

© Коллектив авторов, 2017
УДК 577. 2 +616.8-092 +612.821

Грудень М.А.¹, Давыдова Т.В.², Кудрин В.С.³, Наркевич В.Б.³,
Ветрилэ Л.А.², Morozova-Roche L.M.A.⁴, Sewell R.D.E.⁵

Нейропротекторные эффекты антител к глутамату при нарушениях памяти, индуцированных олигомерами провоспалительного белка S100A9, у стареющих животных

¹ ФГБНУ «НИИ нормальной физиологии им. П.К.Анохина», Москва, Россия

² ФГБНУ «НИИ общей патологии и патофизиологии», Москва, Россия

³ ФГБНУ «НИИ фармакологии им. В.В. Закусова», Москва, Россия

⁴ Department of Medical Biochemistry and Biophysics, Umea University, Umea, SE-90187, Sweden

⁵ Cardiff School of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, Cardiff University, Cardiff, CF10 3NB, UK

Цель исследования — изучение эффектов хронического интраназального введения антител к глутамату совместно с полученными *in vitro* олигомерами провоспалительного белка S100A9 на процесс воспроизведения пространственной памяти, а также на содержание нейромедиаторных аминокислот и биогенных аминов в релевантных структурах мозга — гиппокампе и префронтальной коре у 12-месячных мышей C57Bl/6. **Методика.** В поведенческих экспериментах у всех животных проводили выработку условного рефлекса пассивного избегания и тестировали воспроизведение памятного следа, после этого в нейробиохимическом исследовании в гиппокампе и префронтальной коре методом ВЖХ проводили определение концентрации нейромедиаторных аминокислот и биогенных аминов. **Результаты.** Показано, что введение белка S100A9 олигомеров индивидуально приводило к нарушению воспроизведения памятного следа, а в сочетании с антителами к глутамату данного эффекта выявлено не было. Обнаружено значительное повышение концентрации глутамата в обеих церебральных структурах стареющих животных при действии S100A9 олигомеров и снижение содержания аминокислоты при совместном введении с антителами к глутамату до нормы. Показано существенное снижение содержания дофамина в гиппокампе и префронтальной коре в условиях влияния S100A9 олигомеров, а также повышение уровня его метаболитов в гиппокампе с нормализацией обмена дофамина в присутствии антител к глутамату. **Заключение.** Выявленные антиамнестические эффекты антител к глутамату и нормализация нейробиохимического профиля в условиях вызванной центральной токсичностью S100A9 олигомерами могут быть использованы в разработках подходов нейропротективной коррекции в том числе при болезни Альцгеймера.

Ключевые слова: обучение, память, амнезия, УРПИ, белок S100A9, олигомеры, антитела к глутамату, аминокислоты, моноамины, гиппокамп, префронтальная кора, нейропротекция.

Для цитирования: Грудень М.А., Давыдова Т.В., Кудрин В.С., Наркевич В.Б., Ветрилэ Л.А., Morozova-Roche L.M.A., Sewell R.D.E. Нейропротекторные эффекты антител к глутамату при нарушениях памяти, индуцированных олигомерами провоспалительного белка S100A9, у стареющих животных. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия* 2017; 61(4): 13—20. DOI

Для корреспонденции: Грудень Марина Алексеевна, вед. науч. сотр., канд. хим. наук, лаборатория функциональной нейробиологии ФГБНУ «НИИ нормальной физиологии им.П.К.Анохина» e-mail: mgruden@mail.ru

Конфликт интересов: Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование: Исследование не имело спонсорской поддержки.

Поступила 22.08.2017

Gruden M.A.*¹, Davydova T.V.², Kudrin V.S.³, Narkevich V.B.³, Morozova-Roche L.A.⁴, Sewell R.D.E.⁵

Neuroprotective effects of glutamate antibodies on memory impairment induced by proinflammatory S100A9 protein oligomers in aging animals

¹ Federal State Budgetary Scientific Institution «P.K. Anokhin Research Institute of Normal Physiology», Moscow, Russia

² Federal State Budgetary Scientific Institution «Research Institute of General Pathology and Pathophysiology», Moscow, Russia

³ Federal State Budgetary Scientific Institution «V.V. Zakusov Research Institute of Pharmacology, Moscow, Russia

⁴ Department of Medical Biochemistry and Biophysics, Umea University, Umea, SE-90187, Sweden

⁵ Cardiff School of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, Cardiff University, Cardiff, CF10 3NB, UK

The **aim** of this study was to investigate effects of chronic intranasal administration of glutamate antibodies with *in vitro*-generated proinflammatory S100A9 protein oligomers, on spatial memory of 12-month old C57Bl/6 mice. In addition,

the brain content of neurotransmitter amino acids and biogenic amines was monitored in memory-relevant brain structures (hippocampus and prefrontal cortex) of these animals. **Methods.** In behavioral experiments, all animals were conditioned in a passive avoidance reflex test and the memory trace was evaluated. In a simultaneous neurochemical study, HPLC-electrochemical detection analysis was performed to measure concentrations of neurotransmitter amino acids and biogenic amines in the hippocampus and prefrontal cortex. **Results.** Administration of S100A9 oligomers alone resulted in disruption of the memory trace retrieval whereas their combination with glutamate antibodies abolished this memory disorder. Significant increases in glutamate concentration were observed in both of the cerebral structures of ageing animals in response to S100A9 oligomers alone, and there was a reduction of the amino acid levels when coadministered with glutamate antibodies. S100A9 oligomers also evoked a decrease in hippocampal and prefrontal cortical dopamine and synchronously elevated dopamine metabolite concentrations, both of these actions being normalized by glutamate antibody coadministration. **Conclusion.** Disclosure of the anti-amnesic effects of glutamate antibodies, along with their neurochemical stabilizing activity to S100A9 oligomer neurotoxicity might be utilized in the development of neuroprotective approaches in Alzheimer's disease.

Keywords: training, memory, amnesia, passive avoidance reflex test, S100A9 protein, oligomers, antibodies to glutamate, amino acids, monoamines, hippocampus, prefrontal cortex, neuroprotection.

For citation: Gruden M.A., Davydova T.V., Kudrin V.S., Narkevich V.B., Morozova-Roche L.A., Sewell R.D.E. Neuroprotective effects of glutamate antibodies on memory impairment induced by proinflammatory S100A9 protein oligomers in aging animals. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*, 2017; 61(4): 13—20 (in Russian). DOI:

For correspondence: Gruden Marina Alekseevna, Leading Researcher, Cand. of Chemistry Sciences, Laboratory of Functional Neurochemistry, FSBSI «Research Institute of Normal Physiology named after PK Anokhin» e-mail: mgruden@mail.ru

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Funding. The study had no sponsorship.

Information about authors:

Davydova T.V., <http://orcid.org./0000-0002-3176-1035>

Received 22.08.2017

Введение

Нейродегенеративные заболевания, к которым относится болезнь Альцгеймера (БА) в настоящее время выходят на лидирующие позиции в общей структуре заболеваемости населения большинства развитых стран. К наиболее тяжелым последствиям нейродегенерации по альцгеймеровскому типу можно отнести прогрессирующее снижение когнитивных функций с развитием деменции, что ведет к инвалидизации и социальной дезадаптации пациентов с БА [1]. Механизм развития данной патологии до конца не ясен, и эффективной комплексной терапии, направленной на устранение или замедление развития нейродегенеративных процессов при БА на сегодняшний день нет. Среди основных причин запуска патологического нейродегенеративного процесса рассматривают конформационные нарушения функционально значимых белков нервной системы, приводящие к образованию токсических амилоидогенных олигомерных и фибриллярных структур, которые могут индуцировать программируемую гибель (апоптоз) нервных и глиальных клеток мозга [2]. При БА обнаружено нарушение процесса сворачивания $A\beta_{1-42}$ пептида, приводящее к образованию и последующему отложению в паренхиме головного мозга белковых агрегатов, которые вызывают апоптоз нейронов в церебральных

структурах принимающих непосредственное участие в процессах обучения и памяти [3, 4].

В последнее время особый интерес вызывает изучение роли воспаления при БА как инициаторной фазы нарушения сворачивания белков и последующей нейродегенерации [5]. Среди молекулярных факторов, участвующих в воспалительных реакциях пристальное внимание уделяется провоспалительному белку S100A9, который колокализуется с $A\beta_{1-42}$ пептидом в мозге и рассматривается в качестве биомаркера раннего когнитивного дефицита при БА [6]. Обнаружено повышение экспрессии гена белка S100A9 в клетках микроглии височной коры головного мозга, как при генетически опосредованных, так и спорадических случаях БА. Показано, что в определенных условиях *in vivo* и *in vitro* S100A9 может формировать токсические амилоидогенные олигомерные и фибриллярные структуры, вызывающие гибель клеток в мозге [6]. Интересно отметить, что на модели БА при введении половозрелым крысам Вистар в ядра Мейнерта нейротоксического фрагмента $A\beta_{25-35}$, вызывающего нарушение выработки условного рефлекса пассивного избегания (УРПИ), было продемонстрировано, что антитела к глутамату (АТ-ГЛУ) в дозе 250 мкг/кг обладают выраженными антиамнестическими свойствами [7]. В наших ис-

следованиях было обнаружено, что хроническое интраназальное введение S100A9 фибриллярных структур индуцировало нарушение выработки УРПИ у стареющих мышей C57Bl/6, при этом, введение S100A9 фибрилл совместно с очищенными моноспецифическими АТ-ГЛУ не приводило к нарушению памяти у животных, что может дополнительно свидетельствовать об антиамнестической направленности АТ-ГЛУ [8]. Научный и практический интерес представляет изучение нейрхимических механизмов протективного действия АТ-ГЛУ в условиях амнезии, вызванной белковыми агрегатами в целом, и в частности, олигомерными формами белка S100A9, обладающими более выраженной по сравнению с фибриллами S100A9 нейротоксичностью.

Цель исследования — изучение эффектов хронического интраназального введения антител к глутамату совместно с полученными *in vitro* олигомерами провоспалительного белка S100A9 на процесс воспроизведения пространственной памяти, а также на содержание нейромедиаторных аминокислот и биогенных аминов в релевантных структурах мозга — гиппокампе и префронтальной коре у 12-месячных мышей C57Bl/6.

Методика

Эксперименты выполнены на 36 самцах мышей линии C57Bl/6 массой $31,6 \pm 0,4$ г в возрасте 12 мес. Животные содержались в стандартных условиях вивария при 12-часовом световом режиме и свободном доступе к пище и воде. При работе с мышами соблюдались требования, сформулированные в Директивах Совета Европейского сообщества 86/609/ЕЕС об использовании животных для экспериментальных исследований.

Согласно разработанному протоколу было сформировано 3 группы животных, которым интраназально поочередно в каждую ноздрю в течение 14 суток вводили: 1-й гр. — физиологический раствор в объеме 4 мкл (контрольная группа); 2-й гр. — структуры белка S100A9 (0,48 мг/кг 4 мкл); 3-й гр. — одновременно в различные ноздри олигомерные структуры белка S100A9 (0,48 мг/кг, 4 мкл) и АТ-ГЛУ (250 мкг/кг, 4 мкл).

Для получения S100A9 олигомерных структур нативный белок S100A9 экспрессировали в *E. Coli* по протоколу, описанному ранее [8]. Концентрацию белка S100A9 в растворе определяли на ND-1000 спектрофотометре (Nano-drop, Sweden), используя коэффициент экстинкции $\epsilon_{280} = 0,53$ (мг/мл)⁻¹ см⁻¹. Протокол получения фракций олигомеров белка S100A9 состоял из нескольких этапов. На первом этапе для удаления из раствора S100A9 преагрегатов, нативный белок растворяли в 10 mM PBS буфере,

pH 7.4, подвергали последовательно обработке ультразвуком в течение 15 мин, затем центрифугированию при 14 000 об/мин на микроцентрифуге (Eppendorf Centrifuge 5417R), собирали супернатант из верхнего слоя раствора и фильтровали через 0.22 мкм фильтры (Millex, USA). Белковый раствор в конечной концентрации 2,0 мг/мл в 10 mM PBS буфере, pH 7.4 инкубировали при 37°C и непрерывном перемешивании при 600 об./мин на шейкере (Eppendorf Thermomixer Compact) в течение 2 ч. Образование S100A9 амилоидных олигомеров контролировали с помощью спектральных методов анализа по кинетике связывания тирофлавина Т (ThT) с амилоидными структурами на флуоресцентном спектрофотометре Jasco FP-6500 (Jasco, Japan) при длине волны 440 нм и анализировали пики при 450—550 нм с шагом в 3 нм. Кроме того, было использовано окрашивание красителем Конго красным и измерение оптической абсорбции амилоидных структур на спектрофотометре ND-1000 (NanoDrop Technologies, USA). Морфологию олигомерных структур определяли атомно-силовой микроскопией (АСМ), используя PICO PLUS микроскоп (Agilent, USA). Для проведения амилоидного межсекционного анализа использовали PICO PLUS software (Agilent, USA) [9].

Для получения препарата АТ-ГЛУ первоначально проводили иммунизацию 3 половозрелых самцов кроликов породы Шиншилла конъюгатом глутамата с белком носителем — бычьим сывороточным альбумином (БСА) по схеме, описанной [10]. Данный конъюгат был синтезирован с использованием бифункционального реагента — глутарового альдегида и очищен по ранее описанной методике [11].

После забора крови у животных на 7-е сут. после завершения иммунизации получали сыворотку крови из которой последовательно выделяли γ -глобулиновую фракцию, содержащую АТ-ГЛУ путем пересадения сульфатом аммония 50% насыщения с последующим диализом против PBS буфера pH 7,4 [12]. Для освобождения от примеси антител против БСА в выделенной общей γ -глобулиновой фракции применяли аффинную хроматографию с использованием синтезированного сорбента на основе BгCN-активированной сефарозе-4В и иммобилизованного на ней БСА [12]. Очищенную от примеси антител к БСА γ -глобулиновую фракцию собирали и определяли в ней титр АТ-ГЛУ методом твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА) путем последовательного разведения раствора АТ-ГЛУ и использования в качестве тест-антигена синтезированного конъюгата глутамата с гетерологичным белком — γ -глобулином лошади, полученным по методу [11]. Документировано, что титр АТ-ГЛУ составил $1:1024 \pm 1:16$. Очищенную фракцию АТ-ГЛУ разли-

вали по аликвотам и лиофилизировали с последующим хранением при +4°C.

В поведенческих экспериментах на 15-е сут. от начала введения раствора S100A9 олигомеров вырабатывали условный рефлекс пассивного избегания (УРПИ) у мышей в камере, состоящей из двух отсеков: светлого (15,5x15,5x19 см) и темного (9x9x17 см). В каждый отсек был вмонтирован пол из металлических стержней диаметром в 0,3 см и расстоянием в 0,9 см между ними. Отсеки соединялись между собой отверстием в общей стенке, снабженным гильотинной дверцей. В 1-й день животных помещали индивидуально в светлый отсек, освещенный яркой лампой в 100 Вт и позволяли ознакомиться с камерой в течение 60 с. После ознакомления мышей с камерой открывали дверцу между светлым и темным отсеками, при этом животное, в силу свойственного грызунам врожденного норкового рефлекса, переходило в темную часть камеры, регистрировалось время данного перехода (ЛП₁). При заходе мыши в темный отсек четырьмя лапами и на 2/3 хвоста, дверь между отсеками закрывали и наносили электрокожное раздражение силой в 0,3 мА в течение 1 с, после чего животное сразу вынимали и помещали в домашнюю клетку. Через 24 ч проводили сеанс тестирования выработанного навыка. Для этого животное помещали в освещенный отсек на 30 с для ознакомления, затем дверцу открывали и фиксировали время перехода в темную камеру (ЛП₂). Период наблюдения за животным составляло 300 с (с момента открытия дверцы в дни обучения и тестирования). Степень запоминания животными действия электрошока определяли по разности латентных периодов перехода животного в темную камеру при выработке УРПИ и через 24 ч после обучения в день тестирования (ΔЛП, с).

По окончании поведенческих экспериментов, всех мышей декапитировали и проводили на холоду забор церебральных структур (гиппокампа и префронтальной коры), которые хранили в жидком азоте до использования. Далее в образцах гиппокампа и префронтальной коры определяли содержание биогенных аминов (норадреналина, дофамина, серотонина), их метаболитов, а также нейромедиаторных аминокислот (аспартата, глутамата, глицина, таурина, ГАМК). Уровень моноаминов и их метаболитов в структурах мозга мышей определяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЖХ) с электрохимической детекцией (ВЭЖХ/ЭД) на хроматографе LC-304T (BAS, West Lafayette, США) с инжектором Rheodyne 7125, с объемом петли для нанесения образцов в 20 мкл [8]. Изучаемые вещества разделяли на обращенно-фазной колонке ReproSil-Pur, ODS-3, 4x100 мм, размер частиц 3 мкм (Dr.Majsch GmbH, «Элсико», Москва). Насос РМ-80 (BAS, США) при скорости элюции подвиж-

ной фазы 1,0 мл/мин и давлении 2 бара. Мобильная фаза состояла из: 0,1 М цитратно-фосфатного буфера, 1,1 mM октансульфоновой кислоты, 0,1 mM ЭДТА и 9% ацетонитрила (рН 3,0). Перед каждым хроматографическим определением мобильную фазу фильтровали с помощью вакуумного насоса через целлюлозные фильтры с диаметром пор 0,2 мкм при давлении в 20—40 мм рт. ст. и тщательно дегазировали под вакуумом с одновременной обработкой на ультразвуковой бане («Серьга», Россия) в течение 40—50 с. Измерение проводили на стеклоугольном электроде (+0,85 V) в режиме сравнения с электродом Ag/AgCl. Для количественного определения моноаминов в структурах мозга крыс использовали раствор внутреннего стандарта в концентрации 500 пкмоль/мл, содержащий диоксибензиламин (ДОБА), норадреналин (НА), L-3,4-дигидроксифенилаланин (ДОФА), 3,4-дигидроксифенилуксусную кислоту (ДОФУК), дофамин (ДА), гомованилиновую кислоту (ГВК), 5-гидрокситриптофан (5-ОТФ), 5-гидрокситриптамин (5-ОТ), 5-оксииндоуксусную кислоту (5-ОИУК). Величины концентрации моноаминов в опытных образцах рассчитывали методом «внутреннего стандарта», исходя из отношений площадей пиков в стандартной смеси и в экспериментальном образце, результаты выражали в нмоль/г ткани.

Содержание нейромедиаторных аминокислот определяли методом ВЭЖХ/ЭД согласно стандартной методике [13]. Поскольку аминокислоты в нативной форме являются очень слабыми хромофорами (не поглощаются УФ спектром) и не проявляют электрохимической активности, для их детекции необходимо предварительное проведение их химического модифицирования — дериватизации. Для этого использовали ортафталевый альдегид (ОФА) (Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA) флуоресцирующий при связывании с аминокислотой. В качестве стандартной смеси для калибровки колонки с сорбентом использовали раствор смеси аспарагиновой и глутаминовой кислот, таурина и ГАМК в концентрации 0,1 мкМ/мл в 0,1 н. HClO₄. Через 15 мин после инкубации пробы при комнатной температуре, 20 мкл раствора наносили на колонку Agilent Hypersil ODS 5 мкМ, 4,6 x 250 мм. Регистрацию продуктов разделения проводили на флуоресцентном детекторе Agilent 1100 (Agilent Technologies, Santa Clara, USA) при длине волны возбуждения 230 нм и волны эмиссии 392 нм. Мобильная фаза состояла из 0,05 М фосфатного буфера (рН 5,6) с 0,025 mM ЭДТА и 5% ацетонитрила. Мобильную фазу фильтровали с помощью вакуумного насоса через целлюлозный фильтр (диаметр пор — 0,02 мкм) и перед каждым хроматографическим определением тщательно дегазировали под вакуумом аналогично выше описанному методу. Разделение образцов проводили при скорости подвижной фазы 1,5 мл/мин.

Статистическую обработку данных проводили с использованием компьютерной программы Statistica 6.0 с применением однофакторного непараметрического дисперсионного анализа по Kruskal-Wallis с последующим внутригрупповым сравнением по U-критерию Mann-Whitney.

Результаты и обсуждение

Образцы конформационных структур белка S100A9, содержащие амилоидные олигомеры были получены через 2 ч от начала инкубации нативного белка в условиях, описанных выше. Образование S100A9 олигомеров контролировалось по увеличению в 1,3 раза ThT флуоресценции по сравнению с свежеприготовленным раствором нативного белка S100A9. По данным АСМ с последующим анализом структурных имиджей, S100A9 олигомеры морфологически были охарактеризованы как структуры округлой формы с средней высотой от 1,5 до 2,0 нм, измеренной поперечными сечениями АСМ (рис. 1).

В результате проведенных поведенческих экспериментов с стареющими животными, которым хронически интраназально вводили S100A9 олигомеры индивидуально или в комбинации с АТ-ГЛУ выявлены существенные различия между исследуемыми группами и контролем по показателям ЛП1 $H(2, N = 30) = 15,72$ $p = 0,0004$, ЛП2 $H(2, N = 30) = 19,43$ $p = 0,0001$ и Δ ЛП $H(2, N = 30) = 8,69$ $p = 0,01$. Полученные результаты представлены на рис. 2.

Обнаружено, что через 14 сут. от начала интраназального введения раствора S100A9 олигомеров у 12-месячных мышей документированы выраженные нарушения пространственной памяти при выработке у животных условного рефлекса пассивного избегания. Данные нарушения выражались в снижении латентного времени захода животных в темную камеру при воспроизведении УРПИ через 24 ч после обучения, а также в уменьшении степени запоминания (Δ ЛП) по сравнению с контролем по U критерию ($p < 0,05$). Следует также отметить, что у стареющих животных, получавших S100A9 олигомеры наблюдали в первый день обучения в УРПИ увеличение латентного времени (ЛП1) по сравнению с контролем и группой мышей, получавших S100A9 олигомеры совместно с АТ-ГЛУ. В группе мышей после интраназального совместного введения S100A9 олигомеров и АТ-ГЛУ было выявлено, что через 14 сут. после введения веществ при выработке УРПИ степень запоминания (Δ ЛП) у животных не отличалась от контроля. Показано, что хроническое интраназальное введение АТ-ГЛУ совместно с S100A9 олигомерами уменьшало мнестический дефицит, индуцированный введением S100A9 олигомеров, более чем в 9 раз. Используемая

в работе поведенческая модель УРПИ предназначена для изучения процессов связанных с воспроизведением памятного следа, и, исходя из этого, можно предположить, что токсические олигомерные структуры белка S100A9 вызывают амнезию на этапе воспроизведения памятного следа, связанного с болевым раздражением, нанесенным в первый день обучения. Учитывая, что белок S100A9 является активным участником процессов воспаления, образующиеся в естественных условиях токсические олигомеры при повышенной экспрессии самого белка, могут также инициировать при их хроническом введении процессы локального воспаления в мозге животных, отягощая течение мнестических процессов. В условиях сочетанного введения S100A9 олигомеров и АТ-ГЛУ, наблюдается эффект сохранения памятного следа у экспериментальных животных, что позволяет предположить наличие антиамнестических свойств препа-

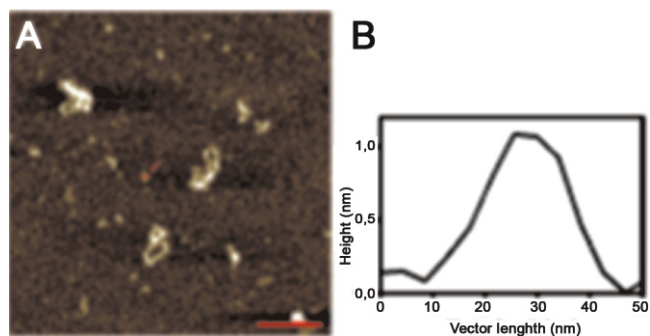


Рис. 1. А – изображение S100A олигомеров, полученных атомно-силовой микроскопией; В – уровень флуоресценции при связывании S100A олигомеров с тιοфлавином Т.

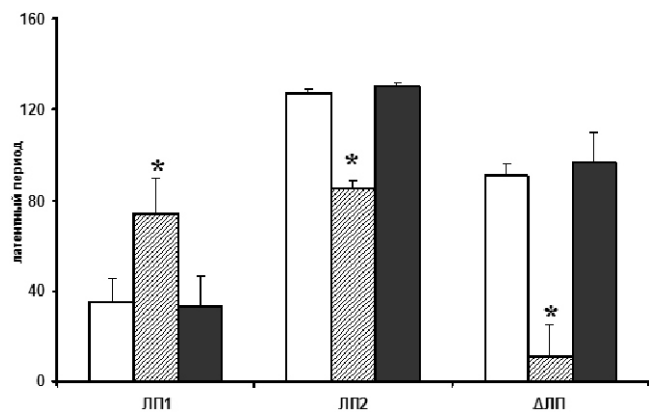


Рис. 2. Влияние 14-дневного интраназального введения физиологического раствора, S100A9 олигомеров индивидуально и совместно с антителами к глутамату на выработку УРПИ у стареющих мышей C57Bl/6.

Белые столбики – контрольная группа мышей C57Bl/6 (физиологический раствор), заштрихованные столбики – группа мышей C57Bl/6, получавшая олигомеры белка S100A9, темные столбики – группа мышей C57Bl/6, получавшая олигомеры S100A9 вместе с АТ-ГЛУ. ЛП1 – латентное время обучения, ЛП2 – латентное время воспроизведения УРПИ, Δ ЛП – латентное время степени запоминания. * $p < 0,05$ по сравнению с контрольной группой мышей.

рата АТ-ГЛУ. Представленные в работе результаты дополняют ранее установленные факты, свидетельствующие, что введение S100A9 фибрилл совместно с очищенными моноспецифическими АТ-ГЛУ не привело к нарушению памяти у животных на модели УРПИ, что может дополнительно свидетельствовать об антиамнестической направленности используемых АТ-ГЛУ [14].

Изучение нейрохимических механизмов, вовлеченных в процессы памяти и нарушающиеся при действии токсических S100A9 олигомеров является одной из задач данной работы. С этой целью по окончании поведенческих экспериментов у всех мышей в релевантных структурах мозга, а именно гиппокампе и префронтальной коре проводили количественное определение содержания нейромедиаторных аминокислот и моноаминов. При сравнительном нейрохимическом анализе содержания аминокислотного паттерна в гиппокампе и префронтальной коре в группе мышей, получавших S100A9 олигомеры, обнаружено повышение по сравнению с контрольной группой животных уровня глутаминовой кислоты в обеих структурах на 47% и 80% соответственно (рис. 3).

При этом в гиппокампе у этих животных уровень аспарагиновой кислоты, глицина, таурина и ГАМК значительно не изменялся. В префронтальной коре у мышей после введения S100A9 олигомеров наблюдали снижение в 2 раза концентрации аспарагиновой кислоты и значительное повышение концентрации таурина более чем на 60% от уровня аминокислоты в данной структуре мозга у животных, получавших физиологический раствор (рис. 3). Вероятно, повышение концентрации таурина в префронтальной коре напрямую связано с амнестическими эффектами S100A9 олигомеров, так как таурин является тормозящим нейротрансмиттером с нейромодулирующим и нейрозащитным действием [15]. При этом таурин может усилить функцию ГАМК, образуя с ГАМК механизм, защищающий от избыточного количества возбуждающих нейротрансмиттеров [15, 16]. Показано, что сочетанное введение S100A9 олигомеров и АТ-ГЛУ приводило к снижению концентрации глутаминовой кислоты на 30% в гиппокампе и незначительно до 17% — в префронтальной коре мозга у стареющих мышей. При этом в этой группе животных влияния на содержание таурина в префронтальной коре выявлено не было. У данных животных отмечено сопоставимое с группой животных, получавших S100A9 олигомеры, повышенное по сравнению с контролем содержание этой серосодержащей аминокислоты (рис. 3). Данные свидетельствуют, что даже в условиях связывания АТ-ГЛУ избытка глутаминовой кислоты механизм иммунной защиты от возбуждающих аминокислот сохраняет свою активность. Описано, что чрезмерное высвобождение глутамата является ключевым фактором, влияющим на повреждение нейронов при некоторых неврологических заболеваниях [17]. Кроме того, глутамат является распространенным возбуждающим нейротрансмиттером в ЦНС млекопитающих, и играет важную роль как в физиологических функциях мозга, так и в патологии [18, 19]. Известно также, что глутамат может регулировать молекулярные и клеточные процессы, такие, как нейрогенез, рост нейри-

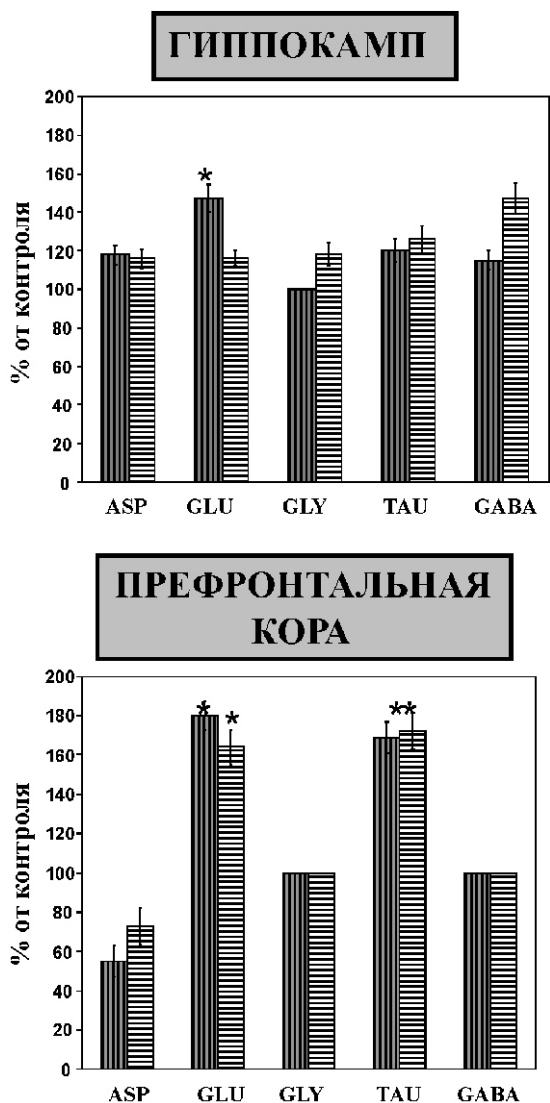


Рис. 3. Содержание аспарагиновой кислоты, глутаминовой кислоты, глицина, таурина и ГАМК в гиппокампе и префронтальной коре стареющих мышей C57Bl/6 после 14-дневного интраназального введения S100A9 олигомеров индивидуально и совместно с антителами к глутамату. Результаты представлены в % от контроля. Контроль принят за 100%. Заштрихованные темные столбики — группа мышей C57Bl/6, получавшая олигомеры белка S100A9, заштрихованные светлые столбики — группа мышей C57Bl/6, получавшая S100A9 олигомеры вместе с АТ-ГЛУ. *p < 0,05 по сравнению с контрольной группой мышей; **p < 0,01 по сравнению с контрольной группой мышей.

тов, синаптогенез и апоптоз [20]. Более того, было установлено, что некоторые из важнейших функций мозга, включая обучение и память, зависят от высвобождения синаптического глутамата [19]. При этом повышенный уровень внеклеточного глутамата может вызывать гибель нейронов, и это явление, называемое «эксцитотоксичность», является звеном патогенеза многих неврологических заболеваний, где нарушается нормальная активность ЦНС [21, 22]. Амнезия, наблюдаемая на модели УРПИ и вызванная действием S100A9 олигомерами, может напрямую быть связана с явлением эксцитотоксичности, а амнестический эффект АТ-ГЛУ — с ослаблением проявлений эксцитотоксичности, путем связывания избыточного глутамата в структурах мозга. С другой стороны, определение содержания моноаминов в изучаемых структурах мозга у стареющих мышей выявило отличный по специфичности профиль концентрации моноаминов и их метаболитов в изучаемых структурах мозга, вовлеченных в обеспечение механизмов формирования памяти в условиях УРПИ. Так, в гиппокампе и префронтальной коре не выявлено существенных изменений в концентрации норадреналина, 5-НТ и его метаболитов у мышей в группах как с индивидуальным введением S100A9 олигомеров, так и при их совместном введении с АТ-ГЛУ, по сравнению с животными, получившими физиологический раствор. При этом в гиппокампе стареющих мышей после интраназального введения выявлены элементы дисбаланса дофаминергической системы мозга. Так, концентрация дофамина статистически значимо (более чем на 50%) снижена с одновременным увеличением содержания его метаболита DOPAC более чем в 2—2,5 раза по сравнению с контролем. Интересно отметить, что соотношения метаболитов дофамина и самого дофамина изменяется следующим образом по сравнению с таковыми в гиппокампе контрольных животных и составляет: DOPAC/DA — 250%, DA — 260% (рис. 4).

Как видно из рис. 4, в префронтальной коре введение S100A9 олигомеров также вызывает снижение концентрации дофамина на 50—60% от контрольного уровня, но не инициирует изменения содержания его метаболитов DOPAC и HVA. Новые нейрхимические данные были получены при хроническом совместном введении мышам S100A9 олигомеров и АТ-ГЛУ. Обнаружено, что в присутствии АТ-ГЛУ не наблюдается снижение дофамина как в гиппокампе, так и в префронтальной коре, а также изменения концентрации метаболитов и их оборота (рис. 4). Сами белковые ансамбли S100A9 с нарушенной конформацией в виде агрегатов, с одной стороны, и сигнал воспаления с другой стороны, приводят к дисбалансу нейромедиаторных систем мозга, модифицируя дофаминергическую систему, которая напрямую вовлечена в механизмы обучения и памяти [23]. Взаимная дисрегуляция глутаминергиче-

ской и дофаминергической систем в условиях действия токсических белковых олигомеров белка S100A9 может служить нейрхимической основой нарушения воспроизведения памятного следа у стареющих животных.

Таким образом, обнаружено амнестическое влияние S100A9 олигомеров на процессы формирования пространственной памяти на модели УРПИ, а также нейропротективное влияние антител к глутамату. В условиях вызванной амнезии документирован дисбаланс глутаматергической и дофаминергической систем, связанный с повышением концентрации глутамата и одновременным снижением уровня дофамина в мозге у стареющих животных.



Рис. 4. Содержание норадреналина, дофамина, серотонина и их метаболитов, а также их оборота в гиппокампе и префронтальной коре стареющих мышей C57Bl/6 после 14-дневного интраназального введения олигомеров S100A9 индивидуально или совместно с антителами к глутамату. Результаты представлены в % от контроля. Контроль принят за 100%; заштрихованные темные столбики — группа мышей C57Bl/6, получавшая олигомеры белка S100A9, заштрихованные светлые столбики — группа мышей C57Bl/6, получавшая олигомеры S100A9 вместе с АТ-ГЛУ. * $p < 0,05$ по сравнению с контрольной группой мышей; ** $p < 0,01$ по сравнению с контрольной группой мышей.

References

1. De-Paula VJ, Radanovic M, Diniz BS, Forlenza OV. Alzheimer's disease. *Subcell Biochem.* 2012; 65: 329-52. doi: 10.1007/978-94-007-5416-4_14.
2. Selkoe DJ. Alzheimer's disease is a synaptic failure. *Science* 2002; 298(5594): 789-91. doi: 10.1126/science.1074069
3. Hardy J, Selkoe DJ. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science* 2002; 297: 353-6. doi: 10.1126/science.1072994.
4. Crews L, Masliah E. Molecular mechanisms of neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Hum Mol Genet.* 2010; 19(R1):R12-20. doi: 10.1093
5. Calsolaro V, Edison P. Neuroinflammation in Alzheimer's disease: current evidence and future directions. *Alzheimers Dement.* 2016; 12(6): 719-32. doi: 10.1016/j.jalz.2016.02.010.
6. Wang C, Klechikov AG, Gharibyan AL, Warmlander SK, Jarvet J, Zhao L, Jia X, Narayana VK, Shankar SK, Olofsson A, Brannstrom T, Mu Y, Graslund A, Morozova-Roche LA. The role of pro-inflammatory S100A9 in Alzheimer's disease amyloid-neuroinflammatory cascade. *Acta Neuropathol.* 2014; 127: 507-22. doi: 10.1007/s00401-013-1208-4.
7. Gorbатов VY, Trekova NA, Fomina VG, Davydova TV. Anti-amnesic effects of antibodies to glutamate in experimental Alzheimer's disease. *Bull Exp Biol Med.* 2010; 150: 23-5. doi: 10.1007/s10517-010-1058-1.
8. Gruden MA, Davidova TV, Yanamandra K, Kucheryanu VG, Morozova-Roche LA, Sherstnev VV, Sewell RD. The misfolded pro-inflammatory protein S100A9 disrupts memory via neurochemical remodelling instigating an Alzheimer's disease-like cognitive deficit. *Behav Brain Res.* 2016; 306: 106-16. doi: 10.1016/j.bbr.2016.03.016.
9. Gruden MA, Davydova TV, Wang C, Narkevich VB, Fomina VG, Kudrin VS, Morozova-Roche LA, Sewell RDE. Nasal inoculation with α -synuclein aggregates evokes rigidity, locomotor deficits and immunity to such misfolded species as well as dopamine. *Behav Brain Res.* 2013; 243: 205-12. doi: 10.1016/j.bbr.2013.01.011. Epub 2013 Jan 17.
10. Davydova T.V., Basharova L.A., Kovalyov I.E., Evseev V.A. Suppression of alcohol consumption at induction of synthesis of antibodies to serotonin. *Pharmakol. Toksikol.* 1987; 50(2): 57-8. (in Russian)
11. Seguela P, Geffard M, Buijs RM, Le Moal M. Antibodies against gamma-aminobutyric acid: specificity studies and immunocytochemical results. *Proc Natl Acad Sci. USA.* 1984; 81: 3888-92. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC345327>
12. *Immunological methods.* edited by H. Friemel. Medicine 1987. (in Russian)
13. Pearson S.J., Crudek C., Mercer K. et al. Electrochemical detection of human brain transmitter amino acids by high-performance liquid chromatography of stable o-phthalaldehyde – sulphite derivatives. *J. Neural Transm.* 1991; 86: 151-7.
14. Gruden MA, Davydova TV, Fomina VG, Vetrile LA, Morozova-Roche LA, Sewell RD. Antibodies to Glutamate Reversed the Amnesic Effects of Proinflammatory S100A9 Protein Fibrils in Aged C57Bl/6 Mice. *Bull Exp Biol Med.* 2017; 162(4): 430-2. doi: 10.1007/s10517-017-3632-2.
15. Kim HY, Kim HV, Yoon JH, Kang BR, Cho SM, Lee S, Kim JY, Kim JW, Cho Y, Woo J, Kim Y. Taurine in drinking water recovers learning and memory in the adult APP/PS1 mouse model of Alzheimer's disease. *Sci Rep.* 2014 Dec 12; 4:7467. doi: 10.1038/srep07467.
16. Suarez LM, Munoz MD, Martin Del Rio R, Solis JM. Taurine content in different brain structures during ageing: effect on hippocampal synaptic plasticity. *Amino Acids.* 2016; 48(5):1199-208. doi: 10.1007/s00726-015-2155-2.
17. Duan Y, Wang Z, Zhang H, He Y, Fan R, Cheng Y, Sun G, Sun X. Extremely low frequency electromagnetic field exposure causes cognitive impairment associated with alteration of the glutamate level, MAPK pathway activation and decreased CREB phosphorylation in mice hippocampus: reversal by procyanidins extracted from the lotus seedpod. *Food Funct.* 2014; 5: 2289-97. doi: 10.1039/c4fo00250d.
18. Mattson MP. Glutamate and Neurotrophic Factors in Neuronal Plasticity and Disease. *Ann NY Acad Sci.* 2008.; 1144: 97-112. doi: 10.1196/annals.1418.005
19. Wang H, Peng R-Y. Basic roles of key molecules connected with NMDAR signaling pathway on regulating learning and memory and synaptic plasticity. *Mil Med Res.* 2016; 3(1): 26. doi: 10.1186/s40779-016-0095-0.
20. Martin SJ, Grimwood PD, Morris RGM. Synaptic plasticity and memory: an Evaluation of the hypothesis. *Ann Rev Neurosci.* 2000; 23:649-711. doi: 10.1146/annurev.neuro.23.1.649.
21. Atlante A, Calissano P, Bobba A, Giannattasio S, Marra E, Passarella S. Glutamate neurotoxicity, oxidative stress and mitochondria. *FEBS Lett.* 2001; 497:1-5. doi: 10.1016/S0014-5793(01)02437-1.
22. Yang JL, Sykora P, Wilson DM 3rd, Mattson MP, Bohr VA. The excitatory neurotransmitter glutamate stimulates DNA repair to increase neuronal resiliency. *Mech Ageing Dev.* 2011; 132:405-411. doi: 10.1016/j.mad.2011.06.005.
23. Kushida S, Kimoto K, Hori N, Toyoda M, Karasawa N, Yamamoto T, Kojo A, Onozuka M. Soft-diet feeding decreases dopamine release and impairs aversion learning in Alzheimer model rats. *Neurosci Lett.* 2008 Jul 11; 439(2):208-11. doi: 10.1016/j.neulet.2008.05.017.

Сведения об авторах:

Давыдова Татьяна Викторовна доктор мед. наук, гл. науч. сотр. лаборатории общей и перинатальной нейроиммунопатологии ФГБНУ «НИИ общей патологии и патофизиологии»

Кудрин Владимир Сергеевич, к.м.н., зав. лаб. нейрхимической фармакологии ФГБНУ «НИИ фармакологии им. В.В. Закусова»

Наркевич Виктор Борисович с.н.с., лаб. нейрозимической фармакологии ФГБНУ «НИИ фармакологии им. В.В. Закусова»

Ветрилэ Лучия Александровна, к.м.н., вед. науч. сотр. лаб. общей и перинатальной нейроиммунопатологии ФГБНУ «НИИ общей патологии и патофизиологии»

Morozova-Roche L.M.A., Professor Umea University Department of Medical Biochemistry and Biophysics Umea SE 90781 Sweden

Sewell R.D.E., Professor, Cardiff School of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, Cardiff University, Cardiff, CF10 3NB, UK