

УДК 577.2+577.29

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ НЕЙРОТОКСИЧЕСКОГО ЭФФЕКТА МФТП У МЫШЕЙ С КОНСТИТУТИВНЫМ НОКАУТОМ ГЕНА АЛЬФА-СИНУКЛЕИНА

© 2021 г. К. Д. Чапров^{a, *}, Е. В. Тетерина^a, А. Ю. Роман^a, Т. А. Иванова^a, В. В. Голоборщева^b, В. Г. Кучеряну^b, С. Г. Морозов^b, Е. А. Лыскова^a, О. А. Лыткина^a, И. В. Королева^a, Н. Я. Попова^c, А. И. Антохин^c, Р. К. Овчинников^{a, c}, М. С. Кухарский^{a, c}

^aИнститут физиологически активных веществ Российской академии наук, Черноголовка, 142432 Россия

^bНаучно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии, Москва, 125315 Россия

^cРоссийский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова Минздрава России, Москва, 117997 Россия

*e-mail: chaprov@ipac.ac.ru

Поступила в редакцию 08.07.2020 г.

После доработки 23.08.2020 г.

Принята к публикации 30.08.2020 г.

Агрегированные формы белка альфа-синуклеина являются структурообразующим компонентом патогистологических включений — телец Леви, в нейронах черной субстанции при болезни Паркинсона. С целью изучения роли альфа-синуклеина в избирательном поражении дофаминергических нейронов черной субстанции при болезни Паркинсона используют линии мышей с нокаутом этого гена. Новая линия мышей с конститутивным нокаутом гена альфа-синуклеина — delta flox KO, которая моделирует конечную форму генетического нокаута после прижизненной делеции гена альфа-синуклеина у мышей с регулируемым нокаутом, не содержит в модифицированном геномном локусе посторонних последовательностей, что отличает ее от всех других линий с нокаутом альфа-синуклеина. Нами проведен сравнительный анализ влияния нейротоксина 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридина (МФТП), используемого для моделирования болезни Паркинсона, на мышей delta flox KO и на хорошо изученную линию с нокаутом гена альфа-синуклеина — AbKO. Показано, что введение МФТП по субхроническому протоколу, позволяющему моделировать ранние стадии болезни Паркинсона, приводило к снижению уровня дофамина и изменению соотношения его метаболитов в стриатуме мышей delta flox KO до такого же уровня, как у мышей AbKO и контрольных животных дикого типа. На фоне отсутствия выраженных двигательных расстройств у мышей, обработанных МФТП, в установке CatWalk XT (“Noldus”) выявлены идентичные нарушения походки у животных обеих линий и у контрольных мышей дикого типа. Полученные данные указывают на то, что нейротоксическое поражение дофаминергических нейронов delta flox KO и AbKO развивается по сходному механизму.

Ключевые слова: болезнь Паркинсона, альфа-синуклеин, генетический нокаут, дофамин, МФТП

DOI: 10.31857/S0026898421010031

ВВЕДЕНИЕ

Нарушениям структуры и функции белка альфа-синуклеина отводится важная роль в патогенезе болезни Паркинсона (БП) [1]. Выявление агрегированного альфа-синуклеина в составе телец Леви — патогистологических структурах в дофаминергических (ДА) нейронах черной субстанции (ЧС) при БП [1, 2], положило начало активному изучению функций этого белка и механизмов нарушений структуры, экспрессии и внутринейронной компартиментализации альфа-

синуклеина, которые вызывают его агрегацию и формирование патогенных включений [3, 4]. Повышение концентрации альфа-синуклеина в цитоплазме ДА-нейронов, в первую очередь в составе растворимых промежуточных продуктов белковой агрегации, таких как олигомеры и протофибриллы, токсично для клеток и постепенно приводит к их гибели [5–9]. Агрегация белка и перевод его в нерастворимые депозиты позволяет снизить концентрацию токсичных форм альфа-синуклеина в цитоплазме и служит меха-

Сокращения: БП — болезнь Паркинсона; ДА — дофаминергические нейроны, ЧС — черная субстанция; МФТП — 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридин.

низмом защиты долгоживущих нейронов. С другой стороны, продолжающиеся исследования показали, что агрегация новосинтезированного альфа-синуклеина и его накопление в составе цитоплазматических и аксональных включений сопровождается понижением концентрации функционального мономерного альфа-синуклеина в пресинаптических окончаниях [10]. При этом недостаточность функционального альфа-синуклеина наиболее выражена именно в пресинаптических окончаниях тех нейронов, которые наиболее эффективно нейтрализуют высокотоксичные, растворимые, промежуточные продукты агрегации альфа-синуклеина, ускоряя их перевод в менее токсичные фибриллярные формы и образуя характерные патогистологические включения [11, 12].

Альфа-синуклеин в норме является пресинаптическим белком, он выполняет важную функцию в регуляции нейротрансмиссии, участвуя в сборке SNARE-комплексов в синапсах [13], в формировании и перераспределении пулов синаптических везикул [14, 15], расширении поглощающих мембранных пор [16], в высвобождении и захвате дофамина синаптическими везикулами [17, 18] и во многих других процессах. Результаты многочисленных исследований показали, что дефицит функционального альфа-синуклеина в синапсах ДА-нейронов снижает эффективность процессов трансмиссии дофамина и таким образом участвует в развитии дисфункции нигростриарной системы, поражение которой считается главным патологическим признаком БП [12, 19–21]. Альфа-синуклеин вовлечен и в механизмы формирования популяций ДА-нейронов в период онтогенетического развития [22]. Причем в развивающемся мозге мышей наибольший модулирующий эффект этот белок оказывает именно на ДА-нейроны ЧС и практически не участвует в процессах формирования популяции ДА-нейронов соседней анатомической структуры в среднем мозге – вентральной области покрышки, которая гораздо меньше подвержена дегенеративным процессам при БП [23]. Однако несмотря на многочисленные исследования, непосредственная роль альфа-синуклеина в механизмах избирательного поражения ДА-нейронов при БП не изучена. Недостаточность функции альфа-синуклеина активно изучается *in vivo* на генетически модифицированных животных, в первую очередь, на линиях мышей с нокаутом гена альфа-синуклеина [24–27]. Для моделирования специфического поражения ДА-нейронов и паркинсонического синдрома часто применяют нейротоксин 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридин (МФТП) – липофильное соединение, способное эффективно преодолевать гематоэнцефалический барьер. МФТП – один из токсинов, наиболее часто используемых при моделировании экспериментального паркинсонического синдрома у живот-

ных. После системного введения МФТП попадает в астроциты, где окисляется с участием моноаминоксидазы Б и превращается в сильнодействующий дофаминергический нейротоксин 1-метил-4-фенилпиридилий (МФП⁺) [28, 29], токсический метаболит, который, в силу своей структурной схожести с молекулой дофамина, абсорбируется ДА-нейронами с помощью дофаминергического транспортера (DAT) [30–32]. Это приводит к прогрессивной потере ДА-нейронов ЧС и снижению уровня дофамина в стриатуме, где располагаются синапсы ДА-нейронов [33–35]. Ранее было показано, что у мышей с нокаутом гена альфа-синуклеина изменена чувствительность ДА-нейронов ЧС к МФТП. Интересно, что в отсутствие альфа-синуклеина нейроны становятся резистентными к МФТП, а не более чувствительными к этому нейротоксину, как предполагалось. Такие выводы сделаны на основании результатов морфометрического подсчета числа клеток, окрашиваемых антителами против тирозингидроксилазы, в ЧС, где располагаются тела ДА-нейронов [19, 36, 37]. Ингибирование комплекса I дыхательной цепи митохондрий вызывает стремительное понижение концентрации АТФ в стриатуме и ЧС, после чего ДА-нейроны подвергаются апоптозу и некрозу [38, 39]. Для развития клинической картины паркинсонического синдрома у экспериментальных животных обычно применяют хроническое или субхроническое введение МФТП. Важная особенность этой модели, отличающая ее от других токсикологических моделей нейродегенеративных патологий [40–42] – топографическое соответствие потери нейронов в мозге экспериментальных мышей и у индивидов с БП [43]. Однако при этом у модельных мышей не формируются включения, подобные тельцам Леви, регистрируемые при БП [30]. Обработка МФТП мышей с нокаутом альфа-синуклеина вызывает гораздо менее выраженную потерю тел ДА-нейронов в ЧС, чем у контрольных животных дикого типа. Чем обусловлена повышенная устойчивость мышей с нокаутом гена альфа-синуклеина к нейротоксическому действию МФТП не установлено. При этом у животных с нокаутом наблюдается снижение уровня дофамина и изменение соотношения его метаболитов в стриатуме, что указывает на патологические изменения метаболизма дофамина в синапсах ДА-нейронов, которые располагаются в стриатуме [19, 36, 37]. Возможно, именно отсутствие альфа-синуклеина, на участие которого в регуляции нейротрансмиссии указывает целый ряд исследований [13–16], в частности, вовлеченность альфа-синуклеина в оптимизацию высвобождения и захвата дофамина синаптическими везикулами [17, 18] вносит определенный вклад в механизмы патологии ДА-синапсов, при которой дольше сохраняются тела нейронов. Однако существует и другая гипотеза, согласно которой

нарушение дофаминового статуса в синапсах ДА-нейронов при сохранении числа тел нейронов в ЧС может быть обусловлено влиянием не только гена альфа-синуклеина, но и других генов, чья экспрессия может меняться в результате генетических модификаций локуса при конструировании “нокаутных” животных. Наибольший скептицизм в интерпретации результатов с использованием мышей линий B6;129X1-Snca^{tm1Rosl}/J [AbKO] [25] и B6;129-Snca^{tm1Sud}/J [TaKO] [26] вызывает тот факт, что в результате модификаций локуса альфа-синуклеина в геном мышей этих линий были привнесены посторонние последовательности, в частности, бактериальный ген *neo* и активные эктопические промоторы, которые могли повлиять на регуляторные элементы других генов и модифицировать их экспрессию. Действительно, показано многократное повышение уровня экспрессии по крайней мере одного гена – мультимера 1 (*Mmrn-1*), в нервной системе мышей AbKO [44]. Для минимизации неспецифических эффектов модификаций локуса альфа-синуклеина создана линия мышей B6(Cg)-Snca^{tm1.2Vlb}/J [delta flox KO], из генома которой после проведенных манипуляций с локусом удалены все посторонние последовательности [45, 46]. Эту линию не использовали ранее для моделирования паркинсонического синдрома.

В представленной работе проведен сравнительный анализ нейротоксического эффекта МФТП в линии мышей delta flox KO с наиболее часто используемым генетическим нокаутом гена альфа-синуклеина – AbKO, и у животных с немодифицированным геномом.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Экспериментальные животные. Линия мышей C57BL/6 получена из питомника Charles River UK. Линия с конститутивным нокаутом гена альфа-синуклеина JAXMice 028559 B6(Cg)-Snca^{tm1.2Vlb}/J – Snca^{Δflox}, Snca delta flox, delta flox KO, Snca KO [27, 46], получена из лаборатории В.Л. Бухмана (Cardiff University, Великобритания). Линия JAXMice 003692 B6;129X1-Snca^{tm1Rosl}/J – AbKO, получена из лаборатории А. Rosenthal (University of California, США) [25]. Все мыши получены на генетическом фоне C57BL/6J. Колонии мышей (шесть групп по 12 самцов в каждой) содержали в условиях беспатогенного вивария при искусственно регулируемом 12-часовом цикле день/ночь и постоянной температуре 22°C. Контрольную группу формировали от общих гетерозиготных производителей.

Генотипирование мышей линии AbKO проводили, как описано у Abeliovich и соавт. [25] с использованием праймеров:

aS_ups: 5'-CAGCTCAAGTTCAGCCACGA-3';

AKoC2: 5'-AAGGAAAGCCGAGTGATGTAC-3';

NeoA: 5'-ATGGAAGGATTGGAGCTACG-3'.

Мышей линии delta flox KO генотипировали, как описано Ninkina и соавт. [27] с использованием праймеров:

A_Int1For: 5'-TGCTGGGCACAGTGTGATTG-3';

A_Int1Rev: 5'-AAAGGCTGGGCTTCAAGCAG-3';

Cre_rev: 5'-CATGAGTACTTGTGGCTCAC-3'.

Работы с животными проводили в соответствии с приказом Минздрава России от 01 апреля 2016 г. № 199н “Об утверждении Правил надлежащей лабораторной практики”.

Введение МФТП. Экспериментальным животным в возрасте 3 мес внутривенно вводили водный раствор МФТП (30 мг/кг в сутки, “Sigma-Aldrich”, США) последовательно в течение 5 дней. Контрольной группе вводили физраствор (0.9% NaCl) [47, 48].

Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ). Через 21 день после последней инъекции МФТП животных забивали дислокацией шейных позвонков, образцы дорсальных стриатумов извлекали на холоду, анализировали содержание дофамина и его метаболитов, как описано ранее [49]. С этой целью гомогенизировали по 6–12 стриатумов в 300 мкл 0.06 М HClO₄, центрифугировали при 15000 g в течение 5 мин при температуре 4°C. В осадках определяли концентрацию белка с помощью стандартного набора PierceTM BCA Protein Assay Kit (“Thermo ScientificTM”, США). Супернатант (50 мкл) наносили на откалываемую колонку с обращенной фазой 4.6 × 150 мм C18 Microsorb MVTM HPLC Column (“Varian Inc.”, США) и измеряли с помощью электрохимического детектора Decade II Electrochemical Detector (“Antec Scientific”, Нидерланды) с рабочим электродом из стеклоуглерода, настроенным на 0.7 В по отношению к Ag/AgCl электроду сравнения. Для измерения концентрации дофамина и его метаболитов в качестве подвижной фазы использовали раствор, состоящий из 12% (по объему) метанола, 0.1 М дигидрофосфата натрия, 2.4 мМ 1-октансульфонокислоты и 0.68 мМ EDTA, pH 3.1.

Поведенческое тестирование. Через 21 день после последней инъекции МФТП оценивали координацию движений и походку животных контрольных и экспериментальных групп.

Исследование координации движений. Животных помещали в центр квадратной сетки размером 30 × 30 см, состоящей из квадратов со стороной 5 мм и диаметром 0.5 мм. Регистровали время удержания животного на перевернутой сетке над толстым слоем подстила на высоте 55 см. Животные, падающие раньше максимального времени тестирования (60 с), получали еще две попытки с интервалом 10 мин. В анализ брали лучший

показатель из трех попыток [47–50]. Для анализа координации на вертикальном шесте животное помещали на верхнюю часть деревянного шеста высотой 50 см и диаметром 10 мм, регистрировали время спуска. В анализ брали наименьшее время из пяти попыток, выполненных с интервалом 5 мин [48, 50].

Исследование походки. Установка CatWalk XT (“Noldus”, Нидерланды) включает подъемный коридор длиной 1.3 м и шириной 5 см, обеспечивающий свободное перемещение животного. Основанием коридора служит стеклянная пластина, пронизанная зеленым лазером, раскрывающимся в точках соприкосновения лапы животного со стеклянной пластиной [51]. Тестируемое животное равномерно пробегало по пластине несколько раз, в центральной зоне коридора длиной 45 см с помощью высокоскоростной камеры регистрировали контакты конечности с пластиной, характеризующие форму соприкосновения, площадь контакта и интенсивность нажатия [52]. Каждое животное проходило коридор 3 раза с последующим анализом по протоколу, рекомендованному производителем CatWalk XT 10.6 (“Noldus”). При тестировании использовали следующие установочные параметры съемки: интенсивность зеленого света дорожки 16.5 В; усиление камеры 20 дБ; порог зеленой интенсивности 0.1; красный потолочный свет 17.7 В; мыши весом 25–38 г, согласно протоколу для анализа походки.

Статистическая обработка. Статистическую обработку проводили с помощью программы GraphPad Prism Software 8.0 (“GraphPad Software Inc”, США). Использовали однофакторный дисперсионный анализ (one-way ANOVA) с применением критерия множественных сравнений Тьюки. Различия по исследуемому признаку считали статистически значимыми при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В работе использовали полученные независимо в двух лабораториях линии мышей с нокаутом гена альфа-синуклеина (*Snca*). Модификации локуса альфа-синуклеина обозначены на рис. 1. В геноме мышей AbKO модификация локуса включает обширную делецию (3.2 т.п.н.) гена альфа-синуклеина, в том числе некодирующий экзон Ib и второй экзон, в котором располагается иницирующий (старт)-кодон [25]. При этом в область делеции введены последовательности, входящие в состав таргетного вектора, используемого при проведении гомологической рекомбинации в эмбриональных стволовых клетках и отборе рекомбинантных клонов на основе приобретенной устойчивости к антибиотику неомицину (G418). Эта техника модификации генома широко используется при получении животных с нокаутом нужного гена. Далее внесенные последовательно-

сти могут быть либо удалены, либо оставлены, если это не влияет на активность других генов в окружении модифицированного локуса. Фрагмент ДНК, встроенный в геном мышей AbKO (1.9 т.п.н.), содержал бактериальный ген *neo* под контролем функционального промотора гена фосфолицераткиназы мыши (*Pgk1*, без кодирующей части), помещенный эктопически в область второго интрона гена альфа-синуклеина (рис. 1). При этом промотор *Pgk1* ориентирован в направлении, противоположном направлению транскрипции гена альфа-синуклеина. В геноме мышей линии delta flox KO [27, 46] делеция участка гена альфа-синуклеина составляла 1.1 т.п.н, и включала второй экзон, в котором располагается старт-кодон (рис. 1). Небольшой фрагмент (34 п.н.), встроенный в модифицированный локус, является сайтом узнавания Cre-рекомбиназы – LoxP. LoxP.

Сформированы репрезентативные синхронизированные группы самцов ($n = 24$) двух генотипов с нокаутом и контрольных мышей дикого типа, после чего проведен дополнительный анализ модификаций локуса альфа-синуклеина с использованием соответствующих пар праймеров, как обозначено на рис. 1а. Праймеры подбирали таким образом, чтобы один располагался в делетируемой области и мог направлять амплификацию продукта только в присутствии аллеля дикого типа (рис. 1б). Так, в геномной ДНК мышей AbKO с делецией второго экзона гена альфа-синуклеина выявлен единственный фрагмент размером 450 п.н., в случае немодифицированного локуса (WT) фрагмент состоял из 520 п.н. У мышей линии delta flox KO на геномной ДНК с модифицированным локусом альфа-синуклеина амплифицировался фрагмент размером 280 п.н., а у контрольных животных дикого типа (WT) – фрагмент 354 п.н. (рис. 1б).

С целью изучения чувствительности к МФТП мышам в возрасте 10 недель (половина животных каждой из трех групп) ежедневно вводили МФТП в дозе 30 мг/кг веса в течение 5 дней, после чего следовал восстановительный период (21 день) для нивелирования прямого травматического токсического эффекта нейротоксина. После восстановительного периода у мышей сохранялись только долгосрочные изменения, связанные с необратимым поражением nigrostriарной системы. В данном субхроническом протоколе [47, 48] общая кумулятивная доза МФТП и метод введения подобраны таким образом, чтобы поражалась только часть дофаминергических нейронов ЧС. При этом функция погибших нейронов могла быть компенсирована. Для подтверждения эффективности компенсации на 20-й и 21-й дни после последней инъекции МФТП оценивали двигательную функцию мышей в экспериментальных и контрольных группах. В классических тестах, та-

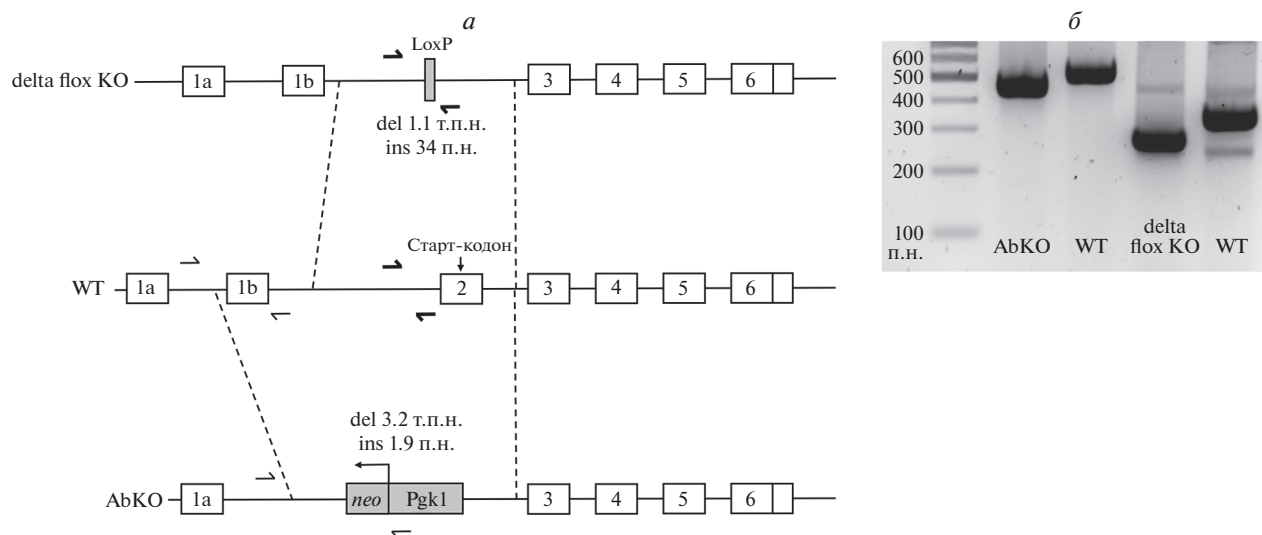


Рис. 1. Модификации локуса альфа-синуклеина в геноме двух линий мышей. *a* – Схема удаления экзона II, содержащего старт-кодон, в линиях B6;129X1-Snc^{tm1Ros1}/J [AbKO] и B6(Cg)-Snc^{tm1.2Vlb}/J [delta flox KO]. Стрелкой указано направление транскрипции гена *neo*. Положение праймеров для генотипирования обозначено полустрелками. Жирными полустрелками обозначены праймеры для анализа колонии delta flox KO, тонкими – колонии AbKO. *b* – Выявление модификаций локуса альфа-синуклеина методом ПЦР.

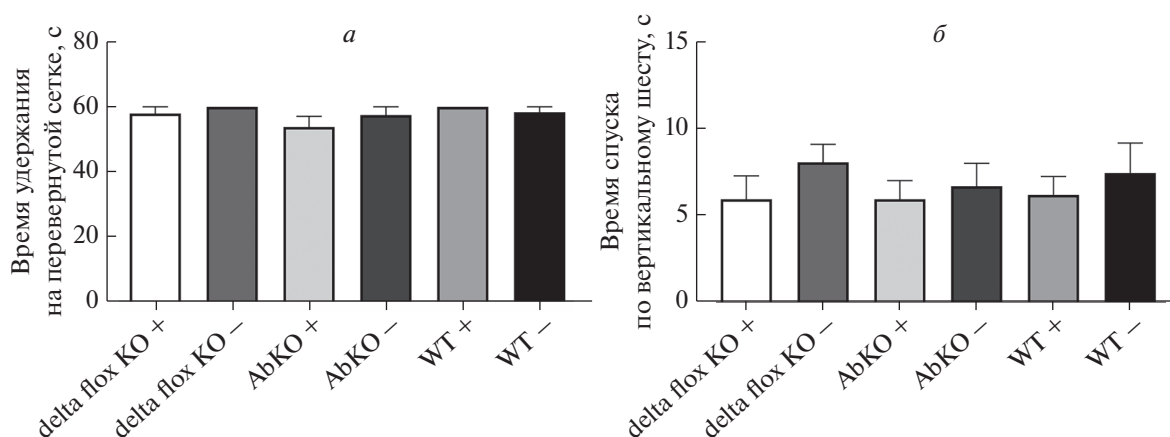


Рис. 2. Анализ двигательной функции мышей через 21 день после введения МФТП. *a* – Время удержания на перевернутой сетке. *b* – Время спуска по вертикальному шесту. Значения в группах рассчитывали по результатам трех независимых тестирований каждого животного. “+” – МФТП и “-” – Контроль. $M \pm SEM$, $n = 8$ в каждой из шести групп. Однофакторный дисперсионный анализ (one-way ANOVA) с применением критерия множественных сравнений Тьюки.

ких как способность удерживаться на перевернутой сетке и спускаться по вертикальному шесту, ни в одной из экспериментальных групп не выявлено статистически значимых отклонений от показателей у контрольных животных, не обработанных МФТП (рис. 2). Время, которое животные удерживались на перевернутой сетке, было близким ко времени тестирования (60 с) во всех группах (рис. 2*a*), что указывало на отсутствие существенных нарушений мышечной силы конечностей и координации движений. Анализ способности животных спускаться по вертикальному шесту также не выявил статистически значимых

различий между обработанными МФТП и контрольными животными. И хотя наблюдалась тенденция к увеличению общего времени спуска с шеста у животных, получавших МФТП (6.00 ± 1.10), различия в показателях не были статистически значимыми (рис. 2*b*).

Уровни дофамина и его метаболитов определяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) в тканях стриатума, поскольку в стриатуме располагаются синапсы ДАНейронов ЧС, и там осуществляется трансмиссия дофамина. Отдельно препарировали и анализи-

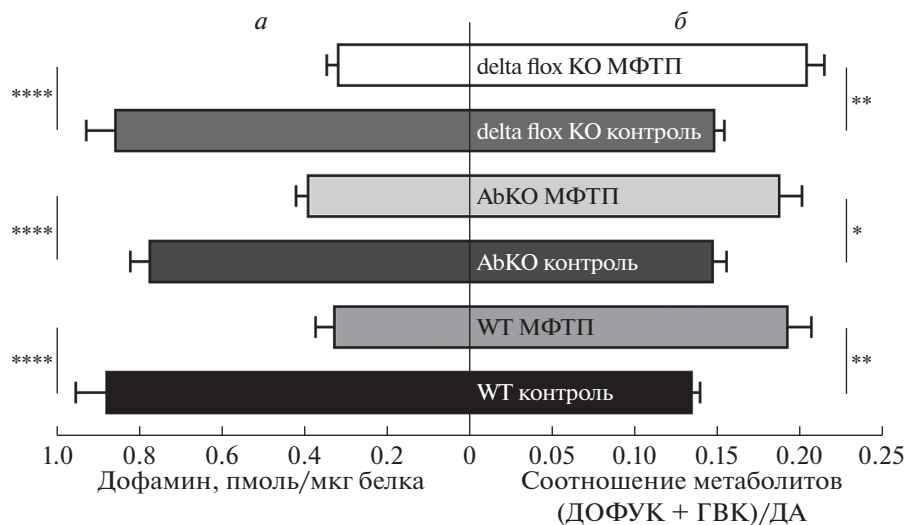


Рис. 3. ВЭЖХ-анализ уровней дофамина и его метаболитов в стриатуме мышей через 21 день после введения МФТП. *a* – Содержание дофамина в стриатуме мышей дикого типа (WT) и линий с нокаутом альфа-синуклеина – AbKO и delta Flox KO; *b* – соотношение общего содержания метаболитов дофамина 3,4-дигидроксифенилуксусной кислоты (ДОФУК) и гомованилиновой кислоты (ГВК) и уровня стриарного дофамина. $M \pm SEM$, $n = 8$ в каждой из шести групп; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; **** $p < 0.0001$. Однофакторный дисперсионный анализ (one-way ANOVA) с применением критерия множественных сравнений Тьюки.

ровали стриатумы из каждого полушария головного мозга, как описано ранее [49]. На рис. 3 представлены результаты измерения уровней стриарного дофамина и его метаболитов у мышей дикого типа и обеих линий с нокаутом альфа-синуклеина. Нами выявлено статистически значимое снижение уровней дофамина у мышей всех групп после обработки нейротоксином МФТП. При этом падение уровня дофамина в стриатуме животных линий delta flox KO (0.3225 ± 0.02463) и AbKO (0.3950 ± 0.02603) было практически одинаковым и не отличалось от двукратного падения уровня дофамина в стриатуме мышей дикого типа (0.3314 ± 0.04257) (рис. 3).

В тех же образцах определено содержание метаболитов дофамина: продукта его окислительно-дезаминирования 3,4-дигидроксифенилуксусной кислоты (ДОФУК) и основного конечного метаболита дофамина – гомованилиновой кислоты (ГВК). Соотношение содержания продуктов катаболизма дофамина и интактных молекул дофамина во всех образцах было повышено: 0.1875 ± 0.01297 у мышей AbKO, 0.2041 ± 0.01003 у delta flox KO и 0.1925 ± 0.01382 у WT. Это указывало на то, что количество молекул дофамина, утилизируемых в синаптических окончаниях DA-нейронов, превышало количество новосинтезированного дофамина. Такие изменения в показателе катаболизма стриарного дофамина обусловлены гибелью тел части DA-нейронов ЧС. При этом сравнительный анализ содержания дофамина и его метаболитов в стриатумах мышей линий delta flox KO и AbKO показал идентичность поврежда-

ющего эффекта МФТП на дофаминовый статус (рис. 3).

В тех же образцах методом ВЭЖХ определены уровни другого переносчика моноаминов – серотонина (рис. 4). Не выявлено статистически значимого падения уровня серотонина после обработки МФТП ни у мышей AbKO (0.03039 ± 0.002174), ни у мышей delta flox KO (0.02496 ± 0.001867), ни у мышей дикого типа (0.02730 ± 0.001649). Эти данные указывают на специфичность токсического поражения именно тел DA-нейронов в ЧС.

С целью отработки метода выявления влияния нарушения дофаминового статуса при компенсированном поражении МФТП на координацию движений проведен детальный инструментальный анализ походки мышей в установке CatWalk XT (“Noldus”) (рис. 5 и 6). Тестирование проводили на 20-й и 21-й дни после последнего введения МФТП.

Данная установка позволяет регистрировать до 200 параметров, характеризующих походку животных. Выявлены изменения ряда показателей походки в группах мышей, обработанных МФТП. Наиболее выраженными были изменения интенсивности и формы контакта конечности с пластиной аппарата при ходьбе. В частности, у мышей, получавших МФТП, интенсивность давления конечности на поверхность снижалась в среднем на 20%. Причем снижение этого показателя наблюдалось на всех четырех конечностях. Важно отметить, что у мышей обеих “нокаутных” линий выраженность эффекта ослабления контакта конечности с поверхностью была одинаковой (рис. 5).

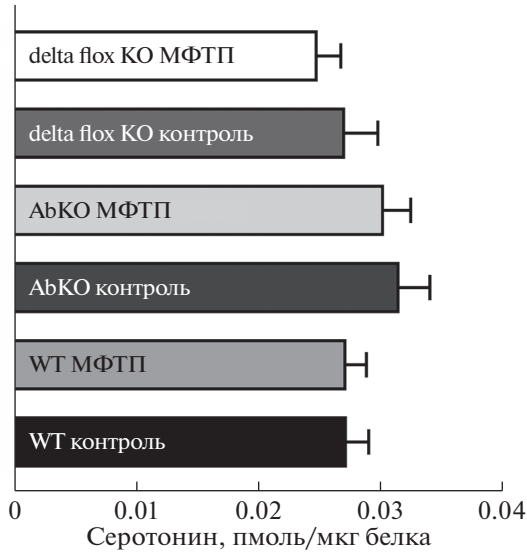


Рис. 4. ВЭЖХ-анализ уровней серотонина в стриатуме мышей через 21 день после введения МФТП. Содержание серотонина у WT-мышей и у мышей линий AbKO и delta flox KO с нокаутом. $M \pm SEM$, $n = 8$ в каждой из шести групп. Однофакторный дисперсионный анализ (one-way ANOVA) с применением критерия множественных сравнений Тьюки.

Для примера приведен другой параметр – расстояние между шагами по разным осям движения тела мыши, которое также менялось, однако отсутствовала строгая закономерность, количественно описывающая общую для всех групп особенность нарушения походки (рис. 6).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В нашей работе проведено сравнение чувствительности ДА-нейронов ЧС мозга двух линий мышей с конститутивным нокаутом гена альфа-

синуклеина. Главное отличие этих линий заключается в том, что геном мышей AbKO содержит посторонние последовательности, использованные для модификации локуса гена альфа-синуклеина методом гомологической рекомбинации с применением эмбриональных стволовых клеток мыши. Эти последовательности, включающие, в частности, бактериальный ген *neo* и активный эктопический промотор гена *Pgk1*, не были удалены из модифицированного локуса (рис. 1). Нельзя исключить, что активный промотор *Pgk1* может влиять на регуляторные элементы других генов в окружении локуса альфа-синуклеина, и это, в свою очередь, будет затруднять интерпретацию результатов изучения функции и дисфункции альфа-синуклеина с применением данной линии мышей. Действительно, недавно показали, что в тканях нервной системы мышей AbKO существенно повышена экспрессия гена мультимерина 1 (*Mmrn-1*) [44]. Единственный конститутивный нокаут альфа-синуклеина, при котором модифицированный локус не содержит функционально значимых посторонних последовательностей – линия delta flox KO, полученная с помощью технологии Cre-рекомбинации для регулируемого генетического нокаута альфа-синуклеина [27, 46]. В результате модифицированный локус генома мышей delta flox KO не содержит никаких привнесенных регуляторных последовательностей. Единственная такая последовательность – небольшой фрагмент размером 34 п.н., являющийся сайтом узнавания Cre-рекомбиназы – LoxP. LoxP. Эти сайты широко используются для конструирования регулируемых нокаутов и считаются безопасными, поскольку за все время применения данной технологии не выявлено влияния последовательностей LoxP на активность кодирующих и регуляторных участков генома [53].

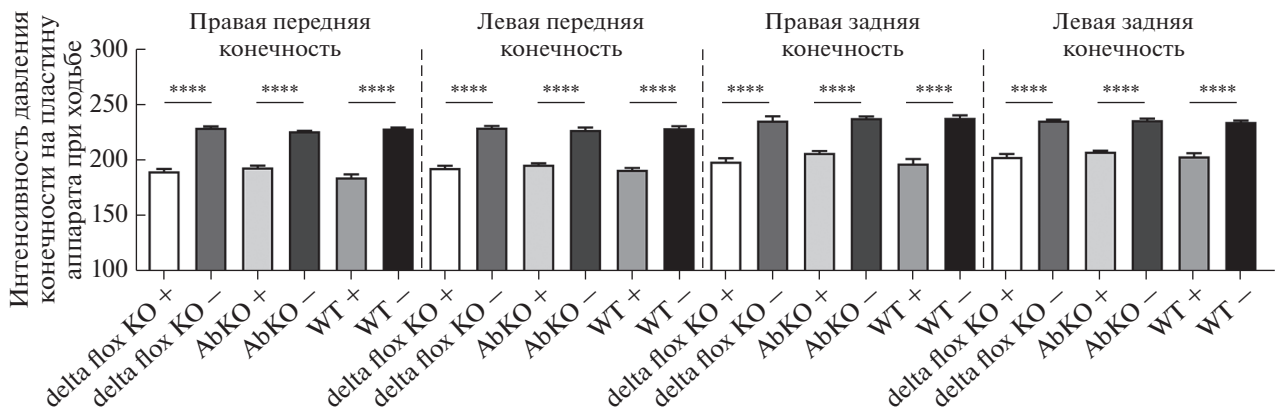


Рис. 5. Анализ походки мышей в установке CatWalk XT (“Noldus”). Интенсивность давления конечности на пластину аппарата при ходьбе (усл. ед.). “+” – введен МФТП; “-” – не введен МФТП. $M \pm SEM$, $n = 8$ в каждой из шести групп; **** $p < 0.0001$. Однофакторный дисперсионный анализ (one-way ANOVA) с применением критерия множественных сравнений Тьюки.

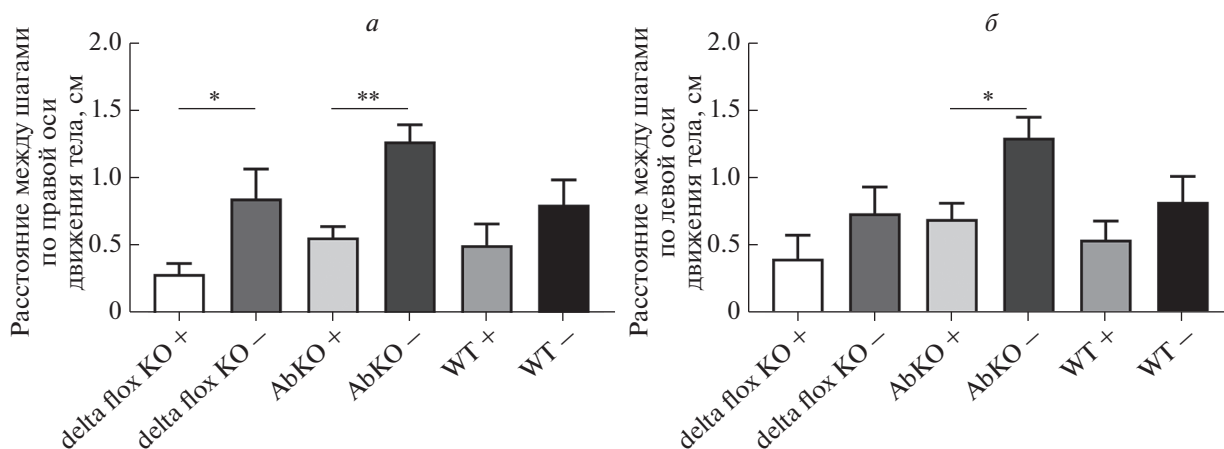


Рис. 6. Анализ походки мышей в установке CatWalk XT (“Noldus”). Сокращение расстояния между шагами (расстояние между положением задней и ранее размещенной передней лапы на одной стороне тела в одном и том же шаговом цикле) по разным осям движения тела мыши после введения МФТП. *a* – Правая, *б* – левая ось движения тела мыши. “+” – введен МФТП; “-” – не введен МФТП. $M \pm SEM$, $n = 8$ в каждой из шести групп; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$. Однофакторный дисперсионный анализ (one-way ANOVA) с применением критерия множественных сравнений Тьюки.

Сравнительное исследование чувствительности мышей delta flox KO и AbKO к нейротоксину МФТП проводили на репрезентативных группах животных с нокаутом гена альфа-синуклеина и контрольных животных дикого типа с немодифицированным геномом. Применение субхронического протокола введения МФТП [47, 48] позволяло моделировать клиническую картину ранней стадии БП, когда поражается только часть ДА-нейронов ЧС, а утрата их функции компенсирована. Действительно, у мышей всех экспериментальных групп на 20-й день после обработки нейротоксином МФТП восстанавливалась двигательная функция, что показано с помощью двух простых классических тестов, используемых для характеристики грубых расстройств движений и их координации. Так, ни способность удерживаться на перевернутой сетке, ни время спуска по вертикальному шесту у животных, обработанных МФТП, не отличались от показателей у животных контрольных групп, что указывало на компенсированный характер повреждений, вызванных МФТП (рис. 2). Однако у животных всех групп, получавших МФТП, нами выявлено статистически значимое снижение уровней дофамина в стриатуме головного мозга, где локализованы синапсы ДА-нейронов ЧС и осуществляется трансмиссия дофамина (рис. 3). При этом снижение уровня дофамина, определенное методом ВЭЖХ, у мышей AbKO было практически таким же, как и в стриатуме мышей дикого типа (рис. 3). Эти результаты согласуются с опубликованными ранее Ninkina и соавт. данными анализа линии AbKO [49] и указывают на потерю ДА-нейронов вследствие поражения нейротоксином МФТП. Следует отметить, что токсичность МФТП на мышцах линии delta flox KO ранее не изучали. На-

ми показано, что базовый уровень дофамина в стриатуме этих мышей оказался близким к его уровню у животных широко используемой и хорошо исследованной линии AbKO. Обработка мышей delta flox KO нейротоксином приводила к падению стриарного дофамина как у мышей AbKO, как и у мышей дикого типа. Более того, выявлено повышение соотношения продуктов катаболизма дофамина (ДОФУК и ГВК) и интактных молекул дофамина во всех образцах. Т.е. количество утилизируемых молекул дофамина в синаптических окончаниях ДА-нейронов превышало количество вновь синтезируемого дофамина, что связано с гибелью тел части популяции ДА-нейронов ЧС, вызванной специфическим токсическим действием МФТП. Причем выраженность поражения была одинаковой в обеих линиях с нокаутом гена альфа-синуклеина и у контрольных животных дикого типа (рис. 3). При этом специфичность токсического поражения ДА-нейронов подтверждается отсутствием изменений в уровнях другого трансмиттера моноаминов – серотонина (рис. 4). Таким образом, нами показано, что уровень дефицита дофамина, обусловленный ответом на введение нейротоксина МФТП, соответствует ранней стадии БП, характеризующейся эффективной компенсацией недостаточности дофамина и отсутствием выраженной клинической симптоматики поражения ДА-системы [54–56].

Следующей задачей была отработка метода регистрации нарушения координации движений у мышей при изменении дофаминового статуса, обусловленного токсическим поражением ДА-нейронов МФТП. В условиях нашей токсической модели ранней стадии БП у мышей всех экспериментальных групп отсутствовали видимые двига-

тельные нарушения, а также признаки моторных дисфункций в большинстве простых рутинных тестов, применяемых для анализа двигательной функции. Нарушение походки является одним из основных диагностических признаков БП. Изменение походки отмечается уже на относительно ранних стадиях БП даже в отсутствие других выраженных двигательных расстройств и тремора [57, 58]. Поэтому мы использовали установку CatWalk XT (“Noldus”), позволяющую подробно количественно оценить особенности походки мышей по 200 параметрам (рис. 5 и 6). Наиболее значимым было отклонение в показателях интенсивности давления конечности на поверхность пластины аппарата. Ослабление давления выявлено у мышей обеих линий с нокаутом и у мышей дикого типа, при этом выраженность эффекта ослабления контакта конечности с поверхностью была одинаковой. Средний вес мышей в группах обработанных МФТП, был таким же, как у не обработанных МФТП контрольных животных, поэтому описанные изменения интенсивности давления конечности на поверхность пластины аппарата не связаны с весом мышей.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В представленном исследовании моделирование компенсированного паркинсонического синдрома выполнено на двух независимых линиях мышей с генетическим нокаутом альфа-синуклеина (delta flox KO и AbKO) путем введения нейротоксина МФТП по субхроническому протоколу. Ранее нейротоксический эффект у мышей delta flox KO не изучали. Показано, что МФТП вызывает снижение уровня дофамина и изменение соотношения его метаболитов в стриатуме мышей обеих линий до одинакового уровня. Тестирование мышей delta flox KO и AbKO в установке CatWalk XT (“Noldus”) выявило идентичные нарушения походки по показателю интенсивности давления конечности на поверхность пластины аппарата. Полученные данные позволяют заключить, что у мышей delta flox KO и AbKO с нокаутом гена альфа-синуклеина компенсированный паркинсонический синдром развивается по сходному механизму. Это актуально, поскольку линия delta flox KO фактически моделирует конечную форму генетического нокаута при прижизненной делеции гена альфа-синуклеина у мышей с регулируемым нокаутом этого гена. До настоящего времени линия delta flox KO остается единственной линией мышей для кондиционной инактивации альфа-синуклеина. Кроме того, выявленное нами нарушение походки у мышей с измененным дофаминовым статусом в отсутствие выраженной двигательной патологии — изменение интенсивности давления конечности на пластину в аппарате CatWalk, может использоваться для оценки эффек-

тивности разрабатываемых противопаркинсонических соединений.

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант № 19-14-00064), поведенческое тестирование выполнено при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований в рамках научного проекта № 19-315-90049 с использованием оборудования ЦКП ИФАВ РАН.

Все процедуры, проведенные с участием животных, соответствовали этическим стандартам учреждений или принятой практике таких исследований.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Шелковникова Т.А., Куликова А.А., Цветков Ф.О., Peters O., Бачурин С.О., Бухман В.Л., Нинкина Н.Н. (2012) Протеинопатии — формы нейродегенеративных заболеваний, в основе которых лежит патологическая агрегация белков. *Молекуляр. биология.* **46**, 402–415.
2. Spillantini M.G., Schmidt M.L., Lee V.M., Trojanowski J.Q., Jakes R., Goedert M. (1997) Alpha-synuclein in Lewy bodies. *Nature.* **388**(6645), 839–840.
3. Emamzadeh F.N., Surguchov A. (2018) Parkinson’s disease: biomarkers, treatment, and risk factors. *Front. Neurosci.* **12**, 612.
4. Goedert M., Jakes R., Spillantini M.G. (2017) The synucleinopathies: twenty years on. *J. Parkinsons. Dis.* **7**(s1), S51–S69.
5. Caughey B., Lansbury P.T. (2003) Protofibrils, pores, fibrils, and neurodegeneration: separating the responsible protein aggregates from the innocent bystanders. *Annu. Rev. Neurosci.* **26**, 267–298.
6. Dev K.K., Hofele K., Barbieri S., Buchman V.L., van der Putten H. (2003) Part II: alpha-synuclein and its molecular pathophysiological role in neurodegenerative disease. *Neuropharmacology.* **45**, 14–44.
7. Fink A.L. (2006) The aggregation and fibrillation of alpha-synuclein. *Acc. Chem. Res.* **39**, 628–634.
8. Uversky V.N. (2007) Neuropathology, biochemistry, and biophysics of alpha-synuclein aggregation. *J. Neurochem.* **103**, 17–37.
9. Uversky V.N. (2017) Looking at the recent advances in understanding α -synuclein and its aggregation through the proteoform prism. *F1000Res.* **6**, 525.
10. Osterberg V.R., Spinelli K.J., Weston L.J., Luk K.C., Woltjer R.L., Unni V.K. (2015) Progressive aggregation of alpha-synuclein and selective degeneration of lewy inclusion-bearing neurons in a mouse model of parkinsonism. *Cell Rep.* **10**, 1252–1260.
11. Ingelsson M. (2016) Alpha-synuclein oligomers-neurotoxic molecules in Parkinson’s disease and other lewy body disorders. *Front. Neurosci.* **10**, 408.
12. Venda L.L., Cragg S.J., Buchman V.L., Wade-Martins R. (2010) α -Synuclein and dopamine at the crossroads of Parkinson’s disease. *Trends Neurosci.* **33**, 559–568.

13. Burré J., Sharma M., Tsetsenis T., Buchman V., Etherington M.R., Südhof T.C. (2010) Alpha-synuclein promotes SNARE-complex assembly *in vivo* and *in vitro*. *Science*. **329**(5999), 1663–1667.
14. Cabin D.E., Shimazu K., Murphy D., Cole N.B., Gottschalk W., McIlwain K.L., Orrison B., Chen A., Ellis C.E., Paylor R., Lu B., Nussbaum R.L. (2002) Synaptic vesicle depletion correlates with attenuated synaptic responses to prolonged repetitive stimulation in mice lacking alpha-synuclein. *J. Neurosci.* **22**, 8797–8807.
15. Fusco G., Pape T., Stephens A.D., Mahou P., Costa A.R., Kaminski C.F., Kaminski Schierle G.S., Vendruscolo M., Veglia G., Dobson C.M., De Simone A. (2016) Structural basis of synaptic vesicle assembly promoted by α -synuclein. *Nat. Commun.* **7**, 12563.
16. Logan T., Bendor J., Toupin C., Thorn K., Edwards R.H. (2017) α -Synuclein promotes dilation of the exocytotic fusion pore. *Nat. Neurosci.* **20**, 681–689.
17. Ganapathy K., Datta I., Sowmithra S., Joshi P., Bhonde R. (2016) Influence of 6-hydroxydopamine toxicity on α -synuclein phosphorylation, resting vesicle expression, and vesicular dopamine release. *J. Cell Biochem.* **117**, 2719–2736.
18. Нинкина Н.Н., Тарасова Т.В., Чапров К.Д., Голоборщев В.В., Бачурин С.О., Бухман В.Л. (2019) Дефицит синуклеинов снижает эффективность захвата дофамина синаптическими везикулами. *ДАН.* **486**(1), 114–117.
19. Al-Wandi A., Ninkina N., Millership S., Williamson S.J., Jones P.A., Buchman V.L. (2010) Absence of alpha-synuclein affects dopamine metabolism and synaptic markers in the striatum of aging mice. *Neurobiol. Aging.* **31**(5), 796–804.
20. Benskey M.J., Perez R.G., Manfredsson F.P. (2016) The contribution of alpha synuclein to neuronal survival and function – implications for Parkinson’s disease. *J. Neurochem.* **137**, 331–359
21. Collier T.J., Eugene Redmond D., Steece-Collier K., Lipton J.W., Manfredsson F.P. (2016) Is alpha-synuclein loss-of-function a contributor to parkinsonian pathology? Evidence from non-human primates. *Front. Neurosci.* **10**, 12.
22. Тарасова Т.В., Лыткина О.А., Роман А.Ю., Бачурин С.О., Устюгов А.А. (2016) Роль альфа-синуклеина в развитии дофаминергических нейронов черной субстанции и области вентральной покрышки среднего мозга. *ДАН.* **466**(5), 620–623.
23. Tarasova T.V., Lytkina O.A., Goloborshcheva V.V., Skuratovskaya L.N., Antohin A.I., Ovchinnikov R.K., Kukharsky M.S. (2018) Genetic inactivation of alpha-synuclein affects embryonic development of dopaminergic neurons of the substantia nigra, but not the ventral tegmental area, in mouse brain. *PeerJ.* **6**, e4779.
24. Buchman V.L., Ninkina N. (2008) Modulation of α -synuclein expression in transgenic animals for modeling synucleinopathies - Is the juice worth the squeeze? *Neurotox Res.* **14**, 329–341.
25. Abeliovich A., Schmitz Y., Fariñas I., Choi-Lundberg D., Ho W.H., Castillo P.E., Shinsky N., Verdugo J.M., Armanini M., Ryan A., Hynes M., Phillips H., Sulzer D., Rosenthal A. (2000) Mice lacking alpha-synuclein display functional deficits in the nigrostriatal dopamine system. *Neuron.* **25**, 239–252.
26. Schlüter O.M., Fornai F., Alessandri M.G., Takamori S., Geppert M., Jahn R., Südhof T.C. (2003) Role of alpha-synuclein in 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced parkinsonism in mice. *Neuroscience.* **118**, 985–1002.
27. Ninkina N., Connor-Robson N., Ustyugov A.A., Tarasova T.V., Shelkovnikova T.A., Buchman V.L. (2015) A novel resource for studying function and dysfunction of α -synuclein: mouse lines for modulation of endogenous *Snc* gene expression. *Sci. Rep.* **5**, 16615.
28. Бачурин С.О., Саблин С.О., Гришина Г.В., Гайдарова Е.Л., Дубова Л.Г., Зубов Н.Д. (1989) Каталитическая биотрансформация физиологически активных 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридинов под действием моноаминоксидазы. *Биоорганическая химия.* **15**(5), 620–626.
29. Sablin S.O., Krueger M.J., Bachurin S.O., Solyakov L.S., Efange S.M.N., Singer T.P. (1994) Oxidation products arising from the action of monoamine oxidase B on 1-methyl-4-benzyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine, a non-neurotoxic analogue of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. *J. Neurochem.* **62**(5), 2012–2016.
30. Schober A. (2004) Classic toxin-induced animal models of Parkinson’s disease: 6-OHDA and MPTP. *Cell Tissue Res.* **318**(1), 215–224.
31. Martí Y., Matthaes F., Lau T., Schloss P. (2017) Methyl-4-phenylpyridinium (MPP+) differentially affects monoamine release and re-uptake in murine embryonic stem cell-derived dopaminergic and serotonergic neurons. *Mol. Cell. Neurosci.* **83**, 37–45.
32. Бачурин С.О., Лукоянов Н.В., Петрова Л.Н., Соляков Л.С., Ткаченко С.Е., Раевский О.А. (1996) Ингибирование системы обратного захвата дофамина аналогами нейротоксического метаболита МФП (1-метил-4-фенилпиридиний). Связь структура–активность. *ДАН.* **346**(4), 549–551.)
33. Bezard E., Gross C.E., Fournier M.C., Dovero S., Bloch V., Jaber M. (1999) Absence of MPTP-induced neuronal death in mice lacking the dopamine transporter. *Exp. Neurol.* **155**, 268–273.
34. Ugrumov M. (2020) Development of early diagnosis of Parkinson’s disease: illusion or reality? *CNS Neurosci. Ther.* **00**, 1–13.
35. Руденок М.М., Алиева А.Х., Николаев М.А., Колачева А.А., Угрюмов М.В., Пчелина С.Н., Сломинский П.А., Шадрин М.И. (2019) Возможная роль генов, связанных с лизосомными болезнями накопления, в патогенезе болезни Паркинсона. *Молекулярная биология.* **53**, 28–36.
36. Chia S.J., Tan E.K., Chao Y.X. (2020) Historical perspective: models of Parkinson’s disease. *Int. J. Mol. Sci.* **21**(7), 2464.
37. Thomas B., Mandir A.S., West N., Liu Y., Andrabi S.A., Stirling W., Dawson V.L., Dawson T.M., Lee M.K. (2011) Resistance to MPTP-neurotoxicity in α -synuclein knockout mice is complemented by human α -syn-

- nuclein and associated with increased β -synuclein and Akt activation. *PLoS One*. **6**(1), e16706.
38. Sayre L.M., Wang F., Hoppel C.L. (1989) Tetraphenylborate potentiates the respiratory inhibition by the dopaminergic neurotoxin MPP⁺ in both electron transport particles and intact mitochondria. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **161**, 809–818.
 39. Bachurin S.O., Shevtzova E.P., Lermontova N.N., Serkova T.P., Ramsay R.R. (1996) The effect of dithiocarbamates on the neurotoxic action of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) and on mitochondrial respiratory chain. *Neurotoxicology*. **17**(3–4), 897–904.
 40. Lermontova N., Lukoyanov N., Serkova T., Lukoyanova E., Bachurin S. (1998) Effects of tacrine on deficits in active avoidance performance induced by AF64A in rats. *Mol. Chem. Neuropathol.* **33**(1), 51–61.
 41. Milaeva E.R., Gerasimova O.A., Jingwei Z., Shpakovsky D.B., Syrbu S.A., Semykin A.S., Koifman O.I., Kireeva E.G., Shevtzova E.F., Bachurin S.O., Zefirov N.S. (2008) Synthesis and antioxidative activity of metalloporphyrins bearing 2,6-di-tert-butylphenol pendants. *J. Inorg. Biochem.* **102**(5–6), 1348–1358.
 42. Perlovich G.L., Proshin A.N., Volkova T.V., Petrova L.N., Bachurin S.O. (2012) Novel 1,2,4-thiadiazole derivatives as potent neuroprotectors: approach to creation of bioavailable drugs. *Mol. Pharm.* **9**(8), 2156–2167.
 43. Petroske E., Meredith G.E., Callen S., Totterdell S., Lau Y.S. (2001) Mouse model of Parkinsonism: A comparison between subacute MPTP and chronic MPTP/probenecid treatment. *Neuroscience*. **106**, 589–601.
 44. Чапров К.Д., Голоборщев В.В., Тарасова Т.В., Терина Е.В., Корокин М.В., Солдатов В.О., Покровский М.В., Кучеряну В.Г., Морозов С.Г., Овчинников Р.К. (2020) Повышение экспрессии гена мультимерина-1 в нервной системе мышей как результат геномной модификации локуса альфа-синуклеина. *ДАН*. **494**, 537–540.
 45. Тарасова Т.В., Устюгов А.А., Нинкина Н.Н., Скворцова В.И. (2016) Новая линия генетически модифицированных мышей с конститутивным нокаутом гена альфа-синуклеина для изучения патогенетических аспектов дифференциального поражения дофаминергических нейронов. *Патол. Физиол. Эксп. Тер.* **60**(3), 4–9.
 46. Roman A.Y., Limorenko G., Ustyugov A.A., Tarasova T.V., Lysikova E.A., Buchman V.L., Ninkina N. (2017) Generation of mouse lines with conditionally or constitutively inactivated *Snc*a gene and Rosa26-stop-lacZ reporter located in cis on the mouse chromosome 6. *Transgenic Res.* **26**(2), 301–307.
 47. Robertson D.C., Schmidt O., Ninkina N., Jones P.A., Sharkey J., Buchman V.L. (2004) Developmental loss and resistance to MPTP toxicity of dopaminergic neurons in substantia nigra pars compacta of gamma-synuclein, alpha-synuclein and double alpha/gamma-synuclein null mutant mice. *J. Neurochem.* **89**(5), 1126–1136.
 48. Anwar S., Peters O., Millership S., Ninkina N., Doig N., Connor-Robson N., Threlfell S., Koener G., Deacon R.M., Bannerman D.M., Bolam J.P., Chandra S.S., Cragg S.J., Wade-Martins R., Buchman V.L. (2011) Functional alterations to the nigrostriatal system in mice lacking all three members of the synuclein family. *J. Neurosci.* **31**(20), 7264–7274.
 49. Ninkina N., Tarasova T.V., Chaprov K.D., Roman A.Y., Kukharsky M.S., Kolik L.G., Ovchinnikov R., Ustyugov A.A., Durnev A.D., Buchman V.L. (2020) Alterations in the nigrostriatal system following conditional inactivation of α -synuclein in neurons of adult and aging mice. *Neurobiol. Aging*. **91**, 76–87.
 50. Connor-Robson N., Peters O.M., Millership S., Ninkina N., Buchman V.L. (2016) Combinational losses of synucleins reveal their differential requirements for compensating age-dependent alterations in motor behavior and dopamine metabolism. *Neurobiol. Aging*. **46**, 107–112.
 51. Minakaki G., Canneva F., Chevessier F., Bode F., Menges S., Timotius I.K., Kalinichenko L.S., Meixner H., Müller C.P., Eskofier B.M., Casadei N., Riess O., Schröder R., Winkler J., Xiang W., von Hörsten S., Klucken J. (2019) Treadmill exercise intervention improves gait and postural control in alpha-synuclein mouse models without inducing cerebral autophagy. *Behav. Brain Res.* **363**, 199–215.
 52. Zimprich A., Östereicher M.A., Becker L., Dirscherl P., Ernst L., Fuchs H., Gailus-Durner V., Garrett L., Giesert F., Glasl L., Hummel A., Rozman J., de Angelis M.H., Vogt-Weisenhorn D., Wurst W., Höltter S.M. (2018) Analysis of locomotor behavior in the German Mouse Clinic. *J. Neurosci. Meth.* **300**, 77–91.
 53. Song A.J., Palmiter R.D. (2018) Detecting and avoiding problems when using the Cre-lox system. *Trends Genet.* **34**(5), 333–340.
 54. Колачева А.А., Угрюмов М.В. (2018) Минтез дофамина как механизм пластичности мозга при патологии nigrostriарной системы. *ДАН*. **479**(3), 336–339.
 55. Сафандеев В.В., Колачева А.А., Иванов Д.Е., Угрюмов М.В. (2017) Выявление латентной функциональной недостаточности дофаминергических нейронов nigrostriарной системы на хронической модели болезни Паркинсона. *Нейрохимия*. **34**(4), 290–295.
 56. Козина Е.А., Колачева А.А., Кудрин В.С., Кучеряну В.Г., Хаиндрава В.Г., Угрюмов М.В. (2016) Хронические модели доклинической и ранней клинической стадии болезни Паркинсона на мышах. *Нейрохимия*. **33**(3), 222–229.
 57. Рождественский А.С., Делов Р.А., Маркс Е.А., Гапоненко И.А., Ханох Е.В., Рождественский В.А., Иллариошкин С.Н. (2020) Изучение фундаментальных и прикладных аспектов болезни Паркинсона в рамках международного консорциума GEOPD. *Нервные болезни*. **1**, 10–15.
 58. Чигалейчик Л.А., Карабанов А.В., Полешук В.В., Иллариошкин С.Н. (2018) Современные технологии изучения поствальных нарушений при болезни Паркинсона. *Вестн. Росс. Военно-мед. акад.* **S3**, 116–117.

COMPARATIVE ANALYSIS OF THE MPTP NEUROTOXICITY IN MICE WITH CONSTITUTIVE KNOCKOUT OF ALPHA-SYNUCLEIN GENE

**K. D. Chaprov^{1, *}, E. V. Teterina¹, A. Y. Roman¹, T. A. Ivanova¹, V. V. Goloborshcheva²,
V. G. Kucheryanu², S. G. Morozov², E. A. Lysikova¹, O. A. Lytkina¹, I. V. Koroleva¹,
N. Ia. Popova³, A. I. Antohin³, R. K. Ovchinnikov^{1,3}, and M. S. Kukharsky^{1,3}**

¹*Institute of Physiologically Active Compounds, Russian Academy of Sciences, Chernogolovka, Moscow Region, 142432 Russia*

²*Institute of General Pathology and Pathophysiology, Moscow, 125315 Russia*

³*Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, 117997 Russia*

*e-mail: chaprov@ipac.ac.ru

Aggregated forms of alpha-synuclein are core components of pathohistological inclusions, Lewy bodies in neurons of substantia nigra of Parkinson disease (PD) patients. The exact role of alpha-synuclein in mechanisms of selective loss of substantia nigra's dopaminergic neurons in PD brain remains obscure. Here we report the comparative analysis of effect of MPTP, a neurotoxin that affects the dopaminergic neurons, in two independently produced alpha-synuclein knockout mouse lines: delta flox KO and AbKO. MPTP treatment led to reduced level of striatum's dopamine and changed ratio of its metabolites equally in mice of both knockout lines. The gait analysis in CatWalk XT (Noldus) system revealed the identical changes. Delta flox KO line reproduces the end point of *in vivo* deletion of alpha-synuclein gene in mice with conditional alpha-synuclein knockout. Our data suggest that the main features of progression of the compensated parkinsonism syndrome in MPTP treated mice are the same in the delta flox KO and in the commonly used conventional knockout AbKO mice. The described parameter of gait deviation in mice could be applied for characteristic of therapeutic efficacy compounds for treatment of PD on early stages.

Keywords: Parkinson disease, alpha synuclein, genetic knockout, dopamine, MPTP