

УДК 577.2 +616.8-092+612.821(082)

Динамика изменений параметров походки у мышей линии C57BL/6J при интраназальном введении олигомерных форм белка альфа-синуклеина

Михайлова Н.П., Ратмиров А.М., Грудень М.А., Шерстнев В.В.

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«Научно-исследовательский институт нормальной физиологии имени П.К. Анохина»
125315, Москва, ул. Балтийская, д. 8

Нарушения походки являются характерными, часто встречаемыми и наиболее инвалидизирующими признаками болезни Паркинсона (БП) – широко распространенного хронического прогрессирующего нейродегенеративного заболевания. Показатели нарушений походки используются для прогноза развития, исхода болезни и оценки эффективности проводимого лечения. Исследования долговременной динамики нарушений походки на экспериментальных моделях БП немногочисленны, ограничиваются изучением коротких временных периодов несопоставимых с хроническим многолетним течением болезни у человека.

Цель работы – исследование параметров нарушения походки и особенностей их динамики в течение девятимесячного периода у половозрелых мышей при моделировании БП путём хронического интраназального введения амилоидогенных олигомеров белка α -синуклеина.

Материалы и методы. Самцам мышей C57BL/6J трёхмесячного возраста в течение 14 дней интраназально вводили раствор олигомеров рекомбинантного α -синуклеина либо физиологический раствор (ФР) с последующим тестированием походки (модификация footprint test) в возрасте 4, 9 и 12 месяцев. Для анализа походки использовали программы RecognitionOfSteps и EthoVision.

Результаты исследования. В возрасте 4 месяцев у мышей, получавших олигомеры α -синуклеина, по сравнению с животными, получавшими ФР, документированы начальные проявления нарушений походки – наблюдались тенденции к сокращению длины шага задних лап и длины первого шага правой задней лапы; в возрасте 9 месяцев документировано одно из характерных нарушений походки – сокращение длины шага всех лап; в возрасте 12 месяцев выявлены показатели неустойчивости походки – увеличение расстояния между центрами отпечатков правых лап, тенденции увеличения ширины шага задних лап и увеличения средней относительной извилистости пути.

Заключение. При экспериментальном моделировании БП путём хронического интраназального введения олигомеров α -синуклеина самцам линии C57BL/6J трёхмесячного возраста, обнаружены нарушения походки и особенности их динамики в течение девятимесячного периода исследования, сходные с клиническими проявлениями прогрессирующей дисфункций походки, наблюдаемыми на ранних и развёрнутых стадиях БП у человека.

Ключевые слова: болезнь Паркинсона; нарушения походки; олигомеры α -синуклеина; footprint test; мыши C57BL/6J.

Для цитирования: Михайлова Н.П., Ратмиров А.М., Грудень М.А., Шерстнев В.В. Динамика изменений параметров походки у мышей линии C57BL/6J при интраназальном введении олигомерных форм белка альфа-синуклеина. Патогенез. 2023; 21(1): 28-36.

DOI: 10.25557/2310-0435.2023.01.28-36

Для корреспонденции: Михайлова Наталия Павловна, e-mail: natali.ivli@gmail.com

Финансирование. Работа выполнена при выполнении госзадания. ФГБНУ «НИИ нормальной физиологии имени П.К. Анохина».

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Благодарности. Авторы выражают благодарность сотрудникам Института биоорганической химии им. академиком М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН: к.б.н. Моисеевой Е.В., Аронову Д.А. за консультации и методические рекомендации; Соловьевой А.С. за предоставление доступа к программе RecognitionOfSteps и консультации по работе с данной программой; Соловьевой О.А., н.с. ФГБНУ «НИИ нормальной физиологии им. П.К. Анохина», за содействие и рекомендации при выполнении работы; Сторожевой З.И. д.б.н., в.н.с. ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр психиатрии и наркологии имени В.П. Сербского» за консультации в вопросах статистической обработки.

Поступила: 01.11.2022

Dynamic changes of gait parameters in C57BL/6J mice after intranasal administration of oligomeric forms of alpha-synuclein protein

Mikhaylova N.P., Ratmirov A.M., Gruden M.A., Sherstnev V.V.

P.K. Anokhin Institute of Normal Physiology,
Baltiyskaya St. 8, Moscow 125315, Russian Federation

Gait disorders are characteristic, common, and most disabling motor symptoms of Parkinson's disease (PD). PD is a widespread chronic, progressive neurodegenerative disease. Manifestations of gait disorders are used to predict the development and outcome of the disease and to evaluate the effect of treatment. Studies of long-term changes in gait disorders on experimental models of PD are scarce and limited to short periods that cannot be compared to chronic, long-term course of the disease.

The aim of this work was to study gait disorders and their changes during a nine-month period on a PD model produced by chronic intranasal administration of α -synuclein oligomers to mature mice.

Methods. A solution of recombinant α -synuclein oligomers (or saline (S) in the control group) was administered intranasally for 14 days to male 3-month-old C57Bl/6 mice, followed by gait testing (modified "footprint test") at ages of 4, 9, and 12 months. The RecognitionOfSteps and EthoVision software was used for gait analysis.

Results. At age of 4 months, the mice treated with α -synuclein oligomers, compared with the animals treated with S, showed initial manifestations of gait disorders, a tendency to reducing the step length of the hindlimbs and the length of the first step of the right hindlimb; at age of 9 months, one of the main gait disorders was found, decreases in the step length of all limbs; at age of 12 months, signs of gait instability were observed, increased distance between the centers of the right paw prints, increased step width of the hindlimbs, and increased average relative meander of the path.

Conclusion. In experimental modeling of PD by chronic intranasal administration of α -synuclein oligomers, three-month-old male mice demonstrate progressive gait disorders and their specific features during the nine-month study period. These disorders are similar to clinical manifestations of progressive gait dysfunction observed in the early and advanced PD and age-dependent.

Keywords: Parkinson's disease; gait disorders; α -synuclein oligomers; footprint test; C57Bl/6J mice.

For citation: Mikhaylova N.P., Ratmirov A.M., Gruden M.A., Sherstnev V.V. [Dynamic changes of gait parameters in C57Bl/6J mice after intranasal administration of oligomeric forms of alpha-synuclein protein]. *Patogenez [Pathogenesis]*. 2023; 21(1): 28-36. (in Russian)

DOI: 10.25557/2310-0435.2023.01.28-36

For correspondence: Mikhaylova Nataliya Pavlovna, e-mail: natali.ivli@gmail.com

Funding. The study was a part of the Government Assignment of the Anokhin Institute of Normal Physiology.

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

Acknowledgments. The authors are grateful to the associates of the Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Moiseeva E.V., PhD and Aronov D.A. for their consultations and methodical recommendations; Solovieva A.S. for providing access to the RecognitionOfSteps software and the advice on using this software; Storozheva Z.I., Leading Researcher of the Serbsky National Medical Research Centre for Psychiatry and Narcology for advice on statistical processing; and Solovieva O.A., Researcher of the Anokhin Institute of Normal Physiology for assistance and recommendations at all stages of the work.

Received: 01.11.2022

Введение

Нарушения походки являются одними из наиболее часто встречаемых и характерных двигательных нарушений при болезни Паркинсона. Болезнь Паркинсона (БП) – хроническое прогрессирующее нейродегенеративное заболевание, неизлечимое на сегодняшний день. БП занимает второе место по частоте встречаемости и первое по приросту распространенности, инвалидизации и смертности среди неврологических заболеваний. Выраженность нарушений походки в значительной мере определяет тяжесть состояния и качество жизни пациентов с БП [1, 2].

БП характеризуется широким спектром нарушений ходьбы, которые наблюдаются на всех клинических стадиях заболевания. На ранних стадиях БП нарушения походки проявляются замедлением скорости ходьбы, сокращением длины шага, уменьшением высоты шагов, ахейрокинезом. На развернутых и поздних стадиях отмечаются проявления неустойчивости ходьбы – изменения ширины шага и вариабельность цикла шага, а также затруднение инициации движения и застывания, что связано с развитием постуральной неустойчивости. Степень выраженности нарушений походки у пациентов с БП достоверно коррелирует с темпом прогрессирования болезни и может являться прогностическим показателем заболевания. На основании показателей нарушений походки выделяют подтипы БП, что представляется важным для разработки подходов персонализированного лечения [2-4].

БП – наиболее зависимое от возраста заболевание. Возраст является одним из основных факторов риска развития дисфункций походки при БП. Выявлена значимая положительная взаимосвязь между возрастом па-

циента с БП и тяжестью нарушений походки, а также развитием постуральных нарушений [5, 6].

Таким образом, исследования нарушений походки и анализ ходьбы при БП актуальны и перспективны для клинической диагностики заболевания, прогнозирования его течения, оценки эффективности проводимой терапии, а также разработки новых методов лечения. Вместе с тем успехи реализации указанных исследований непосредственно связаны с возможностью экспериментального изучения дисфункций походки и других моторных нарушений на адекватных животных моделях БП [7, 8].

подавляющее большинство имеющихся к настоящему времени экспериментальных исследований нарушений ходьбы при БП выполнено на нейротоксических моделях БП, полученных на основе введения в организм мышей или крыс специфических либо неспецифических для дофаминергических нейронов токсинов. Следует отметить, что нейротоксические, как и другие имеющиеся модели БП, воспроизводят лишь некоторые из многочисленных проявлений нарушений походки, наблюдаемых у пациентов с БП [9, 10].

В ряде работ, проведенных на различных нейротоксических моделях БП, осуществлена количественная оценка пространственно-временных параметров походки и выявлены показатели дисфункции походки, соответствующие проявлениям нарушений ходьбы при БП [11-13]. Имеются немногочисленные исследования динамики походки в условиях экспериментального моделирования БП, с помощью нейротоксических моделей. Однако эти исследования проводили лишь в течение коротких временных периодов – от 1 до 6 недель жизни животных (мыши, крысы) после процедур введения нейротоксинов, что с учетом видовой продолжи-

тельности жизни этих грызунов не сопоставимо с хроническим, прогрессирующим на протяжении многих лет, течением заболевания у пациентов с БП [14-17].

Ранее нами была разработана оригинальная модель БП, созданная путем интраназального хронического введения амилоидогенных конформационных форм (фибрилл и/или олигомеров) рекомбинантного белка α -синуклеина (α -син) стареющим животным [18]. Считают, что гиперэкспрессия и мисфолдинг α -син с образованием его амилоидогенных нейротоксических конформаций, вызывающих гибель дофаминергических и других популяций нервных клеток, являются одним из ключевых механизмов развития молекулярного патогенеза БП. При этом полагают, что патологический процесс инициируется назальным путем [19, 20]. Разработанная экспериментальная модель воспроизводит ряд поведенческих, морфологических и нейрохимических признаков, характерных для БП. Показано, что олигомеры α -син, вводимые интраназально в течение 14 дней, вызывают у самцов мышей 12-месячного возраста снижение на 10-12% по сравнению с контролем числа дофаминергических нейронов в компактной части черной субстанции мозга, выраженные изменения содержания моноаминов и их метаболитов в черной субстанции и стриатуме, нарушение нейрогенеза в зубчатой фасции гиппокампа, а также нарушения двигательной активности, долговременной памяти и повышения тревожности [21-23].

Основываясь на вышеизложенном, целью данной работы явилось исследование параметров нарушений походки и особенностей их динамики в течение девяти-месячного периода у половозрелых мышей при моделировании БП путём хронического интраназального введения амилоидогенных олигомеров белка α -синуклеина.

Материалы и методы исследования

Работа проведена на 19 самцах мышей линии C57Bl/6J (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. Тестирование проводили в дневное время в знакомом помещении со слабым рассеянным светом (12-16 лк) после получасовой адаптации к помещению экспериментальной комнаты в течение получаса и более. Все манипуляции с животными были проведены с соблюдением требований, изложенных в директиве Европейского Сообщества по охране животных, используемых в научных целях (2010/63/ EU от 22 сентября 2010 г.), а также в соответствии с требованиями, утвержденными комиссией по биоэтике ФГБНУ «Научно-исследовательский институт нормальной физиологии им. П.К. Анохина» (протокол №1 от 03.09.2005).

В возрасте 3 месяцев мыши массой тела 19-24 г были случайным образом разделены на две группы. В одной клетке содержались животные, получавшие оди-

наковые вещества. В течение 14 дней, ежедневно, мышам поочередно интраназально вводили 8 мкл 0,9% изотонического раствора NaCl (ФР) ($n = 9$) или приготовленный на его основе раствор олигомеров α -син, (8 мкл, 0,48 мг/кг), ($n = 10$). Олигомеры α -Syn были приготовлены из рекомбинантного белка α -син в соответствии с ранее разработанным протоколом [21]. Тестирование походки проводилось трижды: через 10 дней после окончания введения растворов (в возрасте 4 месяцев), через 6 месяцев (в 9-месячном возрасте; n (α -син) = 9, n (ФР) = 9) и спустя 9 месяцев (в 12-месячном возрасте; n (α -син) = 7, n (ФР) = 8).

Тестирование походки проводилось при помощи модификации теста отпечатков лап (footprint test) [24]. Установка для тестирования представляла собой коридор (6 × 60 см) с прозрачными стенками, пол которого застелен полоской бумаги соответствующего размера, после каждой пробежки животного проводили замену бумаги. Перед каждой пробежкой лапы животных окрашивали безопасной детской «пальчиковой» краской (Erich Krause, Россия) двумя контрастными цветами, передние – синим, а задние – красным. После окрашивания лап животное помещали в начало коридора. В конце коридора располагается отсек (10 × 10 см), при попадании мыши в который пробег заканчивался. Максимальное время нахождения животного в установке составляло 40 с.

С помощью программного обеспечения EthoVision XT8 (Noldus IT, Нидерланды) осуществлялась видеозапись экспериментов с построением пройденного пути по центральной точке тела мыши. Каждое животное совершало 2 пробежки, в редких случаях, когда животное не проходило коридор за отведенное время – 3 пробежки, из которых выбирали 1-2 с более четкими отпечатками лап. В дальнейшем анализе учитывались только те пробежки, где мышь совершила хотя бы 4 шага (размах 4-12 шагов). Для дальнейшей обработки полученных отпечатков находили центр каждого отпечатка как пересечение линий – «горизонтальной» (линия проводится между следами крайних подушечек пальцев) и «вертикальной» (линия проходит между следами центральных пальцев к плюсневой кости для передних лап и от вершины среднего пальца в сторону скакательного сустава для задних). Фрагмент с отпечатками лап представлен на **рис. 1**. Полоски бумаги с отпечатками лап разделяли на две равные части – начало и конец пробежки, которые затем сканировали с помощью сканера Canon Lide 110 (Canon Inc., Япония). Отсканированные изображения в формате *.jpg обрабатывали с помощью программы RecognitionOfSteps [25, 26]. Таким образом были получены параметры длины шага передних и задних лап (с правой и левой сторон и среднее значение, мм) и ширины шага передних и задних лап (мм), а также величина первого шага (мм), рассматриваемая как отдельная переменная для каждой лапы. Дополнительно вручную подсчитывали расстояние между центрами передних и задних лап (overlap), для правой и левой стороны

(мм). На основе полученных значений рассчитывался индекс асимметрии (Инас) как отношение величины расстояния между центрами передней и задней лап с правой стороны к величине того же параметра с левой (Инас = $\text{overlap}_R / \text{overlap}_L$). В программе EthoVision XT8 рассчитывали скорость (см/с), среднюю величину и вариативность относительной извилистости пройденного пути (изменение направления пути животного относительного пройденного им расстояния) (град/см, (град/см)² соответственно), суммарную и среднюю длительность сниженной двигательной активности (периоды времени, когда скорость перемещения центральной точки тела ниже 1,75 см/с) (с), частоту эпизодов сниженной двигательной активности и латентное время до первого такого эпизода (с). Всего было рассчитано 22 пространственно-временных параметра походки.

Статистический анализ полученных результатов проводили с помощью программы IBM SPSS Statistics 22 (SPSS Inc., США) и MS Excel 2016. Проверка нормальности распределения проводилась по критерию Шапиро-Уилка, большинство распределений рассматриваемых параметров значимо отличались от нормального. Данные представлены как медиана (Me) и межквартильный интервал (IQR). Определение уровня различий между группами в разные возрастные периоды производилось с помощью статистического критерия Манна-Уитни для двух независимых выборок. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$, учитывали различия на уровне статистической тенденции при $p < 0,1$.

Результаты исследования

Первое тестирование походки у мышей было проведено через 10 дней после окончания введения веществ; в группе с введением олигомеров α -син ($n = 10$) было проведено 20 пробежек, все пробежки были ото-

браны для дальнейшего анализа, в контрольной группе ($n = 9$) проведено 22 пробежки, из которых 17 были отобраны для дальнейшего анализа.

В возрасте 4 месяцев между группой животных с введением олигомеров α -син и контрольной группой не было выявлено статистически достоверных отличий в параметрах походки (средняя длина шага передних лап, ширина шагов передних и задних лап, расстояние между центрами передних и задних лап с правой и левой сторон, $p > 0,1$) и показателях двигательной активности (скорость, длительность и частота сниженной двигательной активности, относительная извилистость пути, $p > 0,1$). Вместе с тем, на уровне статистической тенденции были обнаружены различия двух показателей походки: сокращение средней длины шага задних лап (рис. 2; $p = 0,08$) и длины первого шага правой задней лапы (олигомеры α -син: Me = 49,15; IQR = 25,69, ФП: Me = 57,47; IQR = 28,74; $p = 0,09$).

Второе тестирование походки было проведено через 6 месяцев после окончания введения веществ; в группе с введением олигомеров α -син ($n = 9$) было проведено 18 пробежек, в контрольной группе ($n = 9$) – 20 пробежек, в обеих группах для дальнейшего анализа были взяты все пробежки.

В возрасте 9 месяцев у мышей, получавших олигомеры α -син документировано выраженное сокращение длины шага всех лап по сравнению с контрольными животными. Так, обнаружено значимое сокращение средней длины шага передних (рис. 3; $p < 0,01$) и задних лап (рис. 2; $p = 0,001$), длины шага правой (олигомеры α -син: Me = 52,41; IQR = 14,79, ФП: Me = 61,00; IQR = 12,97; $p < 0,01$) и левой передних лап (олигомеры α -син: Me = 50,48; IQR = 15,75, ФП: Me = 61,49; IQR = 9,77; $p < 0,01$), длины шага правой (олигомеры α -син: Me = 47,80; IQR = 16,60, ФП: Me = 63,12; IQR = 15,07, $p < 0,001$) и левой задних лап (олигоме-

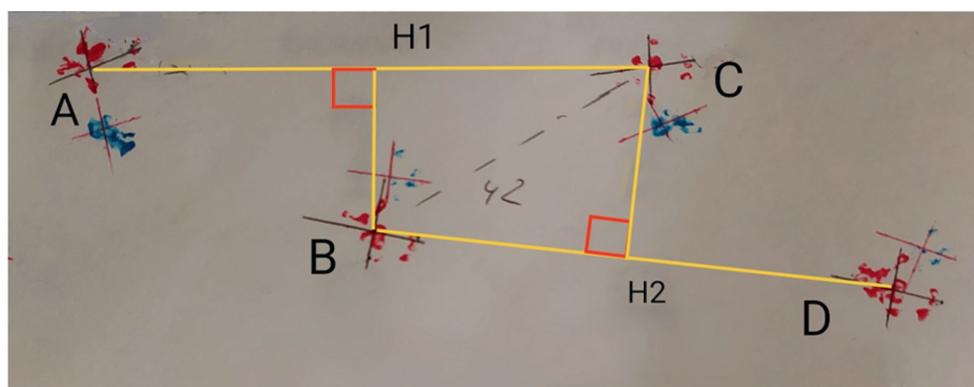


Рис. 1. Фрагмент отпечатков конечностей после пробежки мыши по коридору. А, С – обозначены последовательные отпечатки левых лап, В, D – отпечатки правых. Центры отпечатков находятся на пересечении черных (задние) и красных (передние) линий. Желтыми линиями обозначены длина и ширина шагов: длина шага задних лап продемонстрирована отрезками А-С (левой лапы), В-D (правой лапы). На отрезки длин шагов из противоположных точек В и С опущены перпендикуляры в точки Н1, Н2. Таким образом получены величины ширины шага задних лап, представленные отрезками В-Н1, С-Н2. Величины параметров шагов передних лап рассчитываются аналогичным образом. Пунктирной линией указан отрезок, по которому проводили калибровку программы RecognitionOfSteps.

ры α -син: Me = 49,64; IQR = 18,76, ФР: Me = 60,57; IQR = 16,01; $p < 0,01$). При этом не выявлено достоверных различий в других исследуемых параметрах ($p > 0,1$).

Третье тестирование походки было выполнено через 9 месяцев после окончания введения веществ; в группе с введением олигомеров α -син ($n = 7$) было проведено 16 пробежек, 15 из которых были взя-

ты для дальнейшего анализа, в контрольной группе ($n = 8$) – 21 пробежек, 19 из них были отобраны для дальнейшего анализа.

В возрасте 12 месяцев у мышей, которым вводили олигомеры α -син, по сравнению с контролем обнаружено статистически значимое увеличение расстояния между центрами передней и задней правых лап (рис. 4; $p = 0,03$),

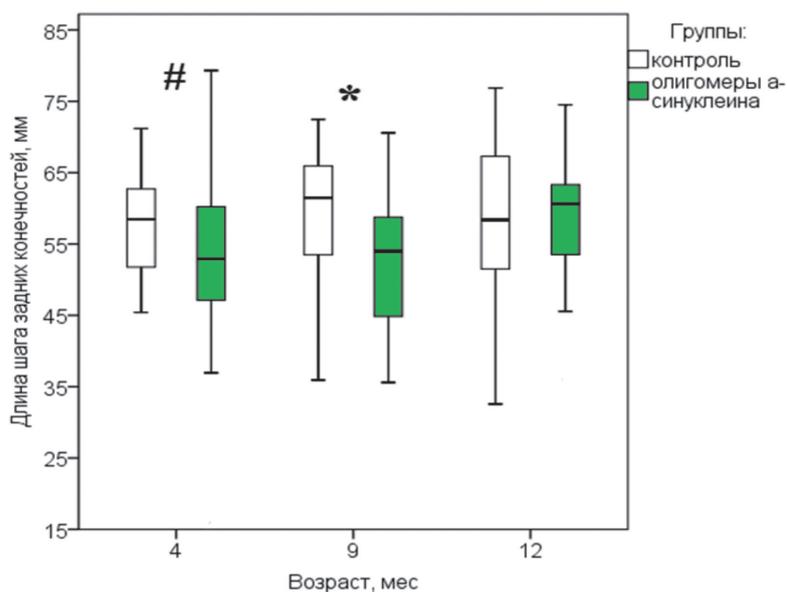


Рис. 2. Длина шага задних лап. На графике представлены распределения длины шага задних лап группы контроля (белые столбцы) и группы с введением олигомеров α -син (зелёные столбцы) в 4, 9, 12 месяцев. По оси абсцисс обозначен возраст животных в месяцах, по оси ординат – средняя длина шага задних лап (мм). Медиана указана чертой, межквартильный интервал – границы блока; «усы» – 95% доверительный интервал. Символом «*» обозначены достоверные отличия $p < 0,05$ между экспериментальными группами по критерию Манна-Уитни; символом «#» обозначены отличия на уровне $0,05 < p < 0,1$.

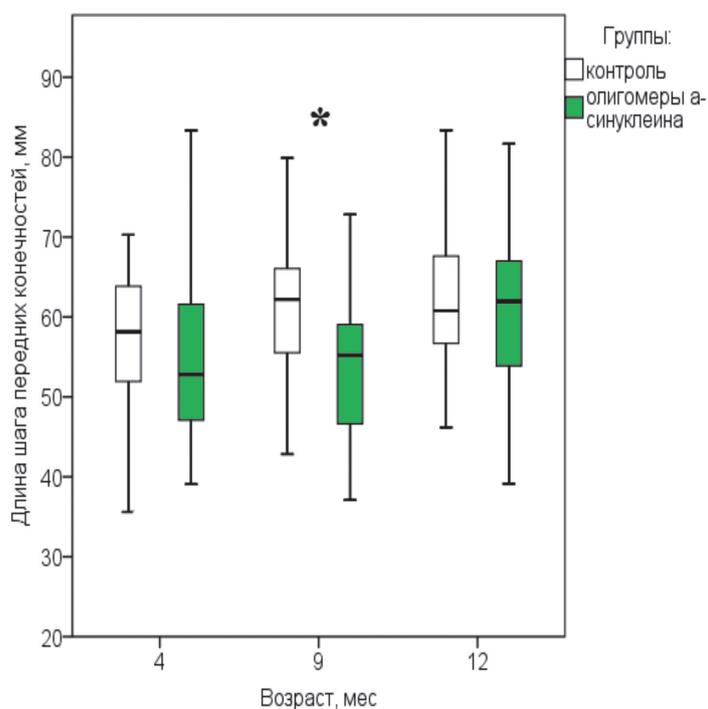


Рис. 3. Длина шага передних лап. Обозначения – как на рис. 2.

а также на уровне тенденции – увеличение ширины шага задних лап (**рис. 5**; $p = 0,08$) и увеличение средней относительной извилистости пути (олигомеры α -син: $Me = -20,00$; $IQR = 225,82$; ΦP : $Me = -99,62$; $IQR = 376,65$; $p = 0,07$). В 12-месячном возрасте между группами животных по другим исследуемым параметрам не документировано достоверных отличий ($p > 0,1$).

Обсуждение

В выполненном нами исследовании показано, что у самцов мышей 4-месячного возраста через 10 дней по-

сле окончания хронического интраназального введения олигомеров α -син наблюдались начальные проявления нарушений походки, характеризующиеся статистической тенденцией сокращения длины шага задних лап и длины первого шага правой задней лапы. Спустя полгода после введения растворов, животные в 9-месячном возрасте, получавшие олигомеры α -син, демонстрируют отчетливые признаки нарушений походки – высоко достоверное сокращение длины шага как передних, так и задних лап. В возрасте года, через 9 месяцев после получения олигомеров α -син, у мышей были обнаружены признаки неустойчивости походки – зна-

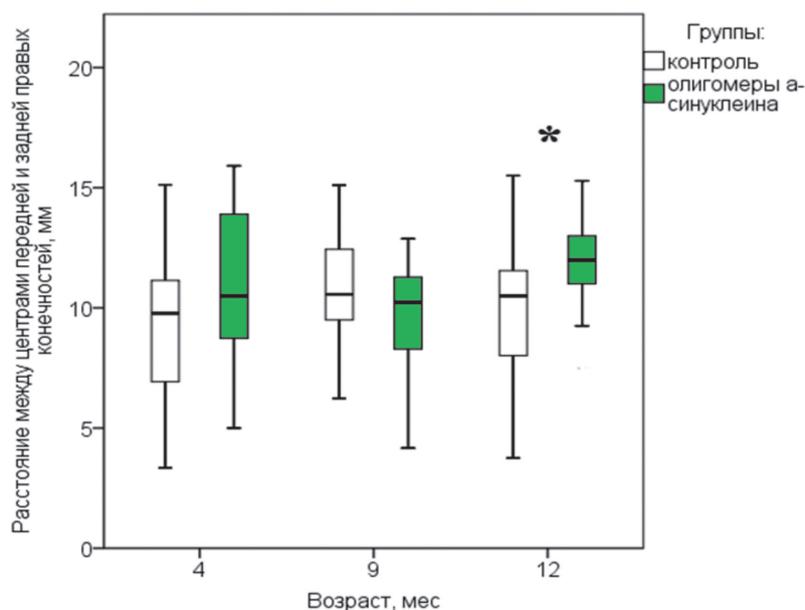


Рис. 4. Величина расстояния между центрами отпечатков передней и задней правых лап. Обозначения – как на **рис. 2**.

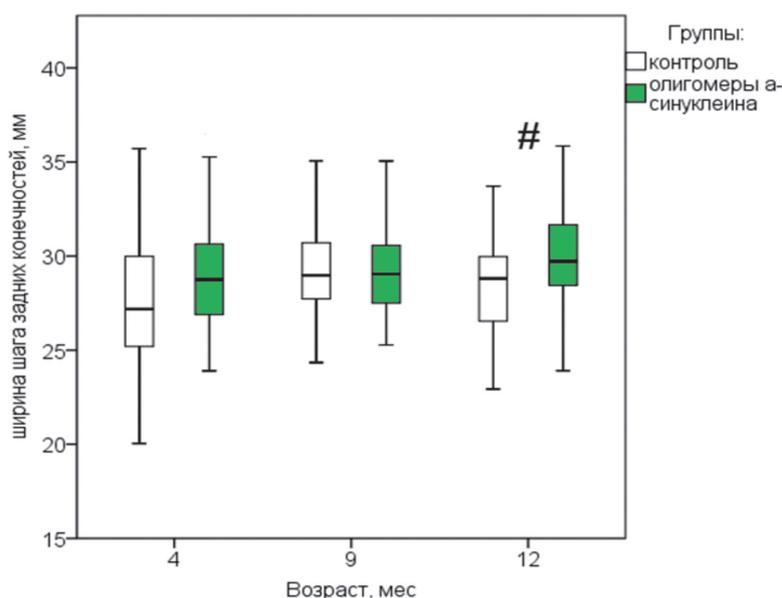


Рис. 5. Ширина шага задних лап. Обозначения – как на **рис. 2**.

чимое увеличение расстояния между центрами передней и задней лап с правой стороны, а также на уровне тенденции увеличение ширины шага задних лап и возрастание извилистости пути. Следует отметить, что наблюдаемые у животных, получавших олигомеры α -син, в 4- и 12-месячном возрасте показатели изменений походки характеризуются односторонним проявлением и асимметричностью.

В работе была проведена количественная оценка динамики показателей походки у мышей в течение 9-месячного периода после введения веществ в 3-месячном возрасте. Документировано прогрессирующее развитие нарушений походки у животных, получавших олигомеры α -син – выявление в течение периода наблюдения более выраженных (сокращение шага) и тяжелых (проявления неустойчивости) нарушений походки. При этом темп и направленность динамики отдельных показателей походки были различны, что отражает особенности динамики дисфункций походки у пациентов с БП на ранних и развернутых стадиях заболевания. Так, в период от 4 до 9 месяцев обнаружено выраженное прогрессирование сокращения длины шага и отсутствие изменений сокращения длины первого шага – показателя вариативности шагов и затруднения инициации движения. В период от 9 до 12 месяцев выявлены проявления неустойчивости походки и увеличение извилистости пути (показателя нарушения координации движения) при отсутствии значимого сокращения длины шага.

Согласно современным клиническим данным нарушения ходьбы у пациентов с БП часто проявляются замедлением скорости ходьбы и укорочением длины шага – одними из ключевых параметров дисфункций походки при БП. Считают, что снижение скорости ходьбы преимущественно связано с уменьшением длины шага. На ранних стадиях БП симптомы нарушений походки, в частности укорочение длины шага, часто бывают односторонними, но по мере прогрессирования заболевания проявляются в обеих конечностях. Начальные проявления вариативности шагов могут наблюдаться уже на ранних стадиях болезни. Однако значимые повышения вариативности параметров цикла шага характерны для развернутых и поздних стадий БП, когда происходит нарушение постуральных синергий, что проявляется неустойчивостью ходьбы, застываниями, а также падениями. Ранние и развернутые стадии БП характеризуются неравномерным и разнонаправленным развитием различных пространственно-временных показателей ходьбы, что приводит к усилению одних и снижению других симптомов, выявляемых на ранней стадии заболевания [3, 27].

Таким образом, полученные данные свидетельствуют, что в условиях экспериментального моделирования БП, путем хронического интраназального введения олигомеров α -син 3-месячным самцам линии C57Bl/6J, животные демонстрируют нарушения походки, при этом особенности их развития, наблюдаемые в течение 9 месяцев, сходны с клиническими проявлениями прогрес-

сирующих дисфункций походки на ранних и развернутых стадиях БП у человека.

Динамика нарушений походки при моделировании БП к настоящему времени изучена лишь в немногочисленных работах, выполненных на нескольких нейротоксических моделях. При этом в отличие от нашей работы, исследование динамики дисфункций походки осуществляли в течение коротких временных периодов – от 1 до 6 недель жизни взрослых мышей и/или крыс, что с учетом видовой продолжительности жизни соответствует 3-4 годам жизни человека [28, 29]. БП является хроническим прогрессирующим нейродегенеративным заболеванием, продолжительность течения ранних и развернутых стадий которого может составлять более 25 лет [17]. Полученные в указанных работах данные не позволяют оценить динамику нарушений походки в течение многолетнего прогрессирования БП, а также особенности развития дисфункций походки на различных стадиях заболевания. Вместе с тем, важно отметить, что большинство животных моделей нарушений ходьбы, обусловленных БП, воспроизводят многочисленные симптомы характерные для развернутых и конечных стадий БП.

Так, Wang H. и соавторы с помощью автоматизированной системы CatWalk провели количественную оценку 22 статических и динамических параметров походки у молодых самцов мышей через 1 и 3 недели после 5-дневного внутрибрюшинного введения нейротоксина МФТП (МРТР-НС1; 30 мг/кг). Обнаружено, что через неделю после введения веществ животные, получавшие МФТП, по сравнению с контролем демонстрировали снижение скорости ходьбы и повышение её вариативности, уменьшение длины шага и снижение частоты шага, что соответствует характерным проявлениям нарушений походки при БП. У мышей, получавших нейротоксин, были документированы показатели постуральной неустойчивости и задержки динамических показателей походки сходные с симптомами постуральных нарушений и замирания походки, наблюдаемыми у пациентов с БП на развернутых и поздних стадиях заболевания. Выявленные нарушения походки сохранялись у животных спустя 3 недели после введения нейротоксина [16].

На модели БП, полученной путем введения 6-ГДА (16мкг/3,2мкл) в медиальный пучок переднего мозга самцам крыс в возрасте 8-11 недель исследовали нарушения походки в течение 6 недель после введения веществ. Используя систему CatWalk, на основе анализа следов оценивали 47 параметров походки. Через неделю после введения растворов у животных из группы, получавших 6-ГДА, по сравнению с группой, получавшей ФР, документировано значительное снижение скорости ходьбы и частоты шагов, сокращение длины шага всех лап, нарушение межконечностной координации, а также достоверное изменение параметров походки, соответствующих «шаркающим» шагам и постуральной неустойчивости, наблюдаемыми при БП. С 1-й до 6-й недели на-

блюдения, у крыс, получавших нейротоксин, не было выявлено прогрессирования нарушений походки [15].

Goldenhuis W.J. с соавторами с помощью видео-биомеханического анализа исследовали динамику пространственно-временных показателей походки у взрослых мышей в течение 7 дней после однократного внутривентрикулярного введения МФТП (35 мг/кг). Обнаружено, что самцы мышей 3–4-месячного возраста спустя 24 часа после введения нейротоксина демонстрировали снижение скорости ходьбы, сокращение длины и частоты шага, проявления «шаркающей» походки и постурального дисбаланса. Исходные нарушения походки прогрессировали в течение семидневного периода [11]. При моделировании БП путем одностороннего введения 6-ГДА (4 мкл, 2мкг/мкл) в медиальный пучок переднего мозга молодым самцам крыс Wistar изучали изменения пространственно-временных параметров походки в течение 6 недель после инъекции нейротоксина. У крыс, получавших 6-ГДА, наблюдали: снижение скорости, сокращение длины шага, нарушение межконечностной координации и неустойчивость ходьбы. Нарушения походки проявлялись в первый день после введения 6-ГДА, постепенно усиливаясь в течение 4–х недель, до окончания периода исследования [14].

Заключение

Полученные результаты свидетельствуют, что при экспериментальном моделировании БП, путем хронического интраназального введения олигомеров α -син самцам мышей 3-месячного возраста, мыши демонстрируют нарушения походки и особенности ее изменений в течение 9-месячного периода, имеют сходство с клиническими проявлениями прогрессирования дисфункций походки, наблюдаемыми у пациентов с БП на ранних и развернутых стадиях заболевания. Используемая в работе модель, по сравнению с имеющимися моделями БП, применяемыми для изучения динамики нарушений походки, более адекватно воспроизводит симптомы нарушений походки и их прогрессирующее развитие в период начальных и развернутых стадий БП.

Список литературы

1. Dorsey E.R., Bloem B.R. The Parkinson pandemic – a call to action. *JAMA Neurol.* 2018; 75(1): 9–10. DOI: 10.1001/jamaneurol.2017.3299
2. Grabli D., Karachi C., Welter M.L. Normal and pathological gait: what we learn from Parkinson's disease. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry.* 2012; 83(10): 979–985. DOI: 10.1136/jnnp-2012-302263
3. Mirelman A., Bonato P., Camicioli R., Ellis T.D., Hamilton J.L., Hausdorff J.M., Pelosin E., Almedia Q. Gait impairments in Parkinson's disease. *Lancet Neurol.* 2019; 18: 697–708. DOI: 10.1016/S1474-4422(19)30044-4
4. Pistacchi M., Gioulis M., Sanson F., De Giovannini E., Filippi G., Rossetto F., Marsala S.Z. Gait analysis and clinical correlations in early Parkinson's disease. *Funct. Neurol.* 2017; 32(1): 28–34. DOI: 10.11138/fneur/2017.32.1.028
5. Levy G., Louise E.D., Cote L., Perez M., Mejia-Santana H., Andrews H., Harris J., Waters C. Contribution of aging to the severity of different motor signs in Parkinson disease. *Arch. Neurol.* 2005; 62(3): 467–472. DOI: 10.1001/archneur.62.3.467
6. Levy G. The relationship of Parkinson disease with aging. *Arch. Neurol.* 2007; 64(9): 1242–1246. DOI: 10.1001/archneur.64.9.1242

7. Gubellini P., Kachidian P. Animal models of Parkinson's disease: An updated overview. *Revue Neurologique.* 2015; 171(11): 750–761. DOI: 10.1016/j.neurol.2015.07.011
8. Chia S.J., Tan E.K., Chao Y.X. Historical perspective: models of Parkinson's disease. *Int. J. Mol. Sci.* 2020; 21(7): 2464. DOI: 10.3390/ijms21072464
9. Le W., Sayana P., Jankovic J. Animal models of Parkinson's disease: a gateway to therapeutics? *NeuroTherapeutics.* 2013; 11: 92–110. DOI: 10.1007/s13311-013-0234-1
10. Zeng X.S., Geng W.S., Jia J.J. Neurotoxin-induced animal models of Parkinson disease: Pathogenic mechanism and assessment. *ASN Neuro.* 2018; 10: 1–15. DOI: 10.1177/1759091418777438
11. Goldenhuys W.J., Guseman T.L., Pienaar I.S., Dluzen DE, Young J.W. A novel biomechanical analysis of gait changes in the MPTP mouse model of Parkinson's disease. *PeerJ.* 2015; 3: e1175 DOI: 10.7717/peerj.1175
12. Zhou M., Zhang W., Chang J., Wang J., Zheng W., Yang Y., Wen P., Li M., Xiao H. Gait analysis in three different 6-hydroxydopamine rat models of Parkinson's disease. *Neu. Lett.* 2015; 584(2015): 184–189. DOI: 10.1016/j.neulet.2014.10.032
13. Westin J.E., Janssen M.L.F., Sager T.N., Temel Y. Automated gait analysis in bilateral Parkinsonian rats and the role of l-DOPA therapy. *Behav. Brain Res.* 2012; 226(2012): 519–528. DOI: 10.1016/j.bbr.2011.10.006
14. Hsieh T.H., Chen J.J., Chen L.H., Chiang P.T., Lee H.Y. Time-course gait analysis of hemiparkinsonian rats following 6-hydroxydopamine lesion. *Behav. Brain Res.* 2011; 222(2011): 1–9. DOI: 10.1016/j.bbr.2011.03.031
15. Boix J., von Hieber D., Connor B. Gait analysis for early detection of motor symptoms in the 6-ohda rat model of Parkinson's disease. *Front. Behav. Neurosci.* 2018; 12: 39. DOI: 10.3389/fnbeh.2018.00039
16. Wang X.H., Lu G., Hu X., Tsang K.S., Kwong W.H., Wu F.X., Meng H.W., Jiang S., Liu S.W., Ng H.K., Poon W.S. Quantitative assessment of gait and neurochemical correlation in a classical murine model of Parkinson's disease. *BMC Neuroscience.* 2012; 13: 142. DOI: 10.1186/1471-2202-13-142
17. Poewe W.H., Wenning G.K. The natural history of Parkinson's disease. *Ann. Neurol.* 1998; 44(Suppl 1): S1–S9. DOI: 10.1002/ana.410440703
18. Gruden M.A., Davydova T.V., Narkevich V.B., Fomina V.G., Wang C., Kudrin V.S., Morozova-Roche L.A., Sewell R.D. Intranasal administration of alpha-synuclein aggregates: a Parkinson's disease model with behavioral and neurochemical correlates. *Behav. Brain Res.* 2014; 269: 1–11. DOI: 10.1016/j.bbr.2014.01.017
19. Borghammer P. How does Parkinson's disease begin? Perspectives on neuroanatomical pathways, prions and histology. *Mov. Disord.* 2018; 33(1): 48–57. DOI: 10.1002/mds.27138
20. Bridi J.C., Hirth F. Mechanisms of α -synuclein induced synaptopathy in Parkinson's disease. *Front. Neurosci.* 2018; 19: 12–80 DOI: 10.3389/fnins.2018.00080
21. Gruden M.A., Davidova T.V., Yanamandra K., Kucheryanu V.G., Morozova-Roche L.A., Sherstnev V.V., Sewell R.D. Nasal inoculation with α -synuclein aggregates evokes rigidity, locomotor deficits and immunity to such misfolded species as well as dopamine. *Behav. Brain Res.* 2013; 243: 205–212. DOI: 10.1016/j.bbr.2013.01.011
22. Gruden M.A., Solov'eva O.A., Kudrin V.S., Narkevich V.B., Sherstnev V.V. Neurochemical and behavioral features of action of pre-fibrillar oligomeric structures of α -synuclein in adult mice. *Neurochem. J.* 2020; 14(1): 25–31. DOI: 10.1134/S1819712420010092
23. Sherstnev V.V., Kedrov A.V., Solov'eva O.A., Gruden M.A., Konovalova E.V., Kalinin I.A., Proshin A.T. The effects of α -synuclein oligomers on neurogenesis in the hippocampus and the behavior of aged mice. *Neurochem. J.* 2017; 11(4): 282–289. DOI: 10.1134/S1819712417040092
24. Brooks S.P., Trueman R.C., Dunnet S.B. Assessment of motor coordination and balance in mice using the rotarod, elevated bridge, and footprint tests. *Curr. Protoc. Mouse Biol.* 2012; 2: 37–53. DOI: 10.1002/9780470942390.mo110165
25. Соловьева А.С., Аронов Д.А., Шубернецкая О.С., Соловьева О.А., Семущина С.Г., Моисеева Е.В. Выявление возрастной постуральной неустойчивости у мышей двух линий с помощью модифицированного теста «туннель» (footprint test). *Современные проблемы науки и образования.* 2020; 5: 89–99. DOI: 10.17513/spno.30105
26. RecognitionOfStepsV3. New version of Footprint test recognizer. *Электронный ресурс GitHub.com.* Режим доступа: <https://github.com/solovanna/RecognitionOfStepsV3> Дата обращения: 27.10.2022
27. Ebersbach G., Moreau C., Gandor F., Defebvre L., Devos D. Clinical syndromes: Parkinsonian gait. *Mov. Disord.* 2013; 28(11): 1552–1559 DOI: 10.1002/mds.25675

28. Dutta S., Sengupta P. Men and mice: relating their ages. *Life Sci.* 2016; 152 (2016): 244–248 DOI: 10.1016/j.lfs.2015.10.025
29. Wang S., Lai X., Deng Y., Song Y. Correlation between mouse age and human age in anti-tumor research: Significance and method establishment. *Life Sci.* 2020; 242: 117242. DOI: 10.1016/j.lfs.2019.117242
- ### References
1. Dorsey E.R., Bloem B.R. The Parkinson pandemic – a call to action. *JAMA Neurol.* 2018; 75(1): 9–10. DOI: 10.1001/jamaneurol.2017.3299
 2. Grabli D., Karachi C., Welter M.L. Normal and pathological gait: what we learn from Parkinson's disease. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry.* 2012; 83(10): 979–985. DOI: 10.1136/jnnp-2012-302263
 3. Mirelman A., Bonato P., Camicioli R., Ellis T.D., Hamilton J.L., Hausdorff J.M., Pelosin E., Almedia Q. Gait impairments in Parkinson's disease. *Lancet Neurol.* 2019; 18: 697–708. DOI: 10.1016/S1474-4422(19)30044-4
 4. Pistacchi M., Gioulis M., Sanson F., De Giovannini E., Filippi G., Rossetto F., Marsala S.Z. Gait analysis and clinical correlations in early Parkinson's disease. *Funct. Neurol.* 2017; 32(1): 28–34. DOI: 10.11138/fneur/2017.32.1.028
 5. Levy G., Louise E.D., Cote L., Perez M., Mejia-Santana H., Andrews H., Harris J., Waters C. Contribution of aging to the severity of different motor signs in Parkinson disease. *Arch. Neurol.* 2005; 62(3): 467–472. DOI: 10.1001/archneur.62.3.467
 6. Levy G. The relationship of Parkinson disease with aging. *Arch. Neurol.* 2007; 64(9): 1242–1246. DOI: 10.1001/archneur.64.9.1242
 7. Gubellini P., Kachidian P. Animal models of Parkinson's disease: An updated overview. *Revue Neurologique.* 2015; 171(11): 750–761. DOI: 10.1016/j.neurol.2015.07.011
 8. Chia S.J., Tan E.K., Chao Y.X. Historical perspective: models of Parkinson's disease. *Int. J. Mol. Sci.* 2020; 21(7): 2464. DOI: 10.3390/ijms21072464
 9. Le W., Sayana P., Jankovic J. Animal models of Parkinson's disease: a gateway to therapeutics? *NeuroTherapeutics.* 2013; 11: 92–110. DOI: 10.1007/s13311-013-0234-1
 10. Zeng X.S., Geng W.S., Jia J.J. Neurotoxin-induced animal models of Parkinson disease: Pathogenic mechanism and assessment. *ASN Neuro.* 2018; 10: 1–15. DOI: 10.1177/1759091418777438
 11. Geldenhuys W.J., Guseman T.L., Pienaar I.S., Dluzen DE, Young J.W. A novel biomechanical analysis of gait changes in the MPTP mouse model of Parkinson's disease. *PeerJ.* 2015; 3: e1175 DOI: 10.7717/peerj.1175
 12. Zhou M., Zhang W., Chang J., Wang J., Zheng W., Yang Y., Wen P., Li M., Xiao H. Gait analysis in three different 6-hydroxydopamine rat models of Parkinson's disease. *Neu. Lett.* 2015; 584(2015): 184–189. DOI: 10.1016/j.neulet.2014.10.032
 13. Westin J.E., Janssen M.L.F., Sager T.N., Temel Y. Automated gait analysis in bilateral Parkinsonian rats and the role of L-DOPA therapy. *Behav. Brain Res.* 2012; 226(2012): 519–528. DOI: 10.1016/j.bbr.2011.10.006
 14. Hsieh T.H., Chen J.J., Chen L.H., Chiang P.T., Lee H.Y. Time-course gait analysis of hemiparkinsonian rats following 6-hydroxydopamine lesion. *Behav. Brain Res.* 2011; 222(2011): 1–9. DOI: 10.1016/j.bbr.2011.03.031
 15. Boix J., von Hieber D., Connor B. Gait analysis for early detection of motor symptoms in the 6-ohda rat model of Parkinson's disease. *Front. Behav. Neurosci.* 2018; 12: 39. DOI: 10.3389/fnbeh.2018.00039
 16. Wang X.H., Lu G., Hu X., Tsang K.S., Kwong W.H., Wu F.X., Meng H.W., Jiang S., Liu S.W., Ng H.K., Poon W.S. Quantitative assessment of gait and neurochemical correlation in a classical murine model of Parkinson's disease. *BMC Neuroscience.* 2012; 13: 142. DOI: 10.1186/1471-2202-13-142
 17. Poewe W.H., Wenning G.K. The natural history of Parkinson's disease. *Ann. Neurol.* 1998; 44(Suppl 1): S1–S9. DOI: 10.1002/ana.410440703
 18. Gruden M.A., Davydova T.V., Narkevich V.B., Fomina V.G., Wang C., Kudrin V.S., Morozova-Roche L.A., Sewell R.D. Intranasal administration of alpha-synuclein aggregates: A Parkinson's disease model with behavioral and neurochemical correlates. *Behav. Brain Res.* 2014; 8695: 1–11. DOI: 10.1016/j.bbr.2014.01.017
 19. Borghammer P. How does Parkinson's disease begin? Perspectives on neuroanatomical pathways, prions and histology. *Mov. Disord.* 2018; 33(1): 48–57. DOI: 10.1002/mds.27138
 20. Bridi J.C., Hirth F. Mechanisms of alpha-synuclein induced synaptopathy in Parkinson's disease. *Front. Neurosci.* 2018; 19: 12–80 DOI: 10.3389/fnins.2018.00080
 21. Gruden M.A., Davidova T.V., Yanamandra K., Kucheryanu V.G., Morozova-Roche L.A., Sherstnev V.V., Sewell R.D. Nasal inoculation with alpha-synuclein aggregates evokes rigidity, locomotor deficits and immunity to such misfolded species as well as dopamine. *Behav. Brain Res.* 2013; 243: 205–212. DOI: 10.1016/j.bbr.2013.01.011
 22. Gruden M.A., Solov'eva O.A., Kudrin V.S., Narkevich V.B., Sherstnev V.V. Neurochemical and behavioral features of action of pre-fibrillar oligomeric structures of alpha-synuclein in adult mice. *Neurochem. J.* 2020; 14(1): 25–31. DOI: 10.1134/S1819712420010092
 23. Sherstnev V.V., Kedrov A.V., Solov'eva O.A., Gruden' M.A., Konovalova E.V., Kalinin I.A., Proshin A.T. The effects of alpha-synuclein oligomers on neurogenesis in the hippocampus and the behavior of aged mice. *Neurochem. J.* 2017; 11(4): 282–289. DOI: 10.1134/S1819712417040092
 24. Brooks S.P., Trueman R.C., Dunnet S.B. Assessment of motor coordination and balance in mice using the rotarod, elevated bridge, and footprint tests. *Curr. Protoc. Mouse Biol.* 2012; 2: 37–53. DOI: 10.1002/9780470942390.mo110165
 25. Solovieva A.S., Aronov D.A., Shubernetskaya O.S., Solovieva O.A., Semushina S.G., Moiseeva E.V. [Detection of age-related postural instability in mice of two lines using a modified tunnel test (footprint test)]. *Sovremennyye problemy nauki i obrazovaniya [Modern Problems of Science and Education].* 2020; 5: 89–99. DOI: 10.17513/spno.30105 (in Russian)
 26. RecognitionOfStepsv3. New version of Footprint test recognizer. *Electronic resource GitHub.com.* Available at: <https://github.com/solovanna/RecognitionOfStepsv3> Retrieved: 27.10.2022
 27. Ebersbach G., Moreau C., Gandor F., Defebvre L., Devos D. Clinical syndromes: Parkinsonian gait. *Mov. Disord.* 2013; 28(11): 1552–1559 DOI: 10.1002/mds.25675
 28. Dutta S., Sengupta P. Men and mice: relating their ages. *Life Sci.* 2016; 152 (2016): 244–248 DOI: 10.1016/j.lfs.2015.10.025
 29. Wang S., Lai X., Deng Y., Song Y. Correlation between mouse age and human age in anti-tumor research: Significance and method establishment. *Life Sci.* 2020; 242: 117242. DOI: 10.1016/j.lfs.2019.117242

Сведения об авторах:

Михайлова Наталья Павловна — лаборант-исследователь лаборатории функциональной нейробиологии Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт нормальной физиологии имени П.К. Анохина»; <https://orcid.org/0000-0003-0208-2575>

Ратмиров Александр Максимович — научный сотрудник лаборатории функциональной нейробиологии Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт нормальной физиологии имени П.К. Анохина»

Грудень Марина Алексеевна — кандидат химических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории функциональной нейробиологии Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт нормальной физиологии имени П.К. Анохина»; <https://orcid.org/0000-0001-6066-8908>

Шерстнев Владимир Вячеславович — доктор медицинских наук, профессор, заслуженный деятель науки РФ, заведующий лабораторией функциональной нейробиологии Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт нормальной физиологии имени П.К. Анохина»; <https://orcid.org/0000-0002-3975-186>