

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ  
РАБОТЫ

УДК 577.2+616.8-092+612.821(082)

НЕЙРОХИМИЧЕСКИЕ И ПОВЕДЕНЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ ОЛИГОМЕРОВ  
АЛЬФА-СИНУКЛЕИНА У МЫШЕЙ ТРЕХМЕСЯЧНОГО ВОЗРАСТА

© 2021 г. В. В. Шерстнев<sup>1</sup>, М. А. Грудень<sup>1</sup>, \* О. А. Соловьева<sup>1</sup>, В. С. Кудрин<sup>2</sup>,  
В. Б. Наркевич<sup>2</sup>, Н. П. Михайлова<sup>1</sup>, А. М. Ратмиров<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Федеральное государственное бюджетное научное учреждение  
“Научно-исследовательский институт нормальной физиологии имени П.К. Анохина”, Москва, Россия

<sup>2</sup>Федеральное государственное бюджетное научное учреждение  
“Научно-исследовательский институт фармакологии имени В.В. Закусова”, Москва, Россия

Поступила в редакцию 24.06.2021 г.

После доработки 04.07.2021 г.

Принята к публикации 05.07.2021 г.

Болезнь Паркинсона – широко распространенное, прогрессирующее, возрастзависимое нейродегенеративное заболевание. Нейрохимической основой двигательных и недвигательных нарушений при болезни Паркинсона является дисфункция многих нейромедиаторных систем мозга и, в первую очередь, функциональный дефицит и дисбаланс моноаминергических систем, которые обусловлены деградацией и гибелью определенных популяций нервных клеток в условиях мисфолдинга белка  $\alpha$ -синуклеина и действия его амилоидогенных нейротоксических конформаций. Особый интерес вызывают исследования возрастных особенностей изменений моноаминергических систем и развития моторных и немоторных нарушений на доклинической и клинической стадиях заболевания. В работе изучено влияние олигомеров  $\alpha$ -синуклеина, вводимых интраназально в течение 14-ти дней, на двигательную активность, эмоциональное состояние, кратко- и долговременную память, а также содержание и обмен дофамина, серотонина и норадреналина в гиппокампе, фронтальной коре мозга и мозжечке самцов мышей C57Bl/6 в возрасте 3-х месяцев. В поведенческих экспериментах использовали модели: “Открытое поле”, “Распознавание нового объекта”, “Условная реакция пассивного избегания” и “Приподнятый крестообразный лабиринт”. Содержание моноаминов и их метаболитов в ткани мозга животных определяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с электромагнитной детекцией. Обнаружено, что мыши, получавшие олигомеры  $\alpha$ -синуклеина, демонстрировали проявления аффективноподобного поведения с признаками апатии. Нарушений двигательной активности, кратковременной и долговременной памяти и повышения тревожности у животных не документировано. Олигомеры  $\alpha$ -синуклеина вызывали значимое снижение содержания дофамина и его метаболитов DOPAC и HVA во фронтальной коре мозга, а также снижение концентрации метаболита дофамина – 3-МТ и разнонаправленные изменения показателей обмена серотонина и дофамина в гиппокампе. При этом зарегистрировано значительное повышение содержания 3-МТ в мозжечке. Выполнен сравнительный анализ полученных в работе данных и экспериментальных фактов, выявленных в ранее проведенном нами исследовании нейрохимических и поведенческих эффектов олигомеров  $\alpha$ -синуклеина у мышей 6-ти месячного возраста. Полученные результаты свидетельствуют, что олигомеры  $\alpha$ -синуклеина при хроническом интраназальном введении вызывают у мышей 3-х месячного возраста недвигательные нарушения и нейрохимические изменения, которые наблюдаются на доклинической стадии БП.

**Ключевые слова:**  $\alpha$ -синуклеин, олигомеры, моноамины, двигательная активность, аффективноподобное поведение, память, 3-х месячные мыши, Болезнь Паркинсона

**DOI:** 10.31857/S1027813321040117

## ВВЕДЕНИЕ

Болезнь Паркинсона (БП) – хроническое, прогрессирующее, возрастзависимое, нейродегенеративное заболевание. Среди всех неврологических заболеваний БП находится на втором ме-

сте по частоте встречаемости и на первом – по приросту распространенности. Так, общее число пациентов с БП во всем мире увеличилось более чем вдвое за период с 1990 по 2015 г. Количество случаев БП в 2014–2015 гг. оценивалось в 6.2–6.9 миллионов пациентов по всему миру, а к 2040 г. ожидается увеличение числа заболевших до 12.9–14.2 миллионов человек. БП является заболева-

\* Адресат для корреспонденции: 125315 Россия, Москва, ул. Балтийская д. 8, тел.: 8(499)231-00-46, e-mail: mgrud-en@mail.ru.

нием наиболее зависимым от возраста. Заболеваемость БП с возрастом увеличивается более чем в 400 раз [1–3].

В качестве ключевого звена молекулярного патогенеза БП, в настоящее время рассматривают гиперпродукцию и мисфолдинг белка  $\alpha$ -синуклина ( $\alpha$ -син) с образованием амилоидогенных нейротоксических структур, среди которых наиболее выраженным нейротоксическим действием обладают префибриллярные олигомерные формы белка. Высокие концентрации  $\alpha$ -син и его амилоидогенные структуры инициируют деградацию и избирательную гибель определенных популяций нервных клеток, локализующихся в различных церебральных структурах, что приводит к дисбалансу и дисфункции многих нейромедиаторных систем мозга. При этом моноаминергические системы подвержены более раннему и выраженному нейротоксическому влиянию  $\alpha$ -син и его амилоидогенных конформаций. Считают, что дисфункции и дисбаланс нейромедиаторных систем обуславливают развитие и проявление характерных двигательных и многообразных не двигательных нарушений, наблюдаемых при БП [4–6].

В последние годы все более активно и широко исследуются различные вопросы междисциплинарной проблемы старения и БП. Признано, что старение является основным фактором риска развития БП. Возраст дебюта заболевания в значительной степени определяет, спектр клинических проявлений и продолжительность течения БП. В зависимости от возраста начала БП выделяют подтипы заболевания, которые различаются распространенностью, клиническими и генетическими особенностями. Ювенильный паркинсонизм — с началом заболевания в возрасте менее 20 лет. БП с молодым (ранним) началом в возрасте от 21 до 40 лет. БП с поздним началом, когда классические признаки заболевания (двигательные нарушения) появляются после 61 г. [1, 3, 7, 8].

Значимый интерес для понимания молекулярного патогенеза и разработки адекватных экспериментальных моделей БП представляют знания о возрастных особенностях нейрохимических механизмов двигательных и не двигательных нарушений, наблюдаемых на доклинической и клинической стадиях заболевания. Нами была разработана оригинальная экспериментальная модель сходных с БП патологических состояний, основанная на хроническом интраназальном введении амилоидогенных конформаций  $\alpha$ -син стареющим мышам. В экспериментах, проведенных на мышах 12-ти месячного возраста, было показано, что олигомеры  $\alpha$ -син, вводимые интраназально в течение 14-ти дней, вызывают нейрохимические и поведенческие эффекты сходные с проявлениями, наблюдаемыми на клинической стадии БП: снижение числа дофаминергических нейронов в компакт-

ной части черной субстанции мозга, выраженные изменения содержания моноаминов и их метаболитов в черной субстанции и стриатуме, нарушение нейрогенеза в гиппокампе, а также нарушение двигательной активности, памяти и повышение тревожности [9]. Мыши 6-ти месячного возраста, получавшие олигомеры  $\alpha$ -син, воспроизводили отдельные доклинические проявления БП: повышение тревожности, снижение содержания дофамина и разнонаправленные изменения уровня его метаболитов в гиппокампе и фронтальной коре мозга. При этом нарушений двигательной активности, обучения и памяти животные не демонстрировали [10, 11].

Учитывая изложенное, настоящая работа была направлена на исследование особенностей влияния олигомеров  $\alpha$ -син в условиях хронического интраназального их введения на двигательную активность, тревожность, кратко- и долговременную память, содержание и обмен дофамина, серотонина и норадреналина в гиппокампе, фронтальной коре мозга и мозжечке мышей 3-х месячного возраста.

#### МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Работа проведена на 20 самцах мышей линии C57Bl/6 в возрасте 3 месяцев (ФГБУН НЦБМТ ФМБА питомник “Столбовая”, Россия). Мыши содержались по 3–5 особей в клетках в стандартных условиях вивария со сменой темной и светлой фаз суток 12/12 ч. при свободном доступе к пище и воде. Мышам двух групп вводили поочередно в каждую ноздрю либо раствор олигомеров  $\alpha$ -син, приготовленном на физиологическом растворе (8 мкл, 0,48 мг/кг,  $n = 10$ ), либо физиологический раствор (ФР, 8 мкл,  $n = 10$ ) ежедневно в течение 14 дней.

В исследовании была использована батарея поведенческих тестов, описанная нами ранее [10, 11]. На 15-й день от начала введения растворов животных из экспериментальной и контрольной групп однократно помещали в установку “Открытое поле” (ОП) (Columbus Instruments, Огайо, США) на 11 мин (адаптация в течение 5 мин, тестирование — последние 6 минут). Поведение животных регистрировали с помощью видеокамеры CNB-BVB-31F (CNB Technology Inc., Корея), размещенной под потолком комнаты. Сбор и анализ данных проводили с помощью программы Ethovision XT 8.5 (Noldus, Голландия). Для анализа площадь установки делили на 16 равных квадрантов. По перемещению центра тела животного оценивали среднюю скорость движения, а также длительность нахождения и количество заходов в центральную зону (4 центральных квадранта из 16-ти). На 16-е сут оценивали кратковременную память мышей в тесте “Распознавание нового объекта” (РНО), используя установку ОП как

арену для проведения исследования. Во время сессии обучения длительностью 5 мин животные имели возможность свободно исследовать два идентичных объекта (банки из стекла с металлическими крышками, диаметром 5.4 см). Через 1 ч после обучения мышей проводили 5-минутную сессию тестирования: в установку помещали один ранее знакомый и один новый для мыши объект (зеленый пластмассовый стакан диаметром 7.5 см). В тесте РНО зоны интереса определяли по границам размещенных в установке 2-х объектов (двух при обучении и двух при тестировании) и на расстоянии 2 см от этих объектов (в пограничных зонах). В этом тесте положение животного определяли по трем точкам (нос, центр тела и хвост). Считали, что мышь исследует объект, если ее нос определялся в границах самого объекта или его пограничной зоны. На основе файлов, записанных во время тестирования, рассчитывали индекс дискриминации (ИД) =  $T_{\text{нов}} / (T_{\text{нов}} + T_{\text{знак}})$ , где  $T_{\text{нов}}$  — длительность нахождения в зоне нового объекта и его пограничной зоне (в секундах),  $T_{\text{знак}}$  — длительность нахождения в зоне знакомого объекта и его пограничной зоне (в секундах). При анализе результатов, полученных в модели РНО, были исключены данные одной мыши из контрольной группы, которая при адаптации не подходила ни к одному из объектов. На 18-е сутки исследования в установке PACS Shuttle Box (v.3.13) (Columbus Instruments, Ohio, USA) у животных обеих групп формировали условную реакцию пассивного избегания (УРПИ), которую оценивали через 24 ч. Животных адаптировали к освещенному отсеку в течение 15 с, максимальная длительность сессии обусловливания составляла 180 с, сессии тестирования — 300 с. В случае перехода в темный отсек мышь получала электрокожное раздражение лап и хвоста (сила тока — 0.6 мА, длительность разряда — 3 с). С помощью программного обеспечения PACS 30 Shuttle Box v. 3.13 в обеих сессиях автоматически фиксировали латентное время (ЛВ) перехода из освещенного в темный отсек камеры. Если животное не переходило в темный отсек в течение первой сессии обусловливания, ей предоставлялась еще одна попытка, но не ранее, чем через 30 минут после первой сессии. Спустя 2 дня после проведения УРПИ животных однократно в течение 5 минут тестировали в установке “Приподнятый крестообразный лабиринт” (ПКЛ) (Columbus Instruments, Ohio, USA). В ПКЛ выделяли 2 суммарные зоны интереса: 2 открытых рукава и 2 закрытых. Оценивали следующие показатели: среднюю скорость движения, суммарное количество входов и длительность пребывания в двух закрытых и двух открытых рукавах. Опыты в ОП, РНО и ПКЛ проводили в помещении при освещении установки рассеянным светом (10–14 люкс).

Через 24 ч по окончании поведенческих экспериментов всех животных декапитировали, извлекали мозг и выделяли на холоде образцы структур мозга: гиппокамп, фронтальная кора мозга и мозжечок, которые замораживали в жидком азоте. Далее в полученных образцах церебральных структур определяли содержание биогенных аминов: дофамина (dopamine, DA), его метаболитов (3,4-Dihydroxyphenylacetic acid, DOPAC; homovanillic acid, HVA; 3-Methoxytyramine, 3-MT), норадреналина (NA), серотонина (5-hydroxytryptamine, serotonin, 5-HT) и его метаболита (5-hydroxyindoleacetic acid, 5-HIAA). В экспериментах были использованы моноамины и их метаболиты производства Sigma, St. Louis, MO, USA. Уровень нейромедиаторов определяли в структурах мозга мышей методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с электрохимической детекцией на хроматографе LC-304T (BAS, West Lafayette, США) с инжектором Rheodyne 7125, с объемом петли донаесения образцов в 20 мкл [12]. Величины концентрации моноаминов в опытных образцах рассчитывали методом “внутреннего стандарта”, исходя из отношений площадей пиков в стандартной смеси и экспериментальном образце и выражали в нМ/г ткани.

Олигомеры  $\alpha$ -син были получены и охарактеризованы по описанному ранее протоколу [13].

Статистический анализ результатов поведенческих экспериментов осуществляли с помощью программы SPSS Statistics 17.0 (SPSS Inc., США), Statistica 7.0 (StatSoft Inc., США). Данные представляли как средние значения и стандартные ошибки измерения ( $M \pm SEM$ ), использовали межгрупповое сравнение по  $U$  критерию Mann–Whitney. Различия считали статистически значимыми при  $p < 0.05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В поведенческой части исследования оценивали двигательную активность, кратко- и долговременную память и тревожность самцов мышей 3-х месячного возраста, получавших интраназально в течение 14 дней олигомеры  $\alpha$ -син либо физиологический раствор. Обнаружено, что общая двигательная активность экспериментальных мышей по сравнению с контрольными животными статистически значимо не различалась ни в ОП, ни в моделях РНО и в ПКЛ. Средняя скорость движения экспериментальных мышей в ОП при адаптации составила  $9.4 \pm 1.0$  см/с (ФР:  $8.3 \pm 0.5$  см/с, тест Манна–Уитни,  $U = 14.00$ ,  $Z = -1.347$ ,  $p = 0.178$ ), при тестировании —  $6.2 \pm 0.5$  см/с (ФР:  $6.5 \pm 0.7$  см/с,  $U = 24.00$ ,  $Z = -0.122$ ,  $p = 0.903$ ). Пройденное животными расстояние также достоверно не различалось (адаптация: олигомеры  $\alpha$ -син:  $2775.7 \pm 277.4$  см, ФР:  $2479.5 \pm 137.3$  см,  $U = 14.00$ ,  $Z = -1.347$ ,  $p = 0.178$ ; тест: олигомеры  $\alpha$ -син:

**Таблица 1.** Длительность обследования объектов при обучении и тестировании через 1 час в модели РНО

Тесты	Олигомеры α-синуклеина	Физиологический раствор	Различия между группами, критерий Манна–Уитни
Адаптация			
Длительность обследования объекта 1	7.0 ± 4.7	14.3 ± 5.0	$U = 8.0, Z = -1.933, p = 0.053$
Количество подходов к объекту 1	29 ± 15	50 ± 16	$U = 11.5, Z = -1.472, p = 0.141$
Длительность обследования объекта 2	7.1 ± 4.8	14.2 ± 5.4	$U = 8.0, Z = -1.933, p = 0.053$
Количество подходов к объекту 2	26 ± 16	49 ± 16	$U = 10.0, Z = -1.669, p = 0.095$
Тест			
Длительность обследования нового объекта	16.1 ± 9.8	19.5 ± 3.8	$U = 12.0, Z = -1.4, p = 0.162$
Количество подходов к новому объекту	70 ± 48	70 ± 17	$U = 13.0, Z = -1.272, p = 0.203$
Длительность обследования знакомого объекта	10 ± 7	9.9 ± 2.3	$U = 14.0, Z = -1.133, p = 0.257$
Количество подходов к знакомому объекту	47 ± 34	38 ± 8	$U = 14.0, Z = -1.133, p = 0.257$
Индекс распознавания	0.77 ± 0.1	0.71 ± 0.02	$U = 15.0, Z = -1.0, p = 0.317$

2236.9 ± 179.3 см, ФР: 2339.0 ± 267.9 см,  $U = 24.00, Z = -0.122, p = 0.903$ ). Не было выявлено статистически значимых различий во времени нахождения в центре установки ОП (адаптация: олигомеры α-син: 31.9 ± 3.5 с, ФР: 29.9 ± 3.1 с,  $U = 20.00, Z = -0.612, p = 0.540$ ; тест: олигомеры α-син: 52.6 ± 14.2 с, ФР: 33.9 ± 3.8 с,  $U = 15.00, Z = -1.226, p = 0.220$ ). При адаптации количество заходов экспериментальных мышей в центр ОП составило в среднем 25 ± 2 (ФР: 24 ± 2,  $U = 23.00, Z = -0.246, p = 0.805$ ), при тестировании – 23 ± 2 (ФР: 20 ± 3,  $U = 14.50, Z = -1.292, p = 0.196$ ). У мышей, получавших олигомеры α-син, средняя скорость движения в модели РНО при обучении составила 5.6 ± 0.5 см/с (ФР: 6.4 ± 0.6 см/с,  $U = 18.00, Z = -0.6, p = 0.549$ ), при тестировании 4.7 ± 0.4 см/с (ФР: 5.0 ± 0.6 см/с,  $U = 22.00, Z = 0.067, p = 0.947$ ). За время обучения экспериментальные мыши прошли в среднем 3306.5 ± 308.6 см, контроль – 3822.8 ± 370.2 см ( $U = 18.00, Z = -0.6, p = 0.549$ ), а при тестировании – в среднем, соответственно, 2767.8 ± 260.7 и 2983.4 ± 366.8 см ( $U = 22.00, Z = -0.067, p = 0.947$ ). В ПКЛ у мышей из экспериментальной и контрольной групп не различались ни средняя скорость движения (олигомеры α-син: 7.5 ± 1.3 см/с, ФР: 5.6 ± 3.9 см/с,  $U = 12.00, Z = -1.592, p = 0.111$ ), ни длина пути, пройденного за 5 мин (олигомеры α-син: 2218.8 ± 380.7 см, ФР: 1679.6 ± 117.0 см,  $U = 12.00, Z = -1.592, p = 0.111$ ).

Сравнение поведение экспериментальных и контрольных мышей в модели РНО выявило различия на уровне тенденции во времени обследования двух объектов при адаптации ( $0.05 < p < 0.1$ ), но не при тестировании через 1 ч ( $p > 0.1$ ). Индексы распознавания также статистически значимо не различались (табл. 1).

При формировании УРПИ среднее ЛВ перехода в темный отсек статистически значимо различалось между группами мышей при обусловливании (оли-

гомеры α-син: 15.8 ± 3.8 с, ФР: 53.6 ± 15.2 с,  $U = 5.5, Z = -2.395, p = 0.017$ ), но не тестировании через 24 ч (олигомеры α-син: 146.4 ± 64.4 с, ФР: 177.3 ± 36.64 с,  $U = 22.0, Z = -0.374, p = 0.708$ ).

В тесте ПКЛ между мышами, которым вводили олигомеры α-син или ФР, выявлены различия на уровне тенденции в продолжительности нахождения в открытых рукавах (олигомеры α-син: 107.5 ± 19.9 с, ФР: 56.7 ± 13.34 с,  $U = 9.00, Z = -1.96, p = 0.05$ ) и индексе предпочтения открытых рукавов (олигомеры α-син: 0.77 ± 0.23, ФР: 0.33 ± 0.09,  $U = 11.00, Z = -1.715, p = 0.083$ ). Мыши из экспериментальной и контрольной групп не различались по количеству входов в открытые рукава лабиринта (олигомеры α-син: 20.2 ± 4.0, ФР: 13.8 ± 2.0,  $U = 15.00, Z = -1.23, p = 0.219$ ), но имели различия на уровне четкой тенденции в количестве заходов в закрытые рукава ПКЛ (олигомеры α-син: 11.4 ± 1.8, ФР: 14.9 ± 2.8,  $U = 20.5, Z = -0.554, p = 0.580$ ).

В нейрохимической части исследования определяли содержание моноаминов и их метаболитов в гиппокампе, фронтальной коре мозга и мозжечке у мышей 3-х месячного возраста, которым интраназально в течение 14-ти дней вводили олигомеры α-син либо ФР. Документировано, что в гиппокампе экспериментальных животных содержание моноаминов и метаболитов DOPAC, HVA и 5-HIAA не отличалось от содержания таковых у контрольных животных. При этом, отмечено статистически значимое снижение уровня метаболита 3-МТ на 53.33% и коэффициента обмена DOPAC/DA на 22.73%, а также выраженное повышение коэффициента обмена серотонина 5-HIAA/5-HT на 96.97% (табл. 2). Во фронтальной коре у экспериментальных мышей зарегистрировано статистически достоверное снижение концентрации DA и его метаболитов DOPAC, HVA на 41.49, 36.36 и 26,92% соответственно.

**Таблица 2.** Влияние хронического интраназального введения олигомеров  $\alpha$ -син на содержание моноаминов и их метаболитов, а также показатели их обмена в гиппокампе, фронтальной коре и мозжечке у 3-х месячных мышей

Группы животных и структуры мозга	Нейромедиаторы, их метаболиты (нМ/г ткани) и показатели обмена (усл. ед.)									
	NA	DA	DOPAC	HVA	3-МТ	5-НТ	5-Н1АА	DOPAC/DA	HVA/DA	5-Н1АА/5-НТ
Гиппокамп										
Физ. раствор	4.46 ± 0.35	0.68 ± 0.38	0.13 ± 0.05	0.73 ± 0.25	0.30 ± 0.25	7.48 ± 0.80	4.94 ± 0.48	0.22 ± 0.06	1.28 ± 0.49	0.66 ± 0.06
Олигомеры $\alpha$ -синуклеина	5.00 ± 0.78	0.63 ± 0.04	0.16 ± 0.01	0.70 ± 0.41	<b>0.14 ± 0.09*</b>	6.79 ± 0.71	4.27 ± 0.42	<b>0.166 ± 0.05*</b>	1.301 ± 0.12	<b>1.301 ± 0.01*</b>
Фронтальная кора										
Физ. раствор	5.53 ± 0.46	27.04 ± 12.98	1.98 ± 0.60	3.90 ± 1.21	0.84 ± 0.54	5.74 ± 0.69	2.66 ± 0.34	0.08 ± 0.02	0.16 ± 0.05	0.46 ± 0.04
Олигомеры $\alpha$ -синуклеина	<b>6.41 ± 1.67</b>	<b>15.82 ± 8.77*</b>	<b>1.26 ± 0.55*</b>	<b>2.854 ± 1.06*</b>	0.88 ± 0.56	5.74 ± 0.99	2.32 ± 0.76	0.102 ± 0.03	<b>0.23 ± 0.09*</b>	0.44 ± 0.10
Мозжечок										
Физ. раствор	5.17 ± 0.44	0.31 ± 0.19	0.23 ± 0.10	0.71 ± 0.18	0.08 ± 0.03	3.31 ± 0.24	2.74 ± 0.81	0.80 ± 0.19	2.67 ± 0.82	0.83 ± 0.14
Олигомеры $\alpha$ -синуклеина	5.07 ± 0.16	0.35 ± 0.16	0.19 ± 0.02	<b>1.18 ± 0.37*</b>	<b>0.18 ± 0.31*</b>	<b>4.21 ± 0.49*</b>	2.65 ± 0.271	<b>0.52 ± 0.27*</b>	<b>1.48 ± 0.69*</b>	<b>0.66 ± 0.12*</b>

Вместе с тем коэффициент обмена дофамина – HVA/DA повысился на 43.75% по сравнению с контролем. Статистически достоверных изменений содержания NA и 5-НТ, метаболитов 3-МТ и 5-Н1АА, а также показателей коэффициентов обмена DOPAC/DA и 5-Н1АА/5-НТ во фронтальной коре не выявлено (табл. 2). В мозжечке мышей, получавших препарат олигомеров  $\alpha$ -син, документировано повышение уровня метаболита 3-МТ более чем в 2 раза (на 212.5%), при том, что статистически значимых изменений других исследованных показателей не отмечено (табл. 2).

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Результаты выполненного исследования демонстрируют, что олигомеры  $\alpha$ -син при хроническом интраназальном введении вызывают у самцов мышей 3-х месячного возраста проявления аффективноподобного поведения с признаками апатии. Мыши, получавшие олигомеры  $\alpha$ -син по сравнению с мышами, получившими ФР, проявляли снижение интереса к исследованию новых объектов в период адаптации в модели РНО, более продолжительное время находились в открытых рукавах, при меньшем количестве посещений закрытых рукавов ПКЛ. Нарушений двигательной активности, кратковременной и долговременной памяти, а также повышения тревожности у этих животных не обнаружено.

Аффективные расстройства (апатия, тревога, депрессия, психозы) являются распространенными

ми немоторными нарушениями при БП, которые наблюдаются на доклинической и клинической стадиях заболевания. Так: распространенность апатии при БП достигает 60%, тревога наблюдается у 20–49% пациентов с БП, а распространенность депрессии в среднем составляет 35%. Аффективные расстройства часто наблюдаются на доклинической стадии БП, опережая характерные двигательные проявления заболевания на 3–6 лет. В качестве основных нейрхимических механизмов формирования аффективных расстройств при БП рассматривают дисбаланс и дисфункцию моноаминергических и ацетилхолинергической систем, а также дефицит моноаминов и нарушение моноаминергической трансмиссии во фронтальной коре мозга, гиппокампе и базальных ядрах. Показано, что различные аффективные расстройства отличаются особенностями нейроанатомической и нейрхимической организации [14–16].

В работе обнаружено, что олигомеры  $\alpha$ -син, вводимые интраназально в течение 14-ти дней, инициируют у мышей 3-х месячного возраста значимые изменения содержания моноаминов и их метаболитов в исследованных церебральных структурах, участвующих в регуляции эмоционального поведения. Так, во фронтальной коре мозга зарегистрировано выраженное снижение уровня DA и его метаболитов DOPAC, HVA, а также повышение коэффициента обмена HVA/DA. В гиппокампе отмечено достоверное снижение содержания метаболита 3-МТ и разнонаправленные изменения коэффициентов обмена DA и 5-НТ. В мозжечке документировано более чем двукратное

повышение 3-МТ – метаболита DA. Выявленные изменения содержания моноаминов и их метаболитов свидетельствует о дефиците DA и нарушении его обмена во фронтальной коре мозга, нарушении обмена DA и 5-НТ в гиппокампе, а также изменение метаболизма DA в мозжечке, что, по-видимому, обуславливает развитие аффективноподобного состояния с признаками апатии у мышей 3-х месячного возраста в условиях хронического введения олигомеров  $\alpha$ -син. Полученные данные указывают, что олигомеры  $\alpha$ -син при хроническом интраназальном введении воспроизводят у 3-х месячных мышей проявления аффективноподобного поведения и нейрохимические изменения, сходные с двигательными нарушениями, которые наблюдаются на доклинической стадии БП.

Документированные экспериментальные факты подтверждают представления о ведущей роли дисбаланса и дисфункции DA- и 5-НТ-ергических систем мозга в развитии немоторных нарушений на доклинической стадии БП [5, 15]. Результаты работы согласуются с современными взглядами о том, что мозжечок вовлечен в патогенез БП. Структурно-функциональные нарушения мозжечка, вызванные дефицитом DA, вносят существенный вклад в развитие не только моторных, но и двигательных симптомов, в том числе аффективных состояний при БП [17].

Считают, что исследования и экспериментальное моделирование немоторных симптомов и нейрохимических основ доклинических двигательных нарушений БП актуальны и перспективны для разработки методов ранней диагностики и патогенетического лечения заболевания [15, 16]. В проведенном нами ранее исследовании было обнаружено, что олигомеры  $\alpha$ -син в условиях аналогичного экспериментального протокола вызывают у мышей 6-ти месячного возраста поведенческие и нейрохимические эффекты сходные с доклиническими, немоторными проявлениями БП. Животные демонстрировали повышение тревожности без признаков нарушения двигательной активности, обучения и памяти. При этом во фронтальной коре мозга зарегистрировано достоверное снижение содержания DA и повышение уровня его метаболитов, а также снижение концентрации DA и его метаболитов в гиппокампе [11].

Таким образом, у мышей 3-х и 6-ти месячного возраста эффекты олигомеров  $\alpha$ -син при хроническом интраназальном введении воспроизводят двигательные доклинические проявления БП, которые, вместе с тем, имеют определенные особенности. Животные 3-х месячного возраста демонстрируют аффективноподобное поведение с признаками апатии с дефицитом DA во фронтальной коре мозга и нарушением его обмена в гиппокампе, фронтальной коре и мозжечке. Тогда как 6-ти месячные мыши проявляли тревожноподобное поведение, ассоциированное с дефицитом DA не только во фронтальной коре, но и в гиппокампе, а также нарушениями обмена DA в

указанных церебральных структурах. Следует отметить, что полученные нами данные подтверждаются фактами о нейроанатомических и нейрохимических особенностях различных аффективных расстройств [14, 16, 18]. Имеющиеся результаты позволяют, на наш взгляд, считать, что характер выявленных у 3-х и 6-ти месячных животных проявлений двигательных доклинических нарушений, наблюдаемых при БП, определяется возрастом начала нейродегенерации вызванной действием олигомеров  $\alpha$ -син при интраназальном введении [3, 7, 8].

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В целом, результаты данной работы и ранее выполненного нами исследования свидетельствуют, что олигомеры  $\alpha$ -син при хроническом интраназальном введении вызывают у мышей 3-х и 6-ти месячного возраста поведенческие и нейрохимические эффекты, которые отличаются особенностями и воспроизводят двигательные проявления, сходные с наблюдаемыми на доклинической стадии БП. Мыши 3-х месячного возраста демонстрируют аффективноподобное поведение с признаками апатии ассоциированное с дефицитом DA и нарушением его обмена во фронтальной коре мозга, нарушением обмена DA и 5-НТ в гиппокампе, а также изменением метаболизма DA в мозжечке. У мышей 6-ти месячного возраста зарегистрировано тревожноподобное поведение, ассоциированное с выраженным снижением концентрации DA и нарушения его обмена в гиппокампе и фронтальной коре мозга. При этом нарушений двигательной активности, обучения и памяти у животных не документировано. Предполагается, что обнаруженные у 3-х и 6-ти месячных животных особенности двигательных доклинических проявлений БП определяются возрастом дебюта нейродегенеративного процесса, вызванного действием олигомеров  $\alpha$ -син.

## БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность профессору Ludmilla Morozova-Roche, Department of Medical Biochemistry and Biophysics, Umee University, Sweden за консультативную и техническую помощь в характеристике препарата олигомеров  $\alpha$ -синуклеина.

## ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена в рамках выполнения государственного задания.

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ

*Конфликт интересов.* Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

*Этическое одобрение.* Все манипуляции с животными были проведены с соблюдением требований, изложенных в директиве по охране животных, используемых в

научных целях (2010/63/EU от 22 сентября 2010 г.), а также в соответствии с правилами, утвержденными комиссией по биоэтике ФГБНУ “Научно-исследовательский институт нормальной физиологии им. П.К. Анохина”.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Global, regional, and national burden of Parkinson's disease, 1990–2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016 // *Lancet Neurol.* 2018. V. 17. № 11. P. 939–953.
2. *Dorsey E.R., Bloem B.R.* // *JAMA Neurol.* 2018. V. 75. № 1. P. 9–10.
3. *Rodriguez M., Rodriguez-Sabate C., Morales I., Sanchez A., Sabate M.* // *Aging Cell.* 2015. Jun. V. 14. № 3. P. 293–308.
4. *Bridi J.C., Hirth F.* // *Front. Neurosci.* 2018. V. 12. P. 12–80.
5. *Grosch J., Winkler J., Kohl Z.* // *Front. Cell. Neurosci.* 2016. V. 10. P. 293.
6. *Brichta L., Greengard P., Flajolet M.* // *Trends in Neurosci.* 2013. V. 36. № 9. P. 543–554.
7. *Schrag A., Schott J.M.* // *Lancet Neurol.* 2006. V. 5. № 4. P. 355–363.
8. *Post B., van den Heuvel L., van Prooije T., van Ruissen X., van de Warrenburg B., Nonnekes J.* // *J. Park. Dis.* 2020. V. 10. № S1. P. 29–36.
9. *Gruden M.A., Davydova T.V., Narkevich V.B., Fomina V.G., Wang C., Kudrin V.S., Morozova-Roshe L.A., Sewell R.D.* // *Behav. Brain Res.* 2014. V. 263. P. 158–168
10. *Sherstnev V.V., Kedrov A.V., Solov'eva O.A., Gruden M.A., Konovalova E.V., Kalinin I.A., Proshin A.T.* // *Neurochem. J.* 2017. V. 11. № 4. P. 282–289
11. *Грудень М.А., Соловьева О.А., Кудрин В.С., Наркевич В.Б., Шерстнев В.В.* // *Нейрохимия.* 2020. Т. 37. № 1. С. 24–31.
12. *Villar-Pique A., da Fonseca T.L., Outeiro T.F.* // *J. Neurochem.* 2016. V. 139. Suppl. 1. P. 240–255.
13. *Gruden M.A., Davydova T.V., Yanamandra K., Kucheryan V.G., Morozova-Roshe L.A., Sherstnev V.V., Sewell R.D.* // *Behav. Brain Res.* 2013. V. 243. P. 205–212.
14. *Gallagher D.A., Schrag A.* // *Neurobiol. Dis.* 2012. V. 46. № 3. P. 581–589
15. *Schapira A.H.V., Chaudhuri K.R., Jenner P.* // *Nat. Rev. Neurosci.* 2017. V. 18. № 7. P. 435–450.
16. *Dujardin K., Sgambato V.* // *Front. Neurosci.* 2020. V. 14. A. 25.
17. *Wu T., Hallett M.* // *Brain.* 2013. V. 136. P. 696–709.
18. *Pagonabarraga J., Kulisevsky J., Strafella A.P., Krack P.* // *Lancet Neurol.* 2015. V. 14. № 5. P. 518–531

## Neurochemical and Behavioral Effects of Alpha-Synuclein Oligomers in Mice of Three Months Age

V. V. Sherstnev<sup>a</sup>, M. A. Gruden<sup>a</sup>, O. A. Solovieva<sup>a</sup>, V. S. Kudrin<sup>b</sup>,  
V. B. Narkevich<sup>b</sup>, N. P. Mikhailova<sup>a</sup>, and A. M. Ratmirov<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Federal State Budget Scientific Institution “P.K. Anokhin Research Institute of Normal Physiology”, Moscow, Russia

<sup>b</sup>Federal State Budget Scientific Institution “V.V. Zakusov Research Institute of Pharmacology”, Moscow, Russia

Parkinson's disease is a widespread, progressive, age-related neurodegenerative disease. The neurochemical basis of motor and non-motor disorders in Parkinson's disease is the dysfunction of many brain neurotransmitter systems and, first of all, the functional deficit and imbalance of monoaminergic systems, which are caused by the degradation and death of certain populations of nerve cells under conditions of misfolding of the protein  $\alpha$ -synuclein and the action of its amyloidogenic neurotoxic conformations. Of particular interest is the study of age-related characteristics of changes in monoaminergic systems and the development of motor and non-motor disorders at the preclinical and clinical stages of the disease. The work studied the effect of  $\alpha$ -synuclein oligomers, administered intranasally for 14 days, on motor activity, emotional state, short- and long-term memory, as well as the content and metabolism of dopamine, serotonin and norepinephrine in the hippocampus, frontal cortex and cerebellum of male C57Bl/6 mice at the age of 3 months. In behavioral experiments, the following models were used: “Open field”, “Recognition of a new object”, “Conditioned reaction of passive avoidance” and “Elevated cruciform maze”. The content of monoamines and their metabolites in the brain tissue of animals was determined by high performance liquid chromatography with electro-magnetic detection. It was found that mice treated with  $\alpha$ -synuclein oligomers showed manifestations of affective-like behavior with signs of apathy. Alterations of motor activity, short-term and long-term memory, and an increase in anxiety in animals have not been documented. Oligomers of  $\alpha$ -synuclein caused a significant decrease in the content of dopamine and its metabolites DOPAC and HVA in the frontal cortex, as well as a decrease in the concentration of the dopamine metabolite, 3-MT, and multidirectional changes in serotonin and dopamine metabolism in the hippocampus. At the same time, a significant increase in the content of 3-MT in the cerebellum was recorded. A comparative analysis of the data obtained in this work and the experimental facts revealed in our earlier study of the neurochemical and behavioral effects of  $\alpha$ -synuclein oligomers in 6-month-old mice was carried out. The results obtained indicate that oligomers of  $\alpha$ -synuclein, when administered chronic intranasally, cause non-motor disorders and neurochemical changes in mice of 3 months of age, which are observed at the preclinical stage of PD.

**Keywords:**  $\alpha$ -synuclein, oligomers, monoamines, locomotor activity, affective-like behavior, memory, 3-month-old mice, Parkinson's disease