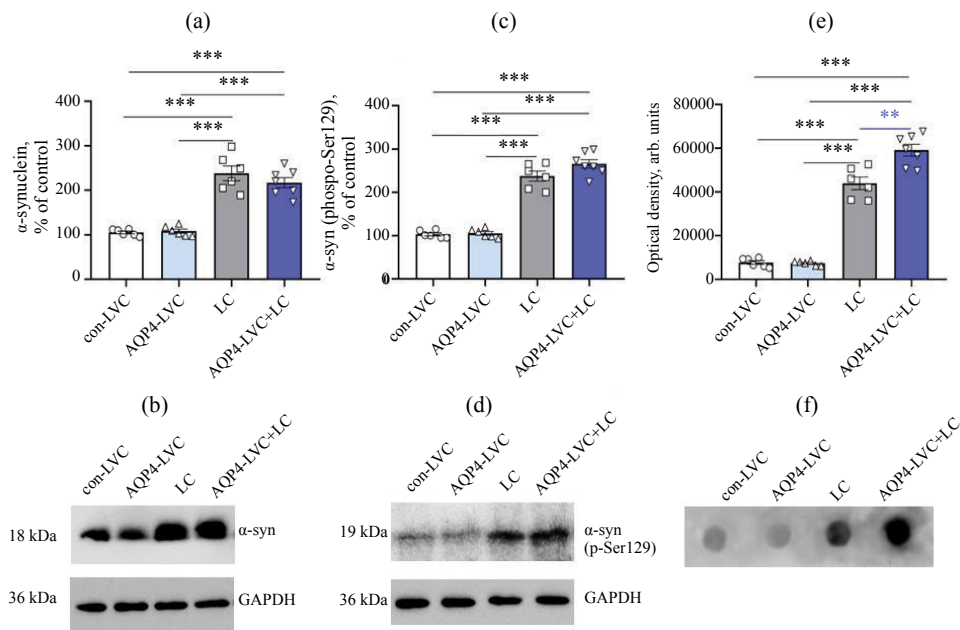


Рис. 6. Влияние нокдауна AQP4 на содержание общей и фосфорилированной Ser129 форм α -синуклеина и на количество его агрегатов в черной субстанции в модели БП у крыс. (a) – α -Синуклеин (общая форма) и (b) – репрезентативный иммуноблот; (c) – α -синуклеин (фосфорилированная форма) и (d) – репрезентативный иммуноблот; (e) – α -синуклеин (количество агрегатов) и (f) – репрезентативный иммуноблот. ** – $p < 0.01$, *** – $p < 0.001$ – достоверность различий между группами (one-way ANOVA, post-hoc Тьюки).

поляризации наблюдается замедление элиминации α -синуклеина с флуоресцентной меткой [22, 26, 38]. Авторы работ предполагают, что этот эффект может быть связан с ухудшением лимфатического клиренса. Эти данные согласуются с нашими результатами о накоплении агрегированного α -синуклеина в ткани кЧС. Кроме того, дефицит AQP4 может отрицательно повлиять на способность астроцитов разрушать фибриллы α -синуклеина [39], что, в свою очередь, усиливает высвобождение провоспалительных медиаторов астроцитами [23, 40, 41]. В конечном итоге это приводит к прогрессирующей потере нейронов. Дисфункция многочисленных AQP4-зависимых клеточных механизмов (нарушение водного и ионного обмена между ликвором и тканью мозга, нарушение метаболизма глутамата), участвующих в устранении различных метаболитов в паренхиме мозга, также может вносить вклад в патогенез БП [11, 25]. Эти возможные альтернативные механизмы необходимо дополнительно изучить, чтобы лучше понять связь между AQP4 и прогрессированием Паркинсон-подобной патологии.

Таким образом, результаты нашего исследования продемонстрировали, что снижение экспрессии белка водного канала AQP4 в кЧС в LC-модели клинической стадии БП приводит к быстрому нарастанию симптомов паркинсонизма из-за усиления нейродегенерации и истощения компенсаторных процессов в ДА-ергической nigrostriатной системе, связанных с ускорением образования патологических агрегированных форм α -синуклеина. Наше исследование предоставляет фундаментальную основу для возможной связи между экспрессией AQP4 и патогенезом БП. Водный канал AQP4 может быть перспективной мишенью для разработки нейропротективных подходов, направленных на усиление элиминации токсичных форм α -синуклеина и других aberrантных белков в головном мозге при развитии Паркинсон-подобной патологии.

ВКЛАД АВТОРОВ

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

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование проводилось при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации (государственное задание № 075-00263-25-00) и частично гранта Российского научного фонда (№ 22-25-00607).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Эксперименты на животных проводились в соответствии с принципами Базельской декларации и были одобрены Этическим комитетом Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова Российской академии наук (протокол № 1-12/2023 г. заседания № 1 Комиссии по биоэтике Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН от 26.01.2023 г.).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы декларируют отсутствие конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Gouda NA, Elkamhawy A, Cho J (2022) Emerging Therapeutic Strategies for Parkinson's Disease and Future Prospects: A 2021 Update. *Biomedicines* 10(2): 371. <https://doi.org/10.3390/biomedicines10020371>
2. 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>
3. 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>
4. McFarthing K, Buff S, Rafaloff G, Pitzer K, Fiske B, Navangul A, Beissert K, Pilcicka A, Fuest R, Wyse RK, Stott SRW (2024) Parkinson's Disease Drug Therapies in the Clinical Trial Pipeline: 2024 Update. *J Parkinsons Dis* 14(5): 899–912. <https://doi.org/10.3233/JPD-240272>
5. Paulėkas E, Vanagas T, Lagunavičius S, Pajėdienė E, Petrikonis K, Rastenytė D (2024). Navigating the Neurobiology of Parkinson's: The Impact and Potential of α -Synuclein. *Biomedicines* 12(9): 2121. <https://doi.org/10.3390/biomedicines12092121>
6. Hamazaki J, Murata S (2024) Relationships between protein degradation, cellular senescence, and organismal aging. *J Biochem* 175(5): 473–480. <https://doi.org/10.1093/jb/mvae016>
7. Mader S, Brimberg L (2019) Aquaporin-4 Water Channel in the Brain and Its Implication for Health and Disease. *Cells* 8(2): 90. <https://doi.org/10.3390/cells8020090>
8. Iliff 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>
9. Lian X, Liu Z, Gan Z, Yan Q, Tong L, Qiu L, Chen JF, Li Z (2026 Epub 2025 Jan 13) Targeting the glymphatic system to promote α -synuclein clearance: A novel therapeutic strategy for Parkinson's disease. *Neural Regen Res* 21(1): 233–247. <https://doi.org/10.4103/NRR.NRR-D-24-00764>

10. *Semyachkina-Glushkovskaya O, Postnov D, Kurths J* (2018) Blood Brain Barrier, Lymphatic Clearance, and Recovery: Ariadne's Thread in Labyrinths of Hypotheses. *Int J Mol Sci* 19(12): 3818.
<https://doi.org/10.3390/ijms19123818>
11. *Nagelhus EA, Ottersen OP* (2013) Physiological roles of aquaporin-4 in brain. *Physiol Rev* 93(4): 1543–1562.
<https://doi.org/10.1152/physrev.00011.2013>
12. *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>
13. *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 Physiol* 59: 1–19.
<https://doi.org/10.1134/S0022093023010015>
14. *Zhang Q, Niu Y, Li Y, Xia C, Chen Z, Chen Y, Feng H* (2025) Meningeal lymphatic drainage: Novel insights into central nervous system disease *Signal Transduct Target Ther* 10(1): 142.
<https://doi.org/10.1038/s41392-025-02177-z>
15. *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>
16. *Miao A, Luo T, Hsieh B, Edge CJ, Gridley M, Wong RTC, Constandinou TG, Wisden W, Franks NP* (2024) Brain clearance is reduced during sleep and anesthesia. *Nat Neurosci* 27(6): 1046–1050. Erratum in: (2024) *Nat Neurosci* 27(7): 1425.
<https://doi.org/10.1038/s41593-024-01638-y>
17. *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>
18. *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>
19. *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. *Neurosci Lett* 797: 137062.
<https://doi.org/10.1016/j.neulet.2023.137062>
20. *Meinhold L, Gennari AG, Baumann-Vogel H, Werth E, Schreiner SJ, Ineichen C, Baumann CR, O'Gorman Tuura R* (2025) T2 MRI visible perivascular spaces in Parkinson's disease: Clinical significance and association with polysomnography measured sleep. *Sleep* 48(1): zsae233.
<https://doi.org/10.1093/sleep/zsae233>
21. *Xing Y, Lin M, Li J, Huang X, Yan L, Ren J, Zhou H, Chen S, Cao Y, Huang P, Liu W* (2025) Perivascular space fluid diffusivity predicts clinical deterioration in prodromal and early-stage Parkinson's disease. *NPJ Parkinsons Dis* 11(1): 169.
<https://doi.org/10.1038/s41531-025-01036-6>
22. *Cui H, Wang W, Zheng X, Xia D, Liu H, Qin C, Tian H, Teng J* (2021) Decreased AQP4 expression aggravates α -synuclein pathology in Parkinson's disease mice, possibly via impaired glymphatic clearance. *J Mol Neurosci* 71: 2500–2513.
<https://doi.org/10.1007/s12031-021-01836-4>
23. *Xue X, Zhang W, Zhu J, Chen X, Zhou S, Xu Z, Hu G, Su C* (2019) Aquaporin-4 deficiency reduces TGF- β 1 in mouse midbrains and exacerbates pathology in experimental Parkinson's disease. *J Cell Mol Med* 23: 2568–2582.
<https://doi.org/10.1111/jcmm.14147>
24. *Prydz A, Stahl K, Zahl S, Skauli N, Skare Ø, Ottersen OP, Amiry-Moghaddam M* (2020) Pro-Inflammatory Role of AQP4 in Mice Subjected to Intrastriatal Injections of the Parkinsonogenic Toxin MPP. *Cells* 9(11): 2418.
<https://doi.org/10.3390/cells9112418>
25. *Lapshina KV, Ekimova IV* (2024) Aquaporin-4 and Parkinson's Disease. *Int J Mol Sci* 25(3): 1672.
<https://doi.org/10.3390/ijms25031672>

26. 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>
27. 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 Parkinson's disease. *J Evol Biochem Physiol* 58: 2035–2047.
<https://doi.org/10.1134/S0022093022060308>
28. Lapshina KV, Khanina MV, Kaismanova MP, Ekimova IV (2023) Pharmacological Inhibition of AQP4 Water Channel Activity Aggravates of Alpha-Synuclein Pathology in the Substantia Nigra in a Rat Model of Parkinson's Disease. *J Evol Biochem Physiol* 59: 2168–2178.
<https://doi.org/10.1134/S0022093023060212>
29. McNaught KS, Perl DP, Brownell AL, Olanow CW (2004) Systemic exposure to proteasome inhibitors causes a progressive model of Parkinson's disease. *Ann Neurol* 56(1): 149–162.
<https://doi.org/10.1002/ana.20186>
30. 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 candidates for intranigral and extranigral neuroprotection. In: *Handbook of Animal Models in Neurological Disorders*. Martin CR, Patel VB, Preedy VR (eds) Acad Press, Elsevier, pp 507–523.
31. Paxinos G, Watson C (2007) *The rat brain in stereotaxic coordinates*. 6th Edition. Acad. Press, San Diego.
32. Kane JR, Ciucci MR, Jacobs AN, Tews N, Russell JA, Ahrens AM, Ma ST, Britt JM, Cormack LK, Schallert T (2011) Assessing the role of dopamine in limb and cranial-oculomotor control in a rat model of Parkinson's disease. *J Communicat Disord* 44(5): 529–537.
<https://doi.org/10.1016/j.jcomdis.2011.04.005>
33. Seibenhener ML, Wooten MC (2015) Use of the Open Field Maze to measure locomotor and anxiety-like behavior in mice. *J Vis Exp* 96: e52434.
<https://doi.org/10.3791/52434>
34. Fleming SM, Ekhtor OR, Ghisays V (2013) Assessment of sensorimotor function in mouse models of Parkinson's disease. *J Vis Exp* 76: 50303.
<https://doi.org/10.3791/50303>
35. Ciechanover A, Kwon YT (2015) Degradation of misfolded proteins in neurodegenerative diseases: Therapeutic targets and strategies. *Exp Mol Med* 47(3): e147.
<https://doi.org/10.1038/emm.2014.117>
36. Riederer P, Wuketich S (1976) Time course of nigrostriatal degeneration in Parkinson's disease. *J Neural Transm* 38: 277–301.
37. Thenral ST, Vanisree AJ (2012) Peripheral assessment of the genes AQP4, PBP and TH in patients with Parkinson's disease. *Neurochem Res* 37: 512–515.
<https://doi.org/10.1007/s11064-011-0637-5>
38. Si X, Dai S, Fang Y, Tang J, Wang Z, Li Y, Song Z, Chen Y, Liu Y, Zhao G, Zhang B, Pu J (2024) Matrix metalloproteinase-9 inhibition prevents aquaporin-4 depolarization-mediated glymphatic dysfunction in Parkinson's disease. *J Adv Res* 56: 125–136.
<https://doi.org/10.1016/j.jare.2023.03.004>
39. Loria F, Vargas JY, Bousset L, Syan S, Salles A, Melki R, Zurzolo C (2017) α -Synuclein transfer between neurons and astrocytes indicates that astrocytes play a role in degradation rather than in spreading. *Acta Neuropathol* 134: 789–808.
<https://doi.org/10.1007/s00401-017-1746-2>
40. Brück D, Wennig GK, Stefanova N, Fellner L (2016) Glia and alpha-synuclein in neurodegeneration: A complex interaction. *Neurobiol Dis* 85: 262–274.
<https://doi.org/10.1016/j.nbd.2015.03.003>
41. Zhang J, Yang B, Sun H, Zhou Y, Liu M, Ding J, Fang F, Fan Y, Hu G (2016) Aquaporin-4 deficiency diminishes the differential degeneration of midbrain dopaminergic neurons in experimental Parkinson's disease. *Neurosci Lett* 614: 7–15.
<https://doi.org/10.1016/j.neulet.2015.12.057>

Aquaporin-4 Knockdown in the Substantia Nigra Exacerbates α -Synuclein Pathology, Neurodegeneration, and Motor Dysfunction in a Rat Model of Parkinson's Disease

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

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

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

The water channel aquaporin-4 (AQP4) is a key participant in the molecular and cellular mechanisms that provide the removal of various metabolites and amyloid proteins from brain tissue. It is assumed that AQP4 dysfunction can provoke the development of Parkinson's disease (PD) and lead to its aggravation. The aim of this study was to investigate whether decreased AQP4 expression in the substantia nigra pars compacta (SNpc) affects the development of α -synuclein pathology, neurodegeneration, and motor impairment in a rat model of clinical stage PD. Experiments were performed on male Wistar rats (6-7 months). To suppress AQP4 expression in the SNpc, a lentiviral construct containing a nucleotide sequence encoding hairpin RNA (shRNA) to AQP4 mRNA (AQP4-LVC) was injected. To reproduce the clinical stage of PD, the proteasome inhibitor lactacystin (LC) was bilaterally injected into the SNpc 4 weeks after AQP4-LVC administration. To solve the scientific task, behavioral tests, the immunohistochemical method, and immunoblotting were applied. The AQP4-LVC caused a 42% decrease in the AQP4 protein content in the SNpc 4 weeks later. The LC model of PD was characterized by the appearance of motor disorders, the death of 57% of dopamine (DA)-ergic neurons in the SNpc and 56% of their axons in the striatum, weakening of compensatory processes aimed at maintaining DA level in the nigrostriatal system, and an increase in the content of the total water-soluble form of α -synuclein and its aggregated and phosphorylated (Ser129) forms. Decreased expression of AQP4 in the LC model of PD caused aggravation of motor impairment and the appearance of signs of dystrophy, indicating the development of the terminal phase of the clinical stage of PD. The rapid increase in parkinsonism symptoms was associated with increased neurodegeneration and depletion of compensatory processes in the nigrostriatal system, associated with the acceleration of the formation of pathological aggregated forms of α -synuclein. The obtained data indicate that AQP4 deficiency in the SNpc accelerates the development of Parkinson-like pathology.

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