

DOI 10.18699/vjgb-24-82

Изменения в черной субстанции головного мозга у мышей, моделирующих болезнь Паркинсона

И.Н. Рожкова¹, С.В. Окотруб¹, Е.Ю. Брусенцев ¹, Т.А. Рахманова^{1, 2}, Д.А. Лебедева¹, В.С. Козенева^{1, 2},
Н.А. Шавшаева^{1, 2}, Н.В. Хоцкин¹, С.Я. Амстиславский¹ 

¹ Федеральное исследовательское учреждение Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

² Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск, Россия

 amstis@yandex.ru

Аннотация. Болезнь Паркинсона (БП) – возрастная нейродегенеративная патология центральной нервной системы. Наиболее характерными нарушениями при БП считаются аномалии в нигростриарной системе, включающей в себя черную субстанцию среднего мозга и полосатое тело. При БП аномалии дофаминергической системы мозга сопровождаются альфа-синуклеинопатией. Для изучения механизмов возникновения данной патологии созданы генетические модели на мышах. Трансгенные мыши линии B6.Cg-Tg(PrNp-SNCA*^{A53T})23Mkle/J (далее по тексту B6.Cg-Tg) имеют мутацию A53T в гене SNCA альфа-синуклеина человека. В нашей предыдущей работе оценена плотность нейронов в префронтальной коре, гиппокампе, черной субстанции и полосатом теле у мышей этой линии, однако дофаминергическая система мозга, которая играет ключевую роль в развитии БП, изучена не была. Целью настоящего исследования стало изучение координации движений и баланса тела, а также плотности дофаминовых нейронов и накопления альфа-синуклеина в черной субстанции самцов мышей линии B6.Cg-Tg в возрасте шести месяцев. В качестве контроля использованы сибсы, у которых не было экспрессии гена SNCA с мутацией A53T и экспрессировался мышинный альфа-синуклеин (далее по тексту – дикий тип; wild type, WT), того же пола и возраста, из тех же самых выводков, что и исследуемые мыши B6.Cg-Tg. Координация движений и баланс тела были изучены с помощью теста «рота-род»; плотность дофаминовых нейронов и накопление альфа-синуклеина в черной субстанции оценены иммуногистохимическим методом. Полученные результаты показывают, что мыши B6.Cg-Tg не имеют отличий по координации движений и баланса тела от контроля – сибсов дикого типа. Однако у мышей B6.Cg-Tg в черной субстанции были обнаружены накопление альфа-синуклеина и уменьшение числа дофаминовых нейронов. Таким образом, мыши линии B6.Cg-Tg в возрасте шести месяцев имеют симптомы начала развития БП, такие как накопление мутантного альфа-синуклеина и уменьшение числа дофаминовых нейронов в черной субстанции. Полученные в этом исследовании результаты позволяют характеризовать линию B6.Cg-Tg в качестве адекватной модели для изучения ранней стадии БП человека уже в возрасте шести месяцев.

Ключевые слова: мыши; болезнь Паркинсона; координация движений; дофаминергическая система мозга; альфа-синуклеин.

Для цитирования: Рожкова И.Н., Окотруб С.В., Брусенцев Е.Ю., Рахманова Т.А., Лебедева Д.А., Козенева В.С., Шавшаева Н.А., Хоцкин Н.В., Амстиславский С.Я. Изменения в черной субстанции головного мозга у мышей, моделирующих болезнь Паркинсона. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2024;28(7):744-751. DOI 10.18699/vjgb-24-82

Финансирование. Работа выполнена при поддержке РФФ, № 23-25-00123.

Благодарности. Работа выполнена с использованием оборудования ЦКП «Центр генетических ресурсов лабораторных животных» Института цитологии и генетики СО РАН, поддержанного Минобрнауки России (уникальный идентификатор проекта RFMEFI62119X0023). Микроскопические работы выполнены в ЦКП микроскопического анализа биологических объектов Института цитологии и генетики СО РАН.

Вклад авторов. Идея работы и планирование эксперимента – С.Я.А., И.Н.Р., Е.Ю.Б.; проведение поведенческих экспериментов – И.Н.Р., В.С.К., Ш.Н.А., Н.В.Х.; обработка результатов – С.В.О., Е.Ю.Б., Д.А.Л., Т.А.Р., В.С.К., С.Я.А.; написание и редактирование рукописи – С.Я.А., Е.Ю.Б., В.С.К., Ш.Н.А.

Substantia nigra alterations in mice modeling Parkinson's disease

I.N. Rozhkova¹, S.V. Okotrub¹, E.Yu. Brusentsev ¹, T.A. Rakhmanova^{1, 2}, D.A. Lebedeva¹, V.S. Kozeneva^{1, 2},
N.A. Shavshaeva^{1, 2}, N.V. Khotskin¹, S.Ya. Amstislavsky¹ 

¹ Institute of Cytology and Genetics of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

² Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

 amstis@yandex.ru

Abstract. Parkinson's disease (PD) is an age-related neurodegenerative pathology of the central nervous system. The well-known abnormalities characteristic of PD are dysfunctions in the nigrostriatal system including the substantia nigra of the midbrain and the striatum. Moreover, in PD persons, alpha-synucleinopathy is associated with abnormalities in the dopaminergic brain system. To study the mechanisms of this pathology, genetic models in mice have been designed. Transgenic mice of the B6.Cg-Tg(Prnp-SNCA*A53T)23Mkle/J strain (referred to as B6.Cg-Tg further in the text) possess the A53T mutation in the human alpha-synuclein *SNCA* gene. The density of neurons in the prefrontal cortex, hippocampus, substantia nigra and striatum in B6.Cg-Tg mice was assessed in our previous work, but the dopaminergic system was not studied there, although it plays a key role in the development of PD. The aim of the current study was to investigate motor coordination and body balance, as well as dopaminergic neuronal density and alpha-synuclein accumulation in the substantia nigra in male B6.Cg-Tg mice at the age of six months. Wild-type mice of the same sex and age, siblings of the B6.Cg-Tg mice from the same litters, lacking the *SNCA* gene with the A53T mutation, but expressing murine alpha-synuclein, were used as controls (referred to as the wild type further in the text). Motor coordination and body balance were assessed with the rota-rod test; the density of dopaminergic neurons and accumulation of alpha-synuclein in the substantia nigra were evaluated by the immunohistochemical method. There was no difference between B6.Cg-Tg mice and WT siblings in motor coordination and body balance. However, accumulation of alpha-synuclein and a decrease in the number of dopaminergic neurons in the substantia nigra were found in the B6.Cg-Tg mouse strain. Thus, the mice of the B6.Cg-Tg strain at the age of six months have some symptoms of the onset of PD, such as the accumulation of mutant alpha-synuclein and a decrease in the number of dopaminergic neurons in the substantia nigra. Taken together, the results obtained in our work qualify the B6.Cg-Tg strain as a pertinent model for studying the early stage of human PD already at the age of six months.

Key words: mice; Parkinson's disease; motor coordination; dopaminergic brain system; alpha-synuclein.

For citation: Rozhkova I.N., Okotrub S.V., Brusentsev E.Yu., Rakhmanova T.A., Lebedeva D.A., Kozeneva V.S., Shavshaeva N.A., Khotskin N.V., Amstislavsky S.Ya. Substantia nigra alterations in mice modeling Parkinson's disease. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2024;28(7):744-751. DOI 10.18699/vjgb-24-82

Введение

Болезнь Паркинсона (БП) является вторым по распространенности нейродегенеративным заболеванием человека; наиболее часто встречается идиопатическая и спорадическая БП (Beitz, 2014; Tran et al., 2020; Bidesi et al., 2021). Основные симптомы БП – нарушение моторных функций: ригидность мышц, тремор в состоянии покоя и брадикинезия (Halliday et al., 2006; Beitz, 2014). Для данного заболевания характерны также не связанные напрямую с изменением моторики аномалии, в частности нарушение сна, нервно-психические и когнитивные расстройства (Beitz, 2014; Hayes, 2019). При разных формах БП у пациентов могут быть прогрессирующие с возрастом нарушения в различных структурах головного мозга (Halliday et al., 2006; Dickson et al., 2009).

Эта патология имеет множественные отклонения, связанные с синтезом нейромедиаторов в головном мозге и функцией их рецепторов (Jellinger, 1991; Deutch et al., 2006). Наиболее характерными нарушениями при БП считаются аномалии в nigrostriарной системе, которая включает в себя черную субстанцию (ЧС) среднего мозга и полосатое тело (ПТ) (Dickson et al., 2009; Beitz, 2014; Hayes, 2019). Nigrostriарная система играет ключевую роль в контроле движения за счет активации дофаминовых нейронов и передачи сигнала во время включения мышц-сгибателей и разгибателей (Korchounov et al., 2010).

Другая особенность БП – накопление альфа-синуклеина в нейронах головного мозга, в частности в ПТ и ЧС (Dickson et al., 2009; Burre et al., 2018; Lai et al., 2021). Альфа-синуклеин – это белок, принимающий участие в поддержании функциональной активности синапсов, а именно в регуляции биосинтеза, транспорта и хранения дофамина (Burre et al., 2018; Bidesi et al., 2021). При БП идентифицируют две мутации в гене альфа-синуклеина, A53T и A30P, которые приводят к нарушению фолдинга белка и агрегации его мономеров (Polymeropoulos et al.,

1997; Spillantini et al., 1997). Таким образом, характерными маркерами БП являются уменьшение плотности нейронов и накопление альфа-синуклеина в различных структурах nigrostriарного пути (Dickson et al., 2009; Venda et al., 2010; Poewe et al., 2017).

Для изучения механизмов возникновения БП и поиска путей коррекции этого заболевания используют модели, созданные на животных. В основном их можно разделить на две группы: токсические и генетические (Григорян, Базян, 2007; Korolenko et al., 2020). Исследования показали, что как поражения нейронов в ЧС, так и точечные нарушения в ПТ приводят к одновременной дисфункции мышц-сгибателей и разгибателей (Stern, 1966; Kato, Kimura, 1992). Чаще всего при БП аномалии плотности нейронов и двигательной активности сопровождаются альфа-синуклеинопатией (Dickson, 2018).

В настоящее время наиболее востребованные для исследований модели БП – трансгенные линии мышей, у которых экспрессируются мутантные формы гена *SNCA* альфа-синуклеина человека: A30P и/или A53T (Unger et al., 2006; Григорян, Базян, 2007; Korolenko et al., 2020). Дегенерация nigrostriарной системы у мышей коррелирует с наблюдаемым двигательным дефицитом этих животных (Chia et al., 2020). Трансгенные мыши с мутацией A30P в гене *SNCA* демонстрируют, как правило, более мягкий фенотип заболевания, чем мыши с мутацией A53T в гене *SNCA*, что может затруднять изучение поведенческих особенностей и нарушений в различных структурах головного мозга (Van der Putten et al., 2000; Lee et al., 2001; Crabtree, Zhang, 2012). На полученные результаты при сравнении разных моделей БП может влиять и то, на основе какой линии создана модель, как и перед каким промотором встроены трансген и другие факторы (Crabtree, Zhang, 2012).

Для изучения БП на моделях, полученных на мышах, используют ряд подходов (Graham, Sidhu, 2010; Tikhonova

et al., 2020; Langley et al., 2021). В частности, широко применяют тест «рота-род» (PP), с помощью которого исследуют координацию движений и баланса тела (Graham, Sidhu, 2010; Seo et al., 2020). Однако результаты тестирования ключевых признаков, характеризующих БП, могут отличаться, если один и тот же трансген проявляется на различном генетическом фоне. В обзорной статье D.M. Crabtree и J. Zhang (2012) подробно описано влияние того, как на проявление признаков патологии влияют разные генетические факторы, в частности, на основе какой линии создана модель болезни Паркинсона, как и перед каким промотором встроены трансген. В работе (Paumier et al., 2013) трансгенные мыши с альфа-синуклеином человека и мутацией A53T демонстрируют более длительный латентный период до падения со вращающегося барабана в тесте PP, характеризующем координацию движений и баланс тела, по сравнению с сибсами дикого типа уже в возрасте двух месяцев. В других работах, выполненных на трансгенных линиях мышей с тем же альфа-синуклеином человека с мутацией A53T, результат был либо противоположным (Graham, Sidhu, 2010), либо различия в тесте PP с контрольными животными дикого типа отсутствовали даже в возрасте девяти месяцев (Liu et al., 2018), в зависимости от генетической основы, на которой была получена трансгенная линия мышей.

При изучении мышей, моделирующих БП, также применяют иммуногистохимические методы для исследования различных структур головного мозга (Tang et al., 2017; Korolenko et al., 2020; Langley et al., 2021). В фокусе этих исследований находятся ЧС и ПТ, в которых происходят основные изменения при БП (Burge et al., 2018; Lai et al., 2021).

Трансгенные гемизиготные мыши линии B6.Cg-Tg (PrNp-SNCA*A53T)23Mkle/J (далее по тексту – B6.Cg-Tg) с мутацией A53T в гене *SNCA* альфа-синуклеина человека созданы в Джексонской лаборатории (США) (<https://www.jax.org/strain/006823>). Этот ген экспрессируется не у всех потомков (Unger et al., 2006), соответственно, среди сибсов могут быть потомки как с патологией, так и без нее (дикий тип). Модель отражает особенности поведения и воспроизводит симптомы синуклеинопатии, в частности возрастную нейродегенерацию, характерную для БП (Pupyshv et al., 2018; Korolenko et al., 2020; Seo et al., 2020; Zhang et al., 2022).

В работах по исследованию мышей B6.Cg-Tg как модели БП в качестве контрольной группы практически всегда используют мышей линии C57BL/6J, выбранных случайным образом (Pupyshv et al., 2018; Seo et al., 2020). Материнская среда оказывает на потомков достаточно сильное воздействие, в том числе через эпигенетические механизмы как во время беременности, так и в ранний постнатальный период (Case et al., 2010; Nicholas, Ozanne, 2019; Wu, Dean, 2020). Выбор адекватного контроля является важнейшей составляющей экспериментального дизайна, так как позволяет нивелировать факторы, которые могут повлиять на оцениваемые параметры. В частности, к таким факторам может относиться влияние матери как в течение пренатального развития (Wu, Dean, 2020), так и в ходе раннего постнатального онтогенеза во время периода вскармливания (Case et al., 2010). Для минимизации

материнского эффекта рекомендовано сравнивать сибсы, особенно при исследовании трансгенных и нокаутных животных (Holmdahl, Malissen, 2012; Chen et al., 2020). Таким образом, исследование, проведенное на мышах линии B6.Cg-Tg в сравнении с сибсами дикого типа в качестве контроля, будет более корректным.

На мышах B6.Cg-Tg с мутацией A53T в гене *SNCA*, моделирующих БП человека, до сих пор недостаточно исследован нигростриарный путь головного мозга, важный для развития данной патологии. В нашей предыдущей работе (Рожкова и др., 2023) исследована плотность нейронов в префронтальной коре, гиппокампе, ЧС и ПТ у мышей линии B6.Cg-Tg на раннем этапе развития этой патологии, а именно: в возрасте шести месяцев, однако дофаминергическая система, которая играет ключевую роль в развитии этого заболевания, не была изучена.

Цель настоящей работы – сравнение самцов мышей линии B6.Cg-Tg с сибсами дикого типа (wild type, WT) по следующим параметрам: 1) координация движений и баланса тела; 2) накопление альфа-синуклеина; 3) плотность дофаминовых нейронов в черной субстанции.

Материалы и методы

Экспериментальные животные. В эксперименте исследованы самцы – сибсы двух линий мышей, полученные после спаривания самок C57BL/6J (4 самки) с гемизиготными самцами мышей B6.Cg-Tg (4 самца). В результате было рождено 4 помета. У потомков мышей проводили генотипирование. В опытную группу выбирали тех животных, у которых была обнаружена мутация A53T (B6.Cg-Tg), остальных использовали в качестве контроля (дикий тип). Всего было получено 5 гемизиготных самцов мышей B6.Cg-Tg, моделирующих БП, и 10 самцов дикого типа, у которых, по результатам генотипирования, экспрессии гена *SNCA* с мутацией A53T не обнаружено.

Животных содержали в SPF-виварии Института цитологии и генетики СО РАН (Новосибирск, Россия) в индивидуально вентилируемых клетках OptiMice (Animal Care, США) размером 34.3 × 29.2 × 15.5 см, при температуре 22–24 °C и влажности 40–50 %, с инвертированным 12:12-часовым циклом дня-ночи (рассвет в 3 ч утра); в качестве подстилки использовали березовую щепу фракционную для лабораторных животных. Животные имели свободный доступ к стандартизированному комбикорму для лабораторных мышей и крыс ЛБК 120 Р-22, ГОСТ 34566-2019 («БиоПро», Россия) и очищенной воде «Северянка» («Экопроект», Россия), обогащенной минеральными добавками.

Все исследования одобрены комитетом по биоэтике Института цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук (протокол № 145 от 29.03.2023) и соответствуют требованиям Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых в экспериментальных и других научных целях.

Исследование координации движений и баланса тела. В возрасте шести месяцев изучали мышей линии B6.Cg-Tg, у которых была подтверждена мутация A53T (5 самцов), и контрольных животных дикого типа (10 самцов) из тех же пометов, у которых, по результатам генотипирования, экспрессии гена *SNCA* с мутацией A53T

обнаружено не было. Оценивали координацию движений и баланс тела с помощью теста РР. За два дня до начала тестирования животные были изолированы друг от друга и помещены в чистую индивидуальную клетку OptiMice размером $34.3 \times 29.2 \times 15.5$ см. Перед тестированием каждого животного оборудование обрабатывали 6 % раствором перекиси водорода.

Тест РР с ускорением используют для оценки координации движений и баланса тела при изучении нейродегенеративных заболеваний; в частности его применяют при изучении генетических моделей БП, созданных на мышах (Seo et al., 2020). Устройство Ugo Basile 47 600 (Ugo Basile, Италия) представляет собой пять дорожек шириной 5.7 см с барабанами диаметром 3 см, расположенных на высоте 16 см и разделенных плоскими круглыми деталями. Прибор имеет размеры $27.94 \times 43.18 \times 38.10$ см, вес 6.4 кг и ускорение 2–80 об/мин. Тест РР был запрограммирован на вращение с линейно возрастающей скоростью от 5 до 40 об/мин за 300 с. Для повышения надежности результатов тестирования выполняли три сессии для каждого тестируемого животного с перерывами в одну минуту. Оценивали время до падения мыши с барабана для каждой сессии. Непосредственно после проведения теста РР изучали мозг мышей линии B6.Cg-Tg, у которых было подтверждено наличие гена *SNCA* с мутацией A53T (5 самцов), и контрольных животных дикого типа (5 самцов) из тех же пометов. Животных для исследования выбрали случайным образом из четырех пометов. Исследования головного мозга проводили после интракардиальной перфузии.

Интракардиальную перфузию для фиксации ткани головного мозга производили, как описано ранее (Рожкова и др., 2023). Мышей наркотизировали путем введения внутривенно медетомидина гидрохлорида (Медитин, 0.01 мг/кг; «АПИ-САН», Россия) и через 10 мин – золетил (Zoletil, 50 мг/кг; Virbac, Франция). После этого животным проводили перфузию, вводя в кровеносную систему сначала 15 мл фосфатно-солевого буфера (PBS), а затем 15 мл 10 % раствора формалина. Мозг извлекали и помещали в 30 % раствор сахарозы в PBS с добавлением 5 мл 10 % формалина для обезвоживания и последующей фиксации и хранили при +4 °C в течение следующих двух недель, пока материал не опустится на дно пробирки. Затем образцы мозга погружали в Tissue-Tek O.C.T. (Sakura Finetek, США), после чего замораживали и хранили при –70 °C в горизонтальном низкотемпературном морозильнике MDF-594 (Sanyo, Япония).

Приготовление замороженных срезов мозга. Согласно атласу G. Paxinos и K. Franklin (2012) были изготовлены замороженные срезы ЧС (substantia nigra, SNC), которая была идентифицирована на расстоянии –3.08...–3.52 мм от брегмы. Срезы толщиной 10 мкм готовили на криотоме HM550 OP (Thermo Fisher Scientific, США) при –25 °C и помещали на предметные стекла с адгезивным покрытием PCI со шлифованной кромкой и колорированным краем (CITOTEST, Китай).

Иммуногистохимический анализ. Окрашивание образцов выполняли в соответствии с протоколами производителей наборов антител. Перед процедурой окрашивания срезы обезвоживали с последующей регидратацией

в течение 5 мин в PBS. После этого проводили демаскировку антигенов, индуцированную нагреванием, в 10 мМ щелочном цитратном буфере (pH = 9) при +95 °C на водяной бане TW-2.02 (Elmi, Латвия) в течение 15 мин. Затем срезы извлекали из буфера и охлаждали до комнатной температуры. После этого образцы трижды промывали в буферном растворе PBS-Tween: PBS с добавлением 0.1 % Tween-20 (P9416-100 мл; Sigma-Aldrich, США) в течение 15 мин. Далее каждый срез покрывали буфером Protein Block (ab64226; Abcam, Великобритания) на 30 мин с последующим удалением избытка жидкости в соответствии с рекомендациями производителя.

После процедуры промывания и воздействия буфером Protein Block добавляли 50 мкл первичного антитела и оставляли на ночь при температуре +4 °C во влажной темной камере. Используемая концентрация антител составляла 1:450 для анти-тирозингидроксилазы (tyrosine hydroxylase, TH) anti-TH (ab6211; Abcam). Для определения альфа-синуклеина добавляли 50 мкл первичного антитела alpha-Synuclein Antibody (NB110-61645, dilution, Novus Biologicals, Littleton, CO, США) в концентрации 1:600 и оставляли на 36 ч при температуре +4 °C во влажной темной камере. Затем срезы промывали в буфере PBS-Tween в течение 15 мин, удаляли избыток жидкости, добавляли 50 мкл вторичного антитела Goat Anti-Rabbit IgG H&L AF488 (ab150077; Abcam) в концентрации 1:700, а потом оставляли во влажной темной камере на 2 ч при температуре +4 °C. Далее образцы промывали в буферном растворе PBS-Tween в течение 15 мин, удаляли избыток жидкости и помещали образцы в среду ProLong, Glass Antifade Mountant (Thermo P36982; Thermo Fisher Scientific). При оценке плотности альфа-синуклеина в нейронах с целью идентификации нейронов к срезам дополнительно добавляли 80 мкл DAPI (Maric et al., 2021) в течение 15 мин и затем дважды промывали PBS в течение 3 мин. После добавления антител срезы помещали в темную влажную камеру.

Анализ плотности нейронов. Оценку плотности нейронов, меченных антителами, проводили с помощью микроскопа Axio Imager.M2 (Carl Zeiss, Германия) с камерой Zeiss AxioCam 506 mono (Carl Zeiss). Число меченых нейронов подсчитывали с использованием программного обеспечения ImageJ (National Institutes of Health, США). Плотность нейронов рассчитывали как число нейронов на объем (мм^3), как описано ранее (Рожкова и др., 2023).

Статистический анализ. Анализ результатов выполняли с использованием программного пакета STATISTICA v. 12.0 (StatSoft, Inc., США). Данные представлены как медиана (Me) с первым (q1) и третьим (q3) квартилями – Me [Q1;Q3]. Поведенческие данные (медиана трех сессий) и плотность нейронов сравнивали с помощью U-критерия Манна–Уитни. Уровень значимости считали при $p < 0.05$.

Результаты

Данные теста РР представлены на рис. 1. Статистический анализ с применением критерия Манна–Уитни не показал отличий по латентному времени на момент падения животного у линии B6.Cg-Tg по сравнению с сибсами дикого типа. Результаты по плотности нейронов, меченных антителами против TH в ЧС (SNC), показаны

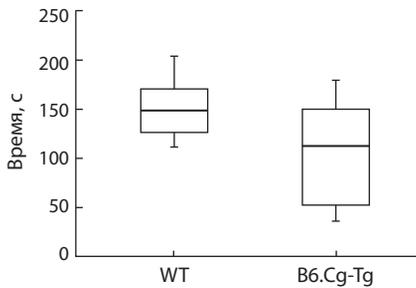


Рис. 1. Латентное время до падения в тесте РР самцов шибсов мышей дикого типа (wild type, WT) и B6.Cg-Tg в возрасте шести месяцев.

на рис. 2. Статистический анализ выявил, что мыши B6.Cg-Tg имеют более низкую плотность дофаминовых нейронов ($p < 0.05$) по сравнению с диким типом (0.92×10^5 [0.86×10^5 ; 0.93×10^5] против 1.25×10^5 [1.00×10^5 ; 1.26×10^5]). Данные по плотности нейронов с альфа-синуклеином в ЧС приведены на рис. 3. Статистический анализ показал увеличение числа нейронов с альфа-синуклеином в ЧС ($p < 0.01$) у мышей B6.Cg-Tg по сравнению с диким типом (0.55×10^5 [0.53×10^5 ; 0.56×10^5] против 0.29×10^5 [0.23×10^5 ; 0.31×10^5]).

Обсуждение

Тест РР часто применяют для оценки локомоторной активности и общей двигательной функции у мышей с нейродегенеративными расстройствами (Graham, Sidhu, 2010; Oaks et al., 2013; Seo et al., 2020). Поскольку изменение двигательной активности у мышей с мутацией A53T начинает проявляться в

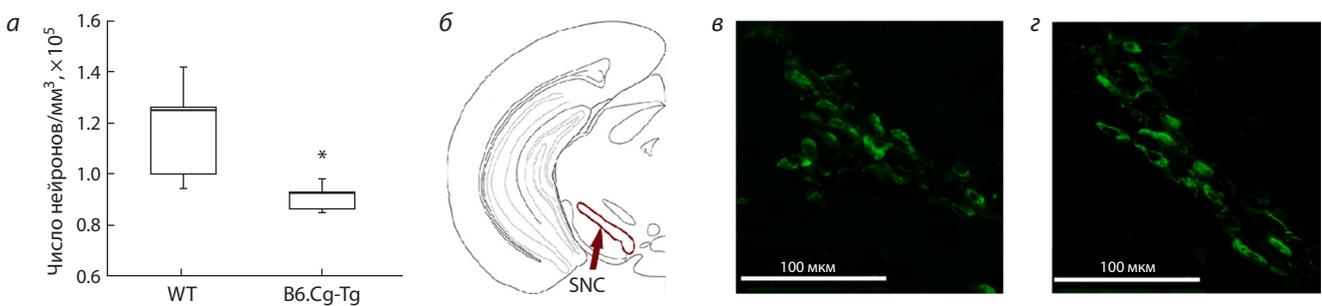


Рис. 2. Плотность дофаминергических нейронов в черной субстанции (substantia nigra – SNC), нейроны мечены антителами против тирозин-гидроксилазы (tyrosine hydroxylase, TH).

а – число нейронов в 1 мм^3 (* $p < 0.05$); б – схематическое обозначение исследуемой области в головном мозге. Микрофотографии срезов в данной области: в – дикий тип (wild type, WT); з – B6.Cg-Tg.

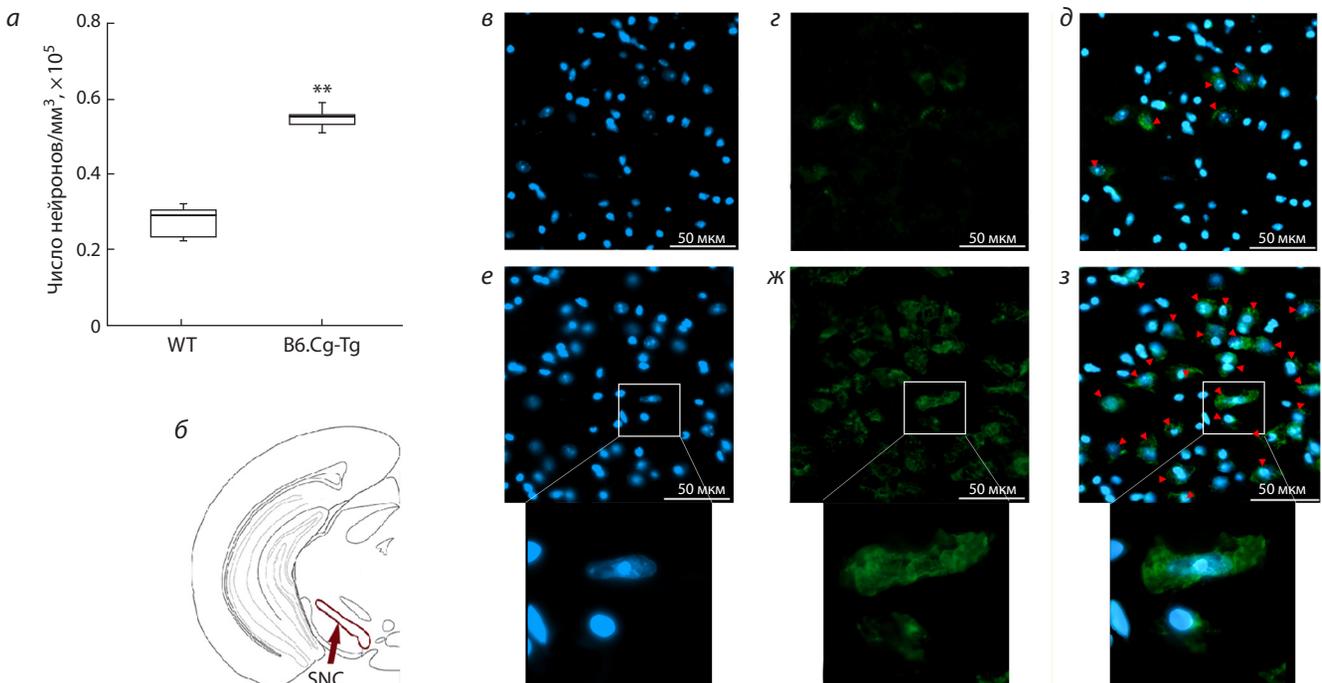


Рис. 3. Плотность нейронов с альфа-синуклеином в черной субстанции (substantia nigra – SNC), нейроны мечены антителами против альфа-синуклеина, ядра нейронов окрашены DAPI.

а – число нейронов в 1 мм^3 (** $p < 0.01$); б – схематическое обозначение исследуемой области в головном мозге. Микрофотографии срезов мозга данной области: в–д – WT; е–з – B6.Cg-Tg; в, е – DAPI; ж, з – альфа-синуклеина; д, з – совмещенные изображения. Наконечники стрелок указывают на нейроны с включениями альфа-синуклеина. Белые боксы выделяют область, показанную при большем увеличении.

возрасте от 2 до 12 месяцев, что связано с повышением накопления альфа-синуклеина в нейронах головного мозга (Unger et al., 2006; Graham, Sidhu, 2010; Wang et al., 2022), то считается, что поведенческое тестирование желательно осуществлять именно в этот период (Zhang et al., 2019). В работе на мышах A53T-a-Syn в разном возрасте проводили девять сессий теста РР в течение трех дней и рассчитывали средние значения (Oaks et al., 2013). После сравнения полученных величин было показано, что координация движений у мышей A53T-a-Syn была хуже, чем у контрольных животных, уже в возрасте 2 и 4 месяцев (Oaks et al., 2013).

Сходные результаты были получены у двухмесячных мышей других трансгенных линий с геном *SNCA* и мутацией A53T при применении теста РР (Zhang et al., 2019), однако с возрастом у этих животных происходили выравнивание и даже инверсия этого показателя (Graham, Sidhu, 2010). В настоящем исследовании, как и в опубликованной ранее работе J.H. Seo с коллегами (2020), не обнаружено различий по координации движений и их баланса между мышами B6.Cg-Tg и сибсами дикого типа в тесте РР с ускорением в возрасте шести месяцев. Действительно, в зависимости от линии мышей, моделирующих БП, изменения локомоторной активности могут как проявляться в более раннем возрасте (Oaks et al., 2013; Zhang et al., 2019), так и возникать только у стареющих особей (Graham, Sidhu, 2010; Seo et al., 2020). Как показали полученные нами данные, на ранних этапах развития патологии у мышей линии B6.Cg-Tg нарушений моторных функций не наблюдается, что указывает на сходство с данной патологией у человека, поскольку у людей с БП двигательные расстройства возникают ближе к старости, когда патология начинает прогрессировать (Halliday et al., 2006).

Известно, что при БП появляются нарушения в nigrostriарном пути (Dickson et al., 2009; Beitz, 2014; Hayes, 2019). Патология структур данной системы головного мозга выступает в качестве важного маркера БП как у человека, так и у животных, моделирующих данное заболевание (Kato, Kimura, 1992; Unger et al., 2006; Beitz, 2014; Taguchi et al., 2020). В нашей предыдущей работе установлено снижение общего числа нейронов в ЧС у самцов линии B6.Cg-Tg (Рожкова и др., 2023). В настоящем исследовании у этих мышей было обнаружено меньше дофаминовых нейронов в этой области по сравнению с сибсами дикого типа. Ранее на модели БП, а именно на мышах линии BAC-SNCA^{A53T/-}, было показано уменьшение числа TH-позитивных нейронов в ЧС (Taguchi et al., 2020). Кроме того, у мышей линии A53T-Tg наблюдали снижение ответной реакции при попытках терапевтического воздействия дофамином (Unger et al., 2006). Известно, что дофаминовые нейроны ЧС участвуют в регуляции двигательной активности (Schultz et al., 1983). Между тем в нашем исследовании у мышей линии B6.Cg-Tg в возрасте шести месяцев не обнаружено двигательных расстройств, однако двигательные нарушения могут проявиться в более позднем возрасте (Chia et al., 2020).

В настоящей работе выявлено большее число нейронов с альфа-синуклеином в ЧС у мышей B6.Cg-Tg по сравнению с сибсами дикого типа, что также характерно для БП

человека (Dickson, 2018; Bae et al., 2021). Данная особенность характерна для различных линий мышей, которых используют в качестве моделей БП (Van der Putten et al., 2000; Taguchi et al., 2020; Wang et al., 2022). В частности, подобный результат получен на мышах некоторых линий с трансгеном *SNCA* и мутацией A53T, у которых в ЧС было обнаружено больше олигомеров альфа-синуклеина начиная с возраста трех месяцев (Taguchi et al., 2020; Wang et al., 2022). Было продемонстрировано, что у мышей Pitx3-A53Ta-Syn в возрасте от 6 до 18 месяцев накопление альфа-синуклеина в ЧС повышается по сравнению с контролем C57BL, что сопровождается значительной дегенерацией парвальбумин-положительных нейронов (Zheng et al., 2022). Кроме того, была обнаружена связь между наличием включений альфа-синуклеина в нейронах и их гибелью (Kalia et al., 2013).

Существуют токсичные олигомеры альфа-синуклеина, способствующие изменению экспрессии белков в клетке, а также нарушению работы эндоплазматического ретикулума (Kalia et al., 2013). Вероятнее всего, важно накопление именно мутантного альфа-синуклеина в нейронах головного мозга, что приводит к симптомам БП, так как именно мутантные формы альфа-синуклеина как с мутацией A53T, так и с мутацией A30P становятся менее растворимыми (Григорян, Базян, 2007). Наше исследование показало, что увеличение числа нейронов с альфа-синуклеином в ЧС у мышей B6.Cg-Tg имеет место уже в возрасте шести месяцев.

Заключение

В этом исследовании охарактеризована линия мышей B6.Cg-Tg(Prnp-SNCA*A53T)23Mkle/J в возрасте шести месяцев по таким важным для проявления БП маркерам, как координация движений и баланс тела, а также плотности дофаминовых нейронов и нейронов с альфа-синуклеином в черной субстанции. Мыши линии B6.Cg-Tg в возрасте шести месяцев имеют некоторые симптомы начала развития БП, такие как накопление мутантного альфа-синуклеина и уменьшение числа дофаминовых нейронов в черной субстанции головного мозга. Полученные данные позволяют рассматривать мышей линии B6.Cg-Tg в возрасте шести месяцев в качестве адекватной модели для изучения ранней стадии БП человека.

Список литературы / References

- Григорян Г.А., Базян А.С. Экспериментальные модели болезни Паркинсона на животных. *Успехи физиол. наук.* 2007;38:80-88 [Grigoryan G.A., Bazyan A.S. The experimental models of Parkinson's disease in animals. *Uspekhi Fiziologicheskikh Nauk = Progress in Physiological Science.* 2007;38:80-88 (in Russian)]
- Рожкова И.Н., Окотруб С.В., Брусенцев Е.Ю., Рахманова Т.А., Лебедева Д.А., Козенева В.С., Хоцкий Н.В., Амстиславский С.Я. Анализ поведения и плотности нейронов в головном мозге мышей B6.Cg-Tg(Prnp-SNCA*A53T)23Mkle/J – модели болезни Паркинсона. *Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова.* 2023;109:1199-1216. DOI 10.31857/S0869813923090091
- [Rozhkova I.N., Okotrub S.V., Brusentsev E.Yu., Rakhmanova T.A., Lebedeva D.A., Kozeneva V.S., Khotkin N.V., Amstislavsky S.Ya. Analysis of behavior and brain neuronal density in B6.Cg-Tg(Prnp-SNCA*A53T)23Mkle/J mice modeling, a Parkinson's disease. *Ros-*

- siyskiy *Fiziologicheskii Zhurnal imeni I.M. Sechenova = Russian Journal of Physiology*. 2023;59:1633-1647. DOI 10.31857/S0869813923090091 (in Russian)]
- Bae Y.J., Kim J.M., Sohn C.H., Choi J.H., Choi B.S., Song Y.S., Nam Y., Cho S.J., Jeon B., Kim J.H. Imaging the substantia nigra in Parkinson disease and other Parkinsonian syndromes. *Radiology*. 2021;300:260-278. DOI 10.1148/radiol.2021203341
- Beitz J.M. Parkinson's disease: a review. *Front. Biosci. (Schol. Ed.)*. 2014;6:65-74. DOI 10.2741/S415
- Bidesi N.S., Vang Andersen I., Windhorst A.D., Shalgunov V., Herth M.M. The role of neuroimaging in Parkinson's disease. *J. Neurochem*. 2021;159:660-689. DOI 10.1111/jnc.15516
- Burre J., Sharma M., Sudhof T.C. Cell biology and pathophysiology of α -synuclein. *Cold. Spring. Harb. Perspect. Med*. 2018;8:a024091. DOI 10.1101/cshperspect.a024091
- Case L.K., Del Rio R., Bonney E.A., Zachary J.F., Blankenhorn E.P., Tung K.S., Teuscher C. The postnatal maternal environment affects autoimmune disease susceptibility in A/J mice. *Cell Immunol*. 2010; 260:119-127. DOI 10.1016/j.cellimm.2009.10.002
- Chen D., Liu Y., Shu G., Chen C., Sullivan D.A., Kam W.R., Hann S., Fowler M., Warman M.L. Ocular manifestations of chordin-like 1 knockout mice. *Cornea*. 2020;39:1145-1150. DOI 10.1097/ICO.0000000000002371
- Chia S.J., Tan E.K., Chao Y.X. Historical perspective: models of Parkinson's disease. *Int. J. Mol. Sci*. 2020;21:2464. DOI 10.3390/ijms21072464
- Crabtree D.M., Zhang J. Genetically engineered mouse models of Parkinson's disease. *Brain Res. Bull*. 2012;88:13-32. DOI 10.1016/j.brainresbull.2011.07.019
- Deutch A.Y. Striatal plasticity in parkinsonism: dystrophic changes in medium spiny neurons and progression in Parkinson's disease. *J. Neural Transm. Suppl*. 2006;70:67. DOI 10.1007/978-3-211-45295-0_12
- Dickson D.W. Neuropathology of Parkinson disease. *Parkinsonism Relat. Disord*. 2018;46:S30-S33. DOI 10.1016/j.parkreldis.2017.07.033
- Dickson D.W., Braak H., Duda J.E., Duyckaerts C., Gasser T., Halliday G.M., Hardy J., Leverenz J.B., Del Tredici K., Wszolek Z.K., Litvan I. Neuropathological assessment of Parkinson's disease: refining the diagnostic criteria. *Lancet Neurol*. 2009;8:1150-1157. DOI 10.1016/S1474-4422(09)70238-8
- Graham D.R., Sidhu A. Mice expressing the A53T mutant form of human alpha-synuclein exhibit hyperactivity and reduced anxiety-like behavior. *J. Neurosci. Res*. 2010;88:1777-1183. DOI 10.1002/jnr.22331
- Halliday G.M., Del Tredici K., Braak H. Critical appraisal of brain pathology staging related to presymptomatic and symptomatic cases of sporadic Parkinson's disease. *J. Neural Transm. Suppl*. 2006;70:99. DOI 10.1007/978-3-211-45295-0_16
- Hayes M.T. Parkinson's disease and parkinsonism. *Am. J. Med*. 2019; 132:802-807. DOI 10.1016/j.amjmed.2019.03.001
- Holmdahl R., Malissen B. The need for littermate controls. *Eur. J. Immunol*. 2012;42:45-47. DOI 10.1002/eji.201142048
- Jellinger K.A. Pathology of Parkinson's disease. *Mol. Chem. Neuro-path*. 1991;14:153-197. DOI 10.1007/bf03159935
- Kalia L.V., Kalia S.K., McLean P.J., Lozano A.M., Lang A.E. α -Synuclein oligomers and clinical implications for Parkinson disease. *Ann. Neurol*. 2013;73:155-169. DOI 10.1002/ana.23746
- Kato M., Kimura M. Effects of reversible blockade of basal ganglia on a voluntary arm movement. *J. Neurophysiol*. 1992;68:1516-1534. DOI 10.1152/jn.1992.68.5.1516
- Korchounov A., Meyer M.F., Krasnianski M. Postsynaptic nigrostriatal dopamine receptors and their role in movement regulation. *J. Neural Transm. (Vienna)*. 2010;117:1359-1369. DOI 10.1007/s00702-010-0454-z
- Korolenko T.A., Shintyapina A.B., Belichenko V.M., Pupyshv A.B., Akopyan A.A., Fedoseeva L.A., Russkikh G.S., Vavilin V.A., Teneditnik M.V., Lin C-L., Amstislavskaya T.G., Tikhonova M.A. Early Parkinson's disease-like pathology in a transgenic mouse model involves a decreased Cst3 mRNA expression but not neuroinflammatory response in the brain. *Med. Univer*. 2020;3:66-78. DOI 10.2478/medu-2020-0008
- Lai T.T., Kim Y.J., Nguyen P.T., Koh Y.H., Nguyen T.T., Ma H.I., Kim Y.E. Temporal evolution of inflammation and neurodegeneration with alpha-synuclein propagation in Parkinson's disease mouse model. *Fron. Int. Neurosci*. 2021;15:715190. DOI 10.3389/fnint.2021.715190
- Langley M.R., Ghaisas S., Palanisamy B.N., Ay M., Jin H., Anantharam V., Kanthasamy A., Kanthasamy A.G. Characterization of non-motor behavioral impairments and their neurochemical mechanisms in the MitoPark mouse model of progressive neurodegeneration in Parkinson's disease. *Exp. Neurol*. 2021;341:113716. DOI 10.1016/j.expneurol.2021.113716
- Lee F.J., Liu F., Pristupa Z.B., Niznik H.B. Direct binding and functional coupling of alpha-synuclein to the dopamine transporters accelerate dopamine-induced apoptosis. *FASEB J*. 2001;15:916-926. DOI 10.1096/fj.00-0334com
- Liu Q., Xu Y., Wan W., Ma Z. An unexpected improvement in spatial learning and memory ability in alpha-synuclein A53T transgenic mice. *J. Neural. Transm. (Vienna)*. 2018;125(2):203-210. DOI 10.1007/s00702-017-1819-3
- Maric D., Jahanipour J., Li X.R., Singh A., Mobiny A., Van Nguyen H., Sedlock A., Grama K., Roysam B. Whole-brain tissue mapping toolkit using large-scale highly multiplexed immunofluorescence imaging and deep neural networks. *Nat. Commun*. 2021;12:1550. DOI 10.1038/s41467-021-21735-x
- Nicholas L.M., Ozanne S.E. Early life programming in mice by maternal overnutrition: mechanistic insights and interventional approaches. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci*. 2019;374:20180116. DOI 10.1098/rstb.2018.0116
- Oaks A.W., Frankfurt M., Finkelstein D.I., Sidhu A. Age-dependent effects of A53T alpha-synuclein on behavior and dopaminergic function. *PLoS One*. 2013;8:e60378. DOI 10.1371/journal.pone.0060378
- Paumier K.L., Sukoff Rizzo S.J., Berger Z., Chen Y., Gonzales C., Kaftan E., Li L., Lotarski S., Monaghan M., Shen W., Stolyar P., Vasilyev D., Zaleska M., Hirst W.D., Dunlop J. Behavioral characterization of A53T mice reveals early and late stage deficits related to Parkinson's disease. *PLoS One*. 2013;8(8):e70274. DOI 10.1371/journal.pone.0070274
- Paxinos G., Franklin K. *Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*. 4th ed. San Diego: Acad. Press, 2012
- Poewe W., Seppi K., Tanner C.M., Halliday G.M., Brundin P., Volkmann J., Schrag A.E., Lang A.E. Parkinson disease. *Nat. Rev. Dis. Primers*. 2017;3:17013. DOI 10.1038/nrdp.2017.13
- Polymeropoulos M.H., Lavedan C., Leroy E., Ide S.E., Dehejia A., Dutra A., Pike B., Root H., Rubenstein J., Boyer R., Stenroos E.S., Chandrasekharappa S., Athanassiadou A., Papapetropoulos T., Johnson W.G., Lazzarini A.M., Duvoisin R.C., Di Iorio G., Golbe L.I., Nussbaum R.L. Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science*. 1997;276:2045-2047. DOI 10.1126/science.276.5321.2045
- Pupyshv A.B., Korolenko T.A., Akopyan A.A., Amstislavskaya T.G., Tikhonova M.A. Suppression of autophagy in the brain of transgenic mice with overexpression of A53T-mutant α -synuclein as an early event at synucleinopathy progression. *Neurosci. Lett*. 2018;672: 140-144. DOI 10.1016/j.neulet.2017.12.001
- Schultz W., Ruffieux A., Aebischer P. The activity of pars compacta neurons of the monkey substantia nigra in relation to motor activation. *Exp. Brain Res*. 1983;51:377-387. DOI 10.1016/0304-3940(84)90456-7
- Seo J.H., Kang S.W., Kim K., Wi S., Lee J.W., Cho S.R. Environmental enrichment attenuates oxidative stress and alters detoxifying enzymes in an A53T α -synuclein transgenic mouse model of Par-

- kinson's disease. *Antioxidants (Basel)*. 2020;9:928. DOI 10.3390/antiox9100928
- Spillantini M.G., Schmidt M.L., Lee V.M., Trojanowski J.Q., Jakes R., Goedert M. Alpha-synuclein in Lewy bodies. *Nature*. 1997;388:839-840. DOI 10.1038/42166
- Stern G. The effects of lesions in the substantia nigra. *Brain*. 1966;89:449-478. DOI 10.1093/brain/89.3.449
- Taguchi T., Ikuno M., Hondo M., Parajuli L.K., Taguchi K., Ueda J., Sawamura M., Okuda S., Nakanishi E., Hara J., Uemura N., Hatanaka Y., Ayaki T., Matsuzawa S., Tanaka M., El-Agnaf O.M.A., Koike M., Yanagisawa M., Uemura M.T., Yamakado H., Takahashi R. α -Synuclein BAC transgenic mice exhibit RBD-like behaviour and hyposmia: a prodromal Parkinson's disease model. *Brain*. 2020;143:249-265. DOI 10.1093/brain/awz380
- Tang H., Gao Y., Zhang Q., Nie K., Zhu R., Gao L., Feng S., Wang L., Zhao J., Huang Z., Zhang Y., Wang L. Chronic cerebral hypoperfusion independently exacerbates cognitive impairment within the pathogenesis of Parkinson's disease via microvascular pathologies. *Behav. Brain Res.* 2017;333:286-294. DOI 10.1016/j.bbr.2017.05.061
- Tikhonova M.A., Tikhonova N.G., Tenditnik M.V., Ovsyukova M.V., Akopyan A.A., Dubrovina N.I., Amstislavskaya T.G., Khlestkina E.K. Effects of grape polyphenols on the life span and neuroinflammatory alterations related to neurodegenerative Parkinson disease-like disturbances in mice. *Molecules*. 2020;25:5339. DOI 10.3390/molecules25225339
- Tran J., Anastacio H., Bardy C. Genetic predispositions of Parkinson's disease revealed in patient-derived brain cells. *NPJ Parkinsons Dis.* 2020;6:8. DOI 10.1038/s41531-020-0110-8
- Unger E.L., Eve D.J., Perez X.A., Reichenbach D.K., Xu Y., Lee M.K., Andrews A.M. Locomotor hyperactivity and alterations in dopamine neurotransmission are associated with overexpression of A53T mutant human alpha-synuclein in mice. *Neurobiol. Dis.* 2006;21:431-443. DOI 10.1016/j.nbd.2005.08.005
- Van der Putten H., Wiederhold K.H., Probst A., Barbieri S., Mistl C., Danner S., Kauffmann S., Hofele K., Spooren W.P., Ruegg M.A., Lin S., Caroni P., Sommer B., Tolnay M., Bilbe G. Neuropathology in mice expressing human alpha-synuclein. *J. Neurosci.* 2000;20:6021-6029. DOI 10.1523/JNEUROSCI.20-16-06021.2000
- Venda L., Cragg S., Buchman V.L., Wade-Martins R. α -Synuclein and dopamine at the crossroads of Parkinson's disease. *Trends Neurosci.* 2010;12:559-568. DOI 10.1016/j.tins.2010.09.004
- Wang Y., Sun Z., Du S., Wei H., Li X., Li X., Shen J., Chen X., Cai Z. The increase of α -synuclein and alterations of dynein in A53T transgenic and aging mouse. *J. Clin. Neurosci.* 2022;96:154-162. DOI 10.1016/j.jocn.2021.11.002
- Wu D., Dean J. Maternal factors regulating preimplantation development in mice. *Curr. Top. Dev. Biol.* 2020;140:317-340. DOI 10.1016/bs.ctdb.2019.10.006
- Zhang Yu., Wu Q., Zhang L., Wang Q., Yang Z., Liu J., Feng L. Caffeic acid reduces A53T α -synuclein by activating JNK/Bcl-2-mediated autophagy *in vitro* and improves behaviour and protects dopaminergic neurons in a mouse model of Parkinson's disease. *Pharmacol. Res.* 2019;150:104538. DOI 10.1016/j.phrs.2019.104538
- Zhang Yu., Wu Q., Ren Y., Zhang Y., Feng L. A53T α -synuclein induces neurogenesis impairment and cognitive dysfunction in line M83 transgenic mice and reduces the proliferation of embryonic neural stem cells. *Brain Res. Bull.* 2022;182:118-129. DOI 10.1016/j.brainresbull.2022.02.010
- Zheng M., Liu Y., Xiao Z., Jiao L., Lin X. Tau knockout and α -synuclein A53T synergy modulated parvalbumin-positive neurons degeneration staging in substantia nigra pars reticulata of Parkinson's disease-like model. *Front. Aging Neurosci.* 2022;13:784665. DOI 10.3389/fnagi.2021.784665

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 12.02.2024. После доработки 29.07.2024. Принята к публикации 02.08.2024.