

УДК 57.017, 57.043

# Имплантация канюли снижает выраженность эффекта бета-амилоида на уровень перекисных липидов и глутатиона в мозге мышей BALB/c

К. А. Мухина<sup>1</sup>, В. А. Митькевич<sup>1</sup>, И. Ю. Попова<sup>1,2\*</sup><sup>1</sup>Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва, 119991 Россия<sup>2</sup>Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино, Московская обл., 142290 Россия

\*E-mail: I-Yu-Popova@yandex.ru

Поступила в редакцию 31.05.2024

Принята к печати 06.09.2024

DOI: 10.32607/actanaturae.27439

**РЕФЕРАТ** Болезнь Альцгеймера является наиболее распространенным нейродегенеративным заболеванием. Отсутствие эффективной терапии указывает на то, что механизмы развития этой патологии недостаточно изучены. Для исследования спорадической формы болезни Альцгеймера используется введение бета-амилоида (Аβ) в желудочки мозга животных с помощью шприца Гамильтона либо во время стереотаксической операции, либо через предварительно имплантированную канюлю. В данной работе исследовали влияние хронической имплантации канюли на выраженность эффектов Аβ на поведенческом, гистологическом и биохимическом уровнях. Показано, что локальное повреждение нервной ткани в результате канюлизации не влияет на поведение животных и параметры микроглии унилатерального гиппокампа через 2 недели после введения Аβ. Однако имплантация канюли значительно модифицирует некоторые биохимические маркеры окислительного стресса, возникающего в тканях мозга в ответ на введение Аβ. Так, наличие канюли уменьшает выраженность эффекта Аβ на уровень перекисных липидов и глутатиона – в 2 и 10 раз соответственно. Важно, что обнаруженные изменения носят хронический и системный характер, поскольку анализировали гомогенат всего контралатерального (по отношению к месту имплантации канюли) полушария и этот анализ проводили через 2 недели после имплантации. При этом канюлизация не влияет на текущую скорость продукции активных форм кислорода. Полученные данные указывают на то, что хроническая имплантация канюли в мозг экспериментальных животных значительно искажает некоторые параметры окислительного стресса в нервной ткани, широко используемые для оценки развития экспериментальной патологии альцгеймеровского типа.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** амилоидная токсичность, иммуногистохимия, микроглия, активные формы кислорода, глутатион, перекисные липиды.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ** Аβ – β-амилоид; DG – зубчатая фасция; АФК – активные формы кислорода; БА – болезнь Альцгеймера; сБА – спорадическая болезнь Альцгеймера; группа К – группа контроль; группа К-К – группа контроль с канюлей; группа БА – группа с моделью болезни Альцгеймера; группа БА-К – группа с моделью болезни Альцгеймера и канюлей.

## ВВЕДЕНИЕ

Одной из актуальных проблем современной нейробиологии является разработка эффективной терапии спорадической (не наследственной) формы болезни Альцгеймера (сБА). В настоящее время сБА, которая составляет до 95% от всех диагностированных случаев болезни Альцгеймера, является третьей по значимости причиной смерти, уступая только сердечно-сосудистым заболеваниям и раку [1]. Согласно прогнозам, число людей с диагнозом

БА будет удваиваться каждые 20 лет, достигнув 66 и 115 млн человек к 2030 и 2050 годам соответственно [2]. Однако эти прогнозы не учитывали последствия пандемии COVID-19, результатом которой может стать существенное увеличение числа пациентов с БА [3, 4]. Считается, что причиной сБА является сочетание генетических факторов и факторов риска окружающей среды без документально подтвержденного семейного анамнеза БА [5]. Существует множество гипотез, объясняющих эти-

ологию сБА. Развитие заболевания связывают с отложением  $\beta$ -амилоида (А $\beta$ ) [6], гиперфосфорилированием тау-белка [7], окислительным стрессом [8, 9], гипометаболизмом глюкозы [10], нейровоспалением [11], дегенерацией холинергических нейронов [12], нарушением микробиоты кишечника [13, 14], нарушением липидного обмена [15], дисфункцией аутофагии [16], состоянием резистентности к инсулину [17, 18], дисфункцией синапсов [8, 19] и т.д. Однако отсутствие эффективных методов лечения свидетельствует о недостаточном понимании механизмов развития сБА.

Одним из распространенных подходов исследования механизмов развития сБА является однократное введение бета-амилоида в мозг животных, служащих моделью сБА [20–22]. Бета-амилоид вводят в мозг, как правило, унилатерально в боковой желудочек с помощью шприца Гамильтона во время стереотаксической операции или через предварительно имплантированную направляющую канюлю. Канюльный имплант позволяет длительное время вводить напрямую в мозг различные вещества, в том числе потенциальные терапевтические препараты, но вместе с тем приводит к дополнительному повреждению тканей, вызывая локальный воспалительный ответ [23]. Этот первоначальный воспалительный ответ возникает главным образом в результате активации микроглии с высвобождением интерлейкина-1 $\beta$  [24, 25]. На контрольных животных было показано, что длительность острого воспалительного ответа составляет менее 1 недели [26], а через 2 недели наблюдается «выравнивание» глии вдоль имплантированного объекта [23]. Вместе с тем известно, что А $\beta$  является прямым активатором микроглии [27, 28]. Таким образом, хроническая канюлизация и А $\beta$  действуют однонаправленно. В результате тканевый ответ на имплантацию канюли может усиливать или, напротив, маскировать эффект бета-амилоида. Однако информация о таких экспериментальных данных отсутствует. Вместе с тем очевидно, что искажение эффектов А $\beta$  при исследовании механизмов развития сБА или тестировании потенциальных терапевтических препаратов может приводить к ложным выводам.

Целью настоящей работы было изучение влияния повреждения нервной ткани в результате имплантации канюли на развитие амилоидной токсичности при интрацеребровентрикулярном введении А $\beta$  мышам линии BALB/c. Наличие и выраженность синергизма этих воздействий оценивали на системном уровне с помощью поведенческих тестов, на клеточном и субклеточном уровнях с помощью иммуногистохимических и биохимических методов через 2 недели после введения А $\beta$ .

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

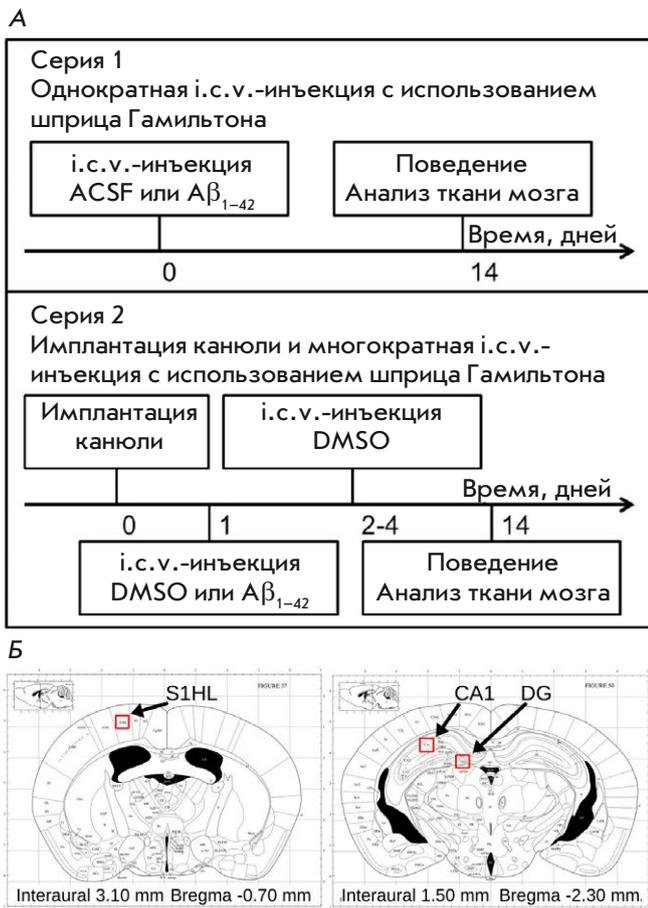
Эксперименты выполнены на мышах BALB/c (25–33 г, самцы), полученных из питомника лабораторных животных «Столбовая» (<https://www.pitst.ru/>, Московская область, Чеховский район, пос. Столбовая). Животных содержали в индивидуальных клетках при 12-часовом цикле свет/темнота в помещении с контролируемой температурой (22°C) с доступом к пище и воде *ad libitum*. Все исследования проводили в соответствии с принципами биомедицинской этики, изложенными в Хельсинкской декларации 1964 года, а также одобрено Комиссией по биологической безопасности и биоэтике ИТЭБ РАН (Пушино), протокол № 40/2023 от 15 февраля 2023 года.

**Схема проведения эксперимента** представлена на *рис. 1А*. Были проведены две серии экспериментов. Животным первой серии проводили нейрохирургическую операцию, во время которой в левый боковой желудочек головного мозга при помощи шприца Гамильтона вводили либо 1 мкл искусственной спинномозговой жидкости (ACSF) (группа К), либо 1 мкл А $\beta_{1-42}$  для моделирования спорадической формы болезни Альцгеймера (группа БА).

Животным второй серии с помощью нейрохирургической операции имплантировали направляющую канюлю, через которую при помощи шприца Гамильтона начинали вводить препараты через 1 сут после операции. Поскольку имплантацию канюли производят с целью неоднократного введения препаратов, а вводимые препараты зачастую растворяют в DMSO, в данной серии экспериментов раствор ACSF был заменен на указанный растворитель. В первый день введения часть животных получала 1 мкл DMSO (группа К-К), а вторая часть – 1 мкл А $\beta_{1-42}$ +DMSO (группа БА-К). Далее в течение 3 дней всем животным вводили DMSO.

Через 14 дней после введения А $\beta_{1-42}$  проводили поведенческий тест «Открытое поле». Затем мышей анестезировали изофлураном, мозг извлекали, половину мозга фиксировали в параформальдегиде для иммуногистохимического анализа, а вторую половину анализировали биохимическими методами.

**Стереотаксические операции** проводили под общим газовым наркозом с использованием изофлурана (1–4%, парциальное давление кислорода 0.8). Координаты для введения шприца Гамильтона (G29) были одинаковы во всех группах животных: AP = -0.7; L = 1.4; h = 2.2 [29]. Направляющую канюлю (нержавеющая сталь, G21 размер) для микроинъекций устанавливали над левым боковым желудочком по координатам AP = -0.7; L = 1.4; h = 1.5 [29] (*рис. 1Б*).



**Рис. 1.** А — схема эксперимента. Б — изображение фронтального среза мозга мыши из атласа [29] с обозначением места введения направляющей канюли (слева) и областей CA1 и зубчатой фасции для подсчета клеток микроглии (справа)

### Микроинъекции препаратов

Контрольным группам животных вводили ACSF (NaCl 0.9% + PBS + 5 мМ глюкозы) или DMSO (Sigma-Aldrich, США), группам БА вводили  $A\beta_{1-42}$  (Sigma-Aldrich). Олигомерный  $A\beta_{1-42}$  (1 мг, Sigma-Aldrich) растворяли в 1 мл 1.0%  $NH_4OH$  в физиологическом растворе и обрабатывали ультразвуком в течение 1 мин. Аликвоты хранили при температуре  $-80^\circ C$ . Перед экспериментами раствор  $A\beta_{1-42}$  фибриллизировали в течение 24 ч при температуре  $36^\circ C$  и обрабатывали ультразвуком еще раз в течение 1 мин. Растворы вводили со скоростью 1 мкл/мин в объеме 1 мкл.

### Поведение

Общее состояние животных оценивали с помощью теста «Открытое поле», которое представляет собой ярко освещенную черную круглую открытую арену

диаметром 60 см и высотой стенок 50 см. Поведение каждого животного (индивидуально) регистрировали с помощью видеокamеры в течение 3 мин. Для видеорегистрации и последующего анализа использовали программу EthoVision (Noldus Information Technology, Нидерланды). Поведение анализировали в двух зонах: в центре ( $d = 20$  см) и вдоль стенок; рассчитывали время нахождения в каждой зоне, соотношение движение/неподвижность в каждой зоне, частоту забегания в центральную зону, латентное время до первого забегания в зону вдоль стенок, а также общую пройденную дистанцию и среднюю скорость движения. После каждого животного установку «Открытое поле» обрабатывали 10% раствором спирта.

### Гистология

Левое полушарие мозга помещали в холодный параформальдегид для фиксации и хранения. Срезы изготавливали на вибраторе Leica VT 1200 S (Leica, Германия). Делали фронтальные срезы толщиной 35 мкм и окрашивали микроглию первичными кроличьими антителами анти-Iba-1 (1 : 1000; Wako, Япония) в соответствии с протоколом производителя. Далее использовали вторичные антитела козы против антител кролика (1:1000; Alexa Fluor 488, ThermoFisher, США). После завершения окраски срезы монтировали на предметные стекла и анализировали флуоресценцию микроглии с помощью микроскопа Nikon E200 при увеличении  $\times 40$ . Рассчитывали количество и общую площадь клеток Iba-1+ в квадратах  $300 \times 300$  мкм. Анализ проводили в области CA1 и зубчатой фасции гиппокампа (рис. 1Б) с помощью программного обеспечения ImageJ (НИН, США), анализировали по шесть срезов каждого мозга. Также в гиппокампе оценивали изменение количества микроглиальных клеток по мере удаления от имплантированной канюли (1200 мкм в каудальном направлении).

### Биохимия

Правое полушарие сразу же после быстрого извлечения из черепа (20–40 с) помещали в ледяной буфер, содержащий 220 мМ маннитола, 70 мМ сахарозы, 10 мМ Hepes, 1 мМ EGTA (pH 7.35). Мозговую ткань разрезали на мелкие кусочки и помещали в гомогенизатор (Duran, Wheaton) с 4 мл буфера и гомогенизировали вручную в течение полутора минут. Гомогенат мозга фракционировали при помощи центрифугирования на разных скоростях. Гомогенат центрифугировали при 4000 g в течение 10 мин при  $4^\circ C$ . Осадок ресуспендировали в 3 мл калий-фосфатного буфера, содержащего 125 мМ KCl, 8 мМ  $KH_2PO_4$  (pH 7.4) для получения обогащенной

мембранами фракции 1, а надосадочную жидкость центрифугировали при 12000 *g* в течение 15 мин при 4°C. Обогащенный цитозолем супернатант составлял фракцию 2. Полученный осадок ресуспендировали в 0.5 мл среды выделения без EGTA с получением обогащенной митохондриями фракции 3. Все фракции хранили на льду в течение эксперимента. В полученных трех фракциях, условно называемых в дальнейшем мембранной, цитоплазматической и митохондриальной, определяли маркеры окислительного стресса. Измерения проводили в течение получаса с использованием многофункционального анализатора планшетного формата CLARIOstar (BMGlabtech, Германия).

Динамику образования активных форм кислорода (АФК) определяли флуориметрированием с использованием красителя Amplex Red (30 мкМ, Thermo Fisher Scientific). Концентрацию восстановленных сульфгидрильных групп определяли фотометрированием по методу Эллмана с 1.3 мМ 5,5'-дитиобис-(2-нитробензойной кислотой) (DTNB, ThermoFisher, США). Измерения оптической плотности проводили на длине волны 415 нм с использованием калибровочной кривой по цистеину. Перекисно окисленные липиды определяли флуориметрированием продуктов реакции с 7.5 мМ тиобарбитуровой кислотой (анализ TBARS, Sigma-Aldrich, США). Флуоресценцию измеряли с использованием длины волны 530 нм для возбуждения и 554 нм для поглощения и калибровочной кривой по 1,1,3,3-тетраэтоксипропану (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, США). Содержание белка во фракциях для нормирования биохимических показателей определяли по методу Бредфорда с Coomassie Brilliant Blue R-250. Оптическую плотность измеряли на длине волны 595 нм с использованием калибровочной кривой по бычьему сывороточному альбумину. Поскольку в цитоплазматической фракции содержание белка было выше, чем в мембранной и митохондриальной, нормированные значения в ней были ниже.

### Статистический анализ

Статистический анализ проводили с использованием критерия Манна–Уитни и однофакторного метода ANOVA. Данные представлены как среднее  $\pm$  SD,  $p \leq 0.05$  (\*),  $p \leq 0.01$  (\*\*),  $p \leq 0.001$  (\*\*\*)

### РЕЗУЛЬТАТЫ

Эксперименты были проведены на четырех группах животных: 1 – контрольная с однократным введением ACSF во время нейрохирургической операции с помощью шприца Гамильтона (группа К,  $n = 6$ ); 2 – с однократным введением  $A\beta_{1-42}$  во время нейрохирургической операции с помощью

шприца Гамильтона (группа БА,  $n = 6$ ); 3 – контрольная с введением DMSO в течение 3 дней через имплантированную канюлю (группа К-К,  $n = 6$ ); 4 – с однократным введением  $A\beta_{1-42}$  и последующим введением DMSO в течение 3 дней через имплантированную канюлю (группа БА-К,  $n = 7$ ).

### Поведенческий тест «Открытое поле»

Для оценки общего состояния мышей, их двигательной активности и уровня тревожности в новой обстановке был проведен тест «Открытое поле». Анализ трех показателей (пройденного расстояния, скорости движения и времени нахождения в центральном квадрате) не выявил достоверных различий между четырьмя исследуемыми группами (рис. 2А,Б,В). Оценка относительных изменений между двумя группами без канюлей (К и БА) и двумя группами с канюлями (К-К и БА-К) показала, что наличие имплантированной канюли меняет направленность поведенческих реакций у животного (рис. 2А,Б,В).

### Гиппокампальная микроглия

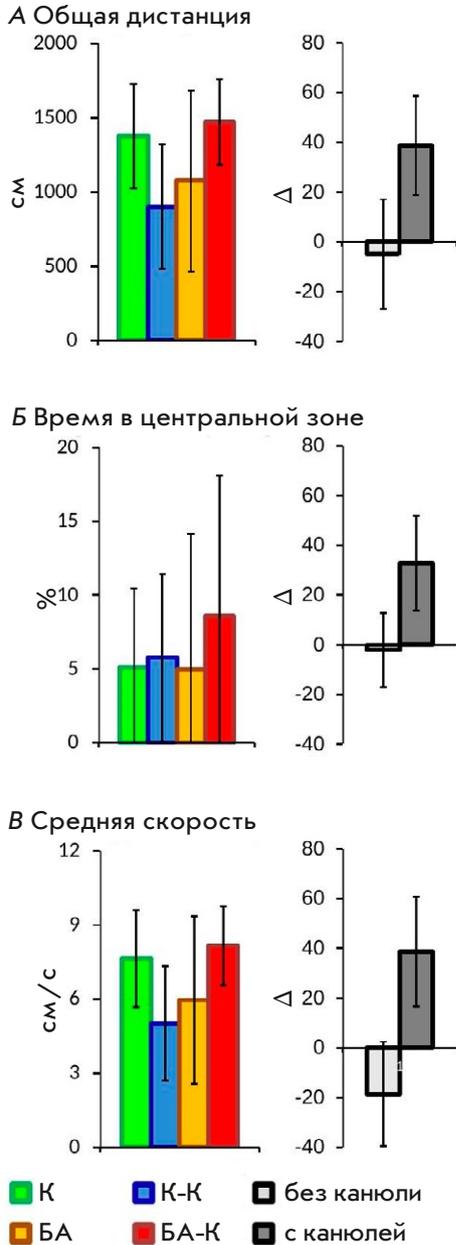
Поскольку любые интервенции в мозг приводят к некоторому повреждению ткани и, как следствие, к активации микроглии, первой задачей было оценить область повреждения вокруг имплантированной направляющей канюли, анализируя микроглию. Через 2 недели после нейрохирургической операции проводили последовательный анализ срезов по мере удаления от канюли. Показано, что активация микроглии, вызванная имплантацией канюли, наблюдается на расстоянии ~600 мкм от канюли (рис. 3А). Канюля увеличивает общую площадь микроглиальных клеток на  $423.7 \pm 74.1$  мкм<sup>2</sup> у контрольных животных и на  $449.9 \pm 85.5$  мкм<sup>2</sup> у БА животных, а их количество на  $13.5 \pm 4.6$  и  $10.5 \pm 3.8$  соответственно.

Иммуногистохимический анализ микроглии в поле СА1 и в хилусе зубчатой фасции гиппокампа выявил увеличение площади клеток (на  $63.3 \pm 28.4$  и  $143 \pm 42.4$  мкм<sup>2</sup> у животных без канюли (БА-К) и на  $143.1 \pm 37.9$  и  $167.2 \pm 29.6$  мкм<sup>2</sup> у животных с канюлей (БА-К – К-К) соответственно) у мышей с моделью болезни Альцгеймера относительно контрольной группы, при этом количество клеток было увеличено только в области DG (рис. 3Б).

Сравнительный попарный анализ групп с канюлями и без не выявил достоверной разницы между группами ни по площади, ни по числу клеток (рис. 3Б). Полученные данные указывают на то, что имплантация не оказывает негативного влияния на параметры (число и площадь) микроглиальных клеток на расстоянии более 600 мкм от канюли.

**Биохимия**

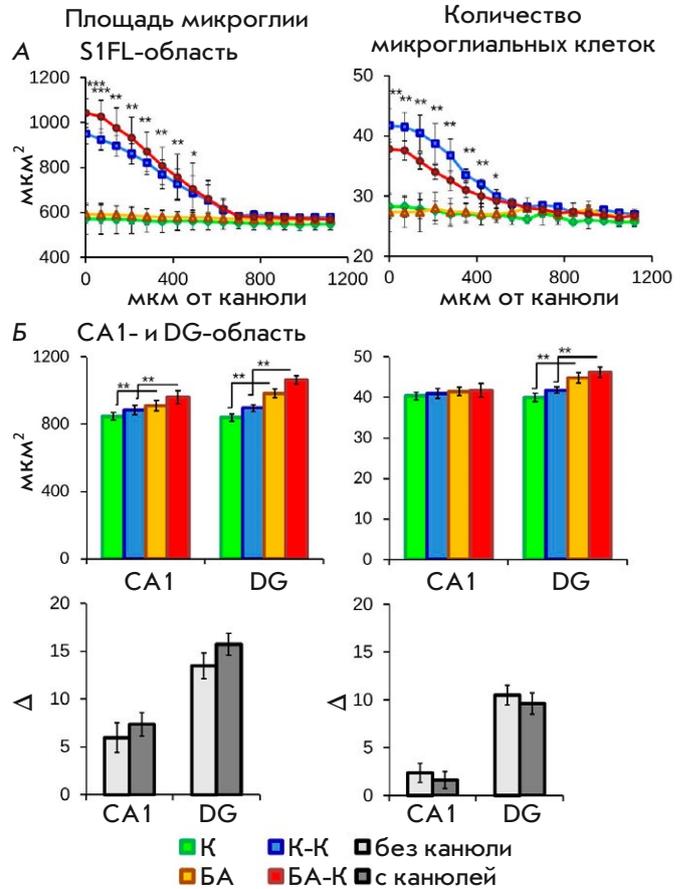
В работе проведен биохимический анализ маркеров окислительного стресса в правом полушарии мозга (контралатеральном по отношению к месту имплантации канюли) у экспериментальных животных.



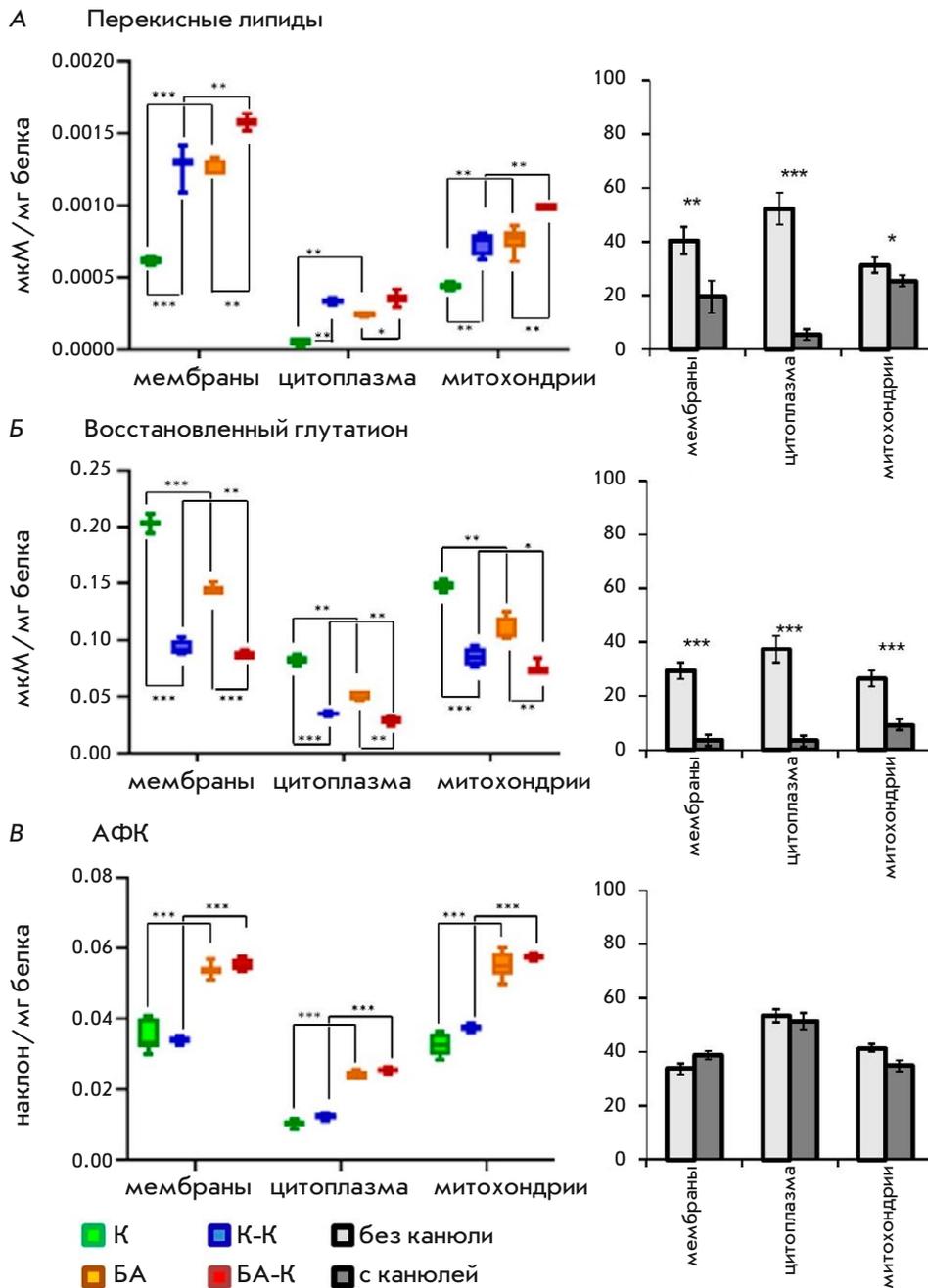
**Рис. 2.** Анализ поведения экспериментальных животных в тесте «Открытое поле». А — общая пройденная дистанция. Б — общее время, проведенное в центральной зоне. В — средняя скорость движения. Слева представлены данные по каждой группе экспериментальных животных, справа — попарное сравнение контрольных групп и групп с введением  $A\beta_{1-42}$  (К/БА и К-К/БА-К). Данные представлены как средние значения и стандартное отклонение

**Перекисно окисленные липиды**

Анализ уровня перекисных липидов в гомогенате мозга экспериментальных животных показал, что вживление канюли приводит к более чем двукратному повышению их уровня в первой фракции, которая содержит преимущественно клеточные мембраны (сравнение групп К и К-К,  $p < 0.01$ , рис. 4А, табл. 1). Тот факт, что имплантация канюли была на левой половине мозга, а биохимические параметры анализировали в гомогенате правой половины мозга, указывает на существенное влияние поврежденной ткани на общий уровень перекисных липидов в мозге.



**Рис. 3.** Иммуногистохимический анализ микроглиальных клеток. А — изменение количества и площади микроглиальных клеток по мере удаления от места имплантации канюли к затылочной части мозга. Б — влияние канюлизации и введения  $A\beta_{1-42}$  на микроглию в поле CA1 и DG гиппокампа. Вверху представлены данные по каждой группе экспериментальных животных, внизу — попарное сравнение контрольных групп и групп с введением  $A\beta_{1-42}$  (К/БА и К-К/БА-К). Данные представлены как средние значения и стандартное отклонение. Достоверность:  $p \leq 0.05$  (\*),  $p \leq 0.01$  (\*\*),  $p \leq 0.001$  (\*\*\*)



**Рис. 4.** Биохимический анализ маркеров окислительного стресса. А – уровень перекисных липидов. Б – уровень восстановленного глутатиона. В – уровень АФК. Слева представлены данные по каждой группе экспериментальных животных, справа – попарное сравнение контрольных групп и групп с введением Аβ<sub>1-42</sub> (К/БА и К-К/БА-К). Данные представлены как средние значения и стандартное отклонение. Достоверность:  $p \leq 0.05$  (\*),  $p \leq 0.01$  (\*\*),  $p \leq 0.001$  (\*\*\*)

У животных без канюли введение амилоида приводило к существенному увеличению количества перекисных липидов. Так, в первой фракции гомогената мозга уровень перекисно окисленных липидов составлял  $6 \times 10^4 \pm 0.2 \times 10^4$  и  $13 \times 10^4 \pm 2 \times 10^4$  мкМ/мг белка в группах К и БА соответственно. Введение амилоида через канюлю (группа БА-К) приводило к дополнительному повышению уровня перекисных липидов до  $16 \times 10^4 \pm 0.9 \times 10^4$  мкМ/мг белка. Эта зависимость наблюдалась во всех трех фракциях (рис. 4А). При этом уровень перекисных липидов

в группе К-К был сопоставим с уровнем в группе БА (в первой фракции  $13 \times 10^4 \pm 2 \times 10^4$  и  $12.6 \times 10^4 \pm 0.5 \times 10^4$  мкМ/мг белка соответственно), что свидетельствует о хроническом повышении свободнорадикального окисления в контралатеральном относительно места имплантации полушария мозга экспериментальных животных.

Попарное сравнение между группами с канюлями и без (рис. 4А) показало, что при введении амилоида уровень окисленных липидов в первой фракции повышается в два раза сильнее у животных без канюли (сравнение групп К и БА) по сравнению с жи-

**Таблица 1.** Уровень маркеров окислительного стресса во фракциях гомогената мозга экспериментальных животных. Значения указаны в % относительно мембранной фракции К-группы и стандартные отклонения

Маркер окислительного стресса	Фракция	К	К-К	БА	БА-К
Перекисные липиды	Мембранная	100 ± 4	204 ± 27	202 ± 9	253 ± 14
	Цитоплазматическая	9 ± 5	54 ± 4	39 ± 2	57 ± 14
	Митохондриальная	71 ± 4	119 ± 13	121 ± 14	159 ± 1
Глутатион	Мембранная	100 ± 3	46 ± 3	70 ± 2	45 ± 1
	Цитоплазматическая	41 ± 2	17 ± 1	25 ± 2	16 ± 1
	Митохондриальная	73 ± 2	42 ± 4	54 ± 5	35 ± 1
АФК	Мембранная	100 ± 12	97 ± 3	154 ± 5	159 ± 5
	Цитоплазматическая	30 ± 3	36 ± 3	69 ± 3	73 ± 2
	Митохондриальная	91 ± 9	108 ± 3	159 ± 11	165 ± 3

вотными с имплантированными канюлями (сравнение групп К-К и БА-К).

### Глутатион

Глутатион, определяющий фактор Red/Ox потенциала в клетке, в основном содержится в цитозоле. Анализ уровня глутатиона в гомогенате мозга экспериментальных животных показал, что вживление канюли приводит к понижению уровня глутатиона в 2.4 раза во второй фракции, содержащей преимущественно цитозоль (сравнение групп К и К-К,  $p < 0.01$ , рис. 4Б, табл. 1). Эта зависимость прослеживалась во всех трех фракциях. Этот факт указывает на существенное влияние имплантированной канюли на общий уровень глутатиона в мозге.

Введение амилоида приводило к понижению уровня глутатиона во всех экспериментах, однако изменения у животных без канюли были на 75% более выраженными, чем у животных с канюлей (группы БА/К – 40% и группы БА-К/К-К – 5%, рис. 4Б).

Интересно, что уровень глутатиона в группе К-К был ниже, чем в группе БА (во второй фракции  $0.035 \pm 0.002$  и  $0.052 \pm 0.004$  мкМ/мг белка соответственно), что свидетельствует о хроническом снижении восстановительной способности нервной ткани в результате имплантации канюли в мозг экспериментальных животных.

### Активные формы кислорода

Имплантация канюли не влияла на скорость продукции АФК: в группах К и К-К значения достоверно не различались (рис. 4В, табл. 1).

Введение амилоида приводило к схожему повышению примерно на 75% скорости продукции АФК во всех трех фракциях гомогената независимо от наличия имплантированной канюли (рис. 4В, табл. 1). Попарное сравнение групп с канюлями и без не выявило достоверных отличий между ними (рис. 4В).

### ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящей работе изучено влияние направляющей канюли на состояние нервной ткани мозга при моделировании спорадической БА на мышах. На системном уровне оценивали поведение животных; на клеточном и субклеточном уровне проводили иммуногистохимический анализ микроглии и биохимический анализ маркеров окислительного стресса мозга. Анализ проводили через 2 недели после проведения нейрохирургической операции и введения  $A\beta_{1-42}$ , поскольку к этому времени заканчиваются острые реакции на повреждение и изменения параметров можно рассматривать как признаки начального этапа развития хронической патологии.

Поведенческие исследования на животных с моделью БА, особенно на ранних стадиях развития патологии, представляют интерес, поскольку с их помощью можно выявить психоневрологические нарушения, например, гиперактивность и тревожность. Ранее было показано, что психоневрологическая симптоматика является ранним проявлением когнитивных нарушений у человека [30]. Однако в связи с тем, что установить момент запуска патологии у человека не представляется возможным, неизвестно на каком конкретно этапе развития нейродегенерации начинаются психоневрологические нарушения. В связи с этим особый интерес представляют поведенческие тесты на животных на разных стадиях моделирования БА. В настоящем исследовании экспериментальные животные были протестированы с помощью теста «Открытое поле». Показали, что через 2 недели после введения  $A\beta_{1-42}$  тест «Открытое поле» не выявляет достоверных отличий между экспериментальными группами. Хотя попарное сравнение животных без и с канюлей показало, что имплантированная канюля меняет направленность поведенческих реакций. Если у мышей без канюли наблюдалась тенденция к уменьшению двигательной активности, то у мы-

шей с канюлей – к ее увеличению. Этот факт может указывать на необходимость разработки новых поведенческих тестов, выявляющих ранние психоневрологические нарушения у животных с экспериментальной моделью БА.

Поскольку при имплантации направляющей канюли происходит механическое повреждение тканей мозга, необходимо отделять влияние этого повреждения от влияния хронически вводимых через канюлю препаратов. Для этого необходимо определить зону механического повреждения вокруг канюли. Одним из наиболее часто используемых биомаркеров повреждения нервной ткани являются активированные микроглиальные клетки – резидентные «макрофаги» мозга [31]. В нашем исследовании сравнительный анализ параметров микроглиальных клеток и нервной ткани вокруг канюли с введением тонким шприцем Гамильтона показал, что вокруг канюли количество клеток активированной микроглии увеличивалось в среднем на 30%, а их общая площадь на 40%. Количество активированной микроглии градуально снижалось по мере удаления от канюли и достигало контрольного уровня на расстоянии 560 мкм. Поэтому влияние амилоида на гиппокампальную микроглию у животных с имплантированными канюлями анализировали на расстоянии более 600 мкм от места имплантации. В отличие от канюли, разовое введение шприца Гамильтона толщиной 0.33 мм не приводило к увеличению количества и площади микроглиальных клеток через 2 недели после стереотаксической операции.

Введение  $A\beta_{1-42}$  как животным с канюлей, так и без нее вызывало активацию гиппокампальной микроглии, что выражалось в увеличении площади клеток. Интересно, что в зубчатой фасции увеличение площади клеток сопровождалось увеличением их количества, тогда как в поле СА1 число микроглиальных клеток не менялось. Сравнительный попарный анализ гиппокампальной микроглии у животных без канюли и с канюлей показал, что хотя уровень активации микроглии у животных с канюлей был незначительно выше, принципиально наличие канюли не влияло на эффект  $A\beta_{1-42}$ . Таким образом, полученные данные показали, что локальное повреждение нервной ткани, вызванное имплантацией канюли, не меняет эффект действия бета-амилоида на ткани гиппокампа, находящиеся на достаточном удалении (600 мкм) от канюли.

Поскольку многочисленные исследования показали, что олигомерный  $A\beta$  индуцирует окислительный стресс в нервной ткани [32, 33], мы проанализировали маркеры окислительного стресса в правом полушарии мозга (контралатеральном по отношению

к месту имплантации канюли) у экспериментальных животных. Сравнительный анализ двух контрольных групп (К и К-К) показал, что имплантация канюли приводит к существенному повышению уровня перекисных липидов и резкому снижению уровня глутатиона во всех трех фракциях (см. табл. 1), указывая на возникновение хронического окислительного стресса в результате имплантации канюли. При этом уровень АФК в этих группах не различался.

Опубликованы данные, указывающие на то, что снижение уровня глутатиона после имплантации канюли может быть связано с повышенной экспрессией глутамата и эксайтотоксичностью, при которых усиливается окислительный стресс, активируется микроглия и высвобождается цинк, что приводит к гибели нейронов. Это проявляется уже на второй день после механической травмы нервной ткани [34]. Кроме того, при травме происходит реактивная активация астроцитов, которые служат основным источником восстановленного глутатиона в мозге, что также приводит к снижению глутатиона [35].

Введение амилоида контрольным животным (группа БА) вызывало повышение уровня перекисных липидов (на 100% в мембранной фракции) до значений в группе К-К. Снижение уровня глутатиона при этом было существенным (изменение на 40% в цитоплазматической фракции при сравнении групп К и БА), но менее выраженным, чем вызванное имплантацией канюли (изменение на 60% в цитоплазматической фракции при сравнении групп К и К-К). Общий уровень АФК при этом изменялся на одинаковую величину в группах с канюлей и без таковой.

Попарное сравнение групп с канюлями (К-К и БА-К) и без (К и БА) показало, что имплантация канюли, вызывая окислительный стресс из-за механического повреждения тканей, принципиально снижает выраженность эффекта амилоида на уровень перекисных липидов и глутатиона (в 2 и 10 раз соответственно), но не влияет на скорость продукции АФК. Эти данные показали, что общий уровень АФК является адекватным и достоверным маркером развития патологии. В то же время имплантация канюли принципиально искажает эффект амилоида на уровень глутатиона в нервной ткани, что может привести к ложным выводам при интерпретации экспериментальных данных при исследовании механизмов развития сБА или тестировании потенциальных терапевтических препаратов.

Полученные данные указывают на то, что при анализе биохимических параметров окислительного стресса, которые широко используются

для оценки степени развития экспериментальной патологии альцгеймеровского типа, необходимо учитывать влияние механического повреждения ткани, вызванного имплантированной канюлей.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исследование развития амилоидной патологии при интрацеребральном введении бета-амилоида мышам линии BALB/c показало, что повреждение нервной ткани в результате имплантации канюли не влияет на проявление эффектов бета-амилоида на поведенческом и гистологическом уровнях. Однако имплантация канюли принципиальным образом искажала (маскировала) выраженность эффекта амилоида на уровень перекисных липидов

и глутатиона в нервной ткани. При этом текущая скорость продукции АФК не зависела от наличия канюли, подтверждая, что этот параметр является адекватным и достоверным маркером развития патологии. Эти факты указывают на то, что имплантация канюли не одинаковым образом влияет на биохимические маркеры окислительного стресса, возникающего в ответ на инъекцию амилоида, что особенно важно учитывать в исследованиях редокс-статуса нервной ткани у животных. ●

*Работа выполнена в рамках госзадания № 075-01025-23-01 и при поддержке гранта РФФ № 19-74-30007.*

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Takizawa C., Thompson P.L., van Walsem A., Faure C., Maier W.C. // *J. Alzheimers Dis.* 2015. V. 43. № 4. P. 1271–1284.
2. Batsch N.L., Mittelman M.S. // *World Alzheimer Report.* 2012. P. 1–80.
3. Gonzalez-Fernandez E., Huang J. // *Curr. Neurol. Neurosci. Rep.* 2023. V. 23. № 9. P. 531–538.
4. Li W., Sun L., Yue L., Xiao S. // *Front. Immunol.* 2023. V. 14. P. 1120495.
5. Mattsson N., Zetterberg H. // *Expert. Rev. Neurother.* 2014. V. 14. № 6. P. 621–630.
6. Paroni G., Bisceglia P., Seripa D. // *J. Alzheimers Dis.* 2019. V. 68. № 2. P. 493–510.
7. Wu X.L., Pina-Crespo J., Zhang Y.W., Chen X.C., Xu H.X. // *Chin. Med. J.* 2017. V. 130. № 24. P. 2978–2990.
8. Tönnies E., Trushina E. // *J. Alzheimers Dis.* 2017. V. 57(4). P. 1105–1121.
9. Wang X., Wang W., Li L., Perry G., Lee H.G., Zhu X. // *Biochim. Biophys. Acta.* 2014. V. 1842. № 8. P. 1240–1247.
10. Zilberter Y., Zilberter M. // *J. Neurosci. Res.* 2017. V. 95. № 11. P. 2217–2235.
11. Kaur D., Sharma V., Deshmukh R. // *Inflammopharmacology.* 2019. V. 27. № 4. P. 663–677.
12. Ferreira-Vieira T.H., Guimaraes I.M., Silva F.R., Ribeiro F.M. // *Curr. Neuropharmacol.* 2016. V. 14. № 1. P. 101–115.
13. Kowalski K., Mulak A. // *J. Neurogastroenterol. Motil.* 2019. V. 25. № 1. P. 48–60.
14. Junges V.M., Closs V.E., Nogueira G.M., Gottlieb M.G.V. // *Curr. Alzheimer Res.* 2018. V. 15. № 13. P. 1179–1190.
15. Zarrouk A., Debbabi M., Bezine M., Karym E.M., Badreddine A., Rouaud O., Moreau T., Cherkaoui-Malki M., El Ayeub M., Nasser B., et al. // *Curr. Alzheimer Res.* 2018. V. 15. № 4. P. 303–312.
16. Li Q., Liu Y., Sun M. // *Cell. Mol. Neurobiol.* 2017. V. 37. № 3. P. 377–388.
17. Rhea E.M., Leclerc M., Yassine H.N., Capuano A.W., Tong H., Petyuk V.A., Macauley S.L., Fioramonti X., Carmichael O., Calon F., Arvanitakis Z. // *Aging Dis.* 2024. V. 15. № 4. P. 1688–1725.
18. Alves S.S., Servilha-Menezes G., Rossi L., da Silva Junior R.M.P., Garcia-Cairasco N. // *Neurosci. Biobehav. Rev.* 2023. V. 152. P. 105326.
19. Chen Y., Fu A.K.Y., Ip N.Y. // *Pharmacol. Ther.* 2019. V. 195. P. 186–198.
20. Balducci C., Forloni G. // *Curr. Pharm. Des.* 2014. V. 20. № 15. P. 2491–2505.
21. Puzzo D., Gulisano W., Palmeri A., Arancio O. // *Expert. Opin. Drug Discov.* 2015. V. 10. № 7. P. 703–711.
22. Zhang L., Chen C., Mak M.S., Lu J., Wu Z., Chen Q., Han Y., Li Y., Pi R. // *Med. Res. Rev.* 2020. V. 40. № 1. P. 431–458.
23. Holguin A., Frank M.G., Biedenkapp J.C., Nelson K., Lippert D., Watkins L.R., Rudy J.W., Maier S.F. // *J. Neurosci. Methods.* 2007. V. 161. № 2. P. 265–272.
24. Schultz R.L., Willey T.J. // *J. Neurocytol.* 1976. V. 5. № 6. P. 621–642.
25. Vincent V.A., van Dam A.M., Persoons J.H., Schotanus K., Steinbusch H.W., Schoffemeer A.N., Berkenbosch F. // *Glia.* 1996. V. 17. № 2. P. 94–102.
26. Turner J.N., Shain W., Szarowski D.H., Andersen M., Martins S., Isaacson M., Craighead H. // *Exp. Neurol.* 1999. V. 156. № 1. P. 33–49.
27. Heppner F.L., Ransohoff R.M., Becher B. // *Nat. Rev. Neurosci.* 2015. V. 16. № 6. P. 358–372.
28. Manocha G.D., Floden A.M., Rausch K., Kulas J.A., McGregor B.A., Rojanathammanee L., Puig K.R., Puig K.L., Karki S., Nichols M.R., et al. // *J. Neurosci.* 2016. V. 36. № 32. P. 8471–8486.
29. Paxinos G., Franklin K.B.J. *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates.* 2nd Edition. San Diego: Acad. Press, 2001. 133 c.
30. Deardorff W.J., Grossberg G.T. // *Handb. Clin. Neurol.* 2019. V. 165. P. 5–32.
31. Morganti-Kossmann M.C., Rancan M., Otto V.I., Stahel P.F., Kossmann T. // *Shock.* 2001. V. 16. № 3. P. 165–177.
32. Butterfield D.A., Halliwell B. // *Nat. Rev. Neurosci.* 2019. V. 20. P. 148–160.
33. Cheignon C., Tomas M., Bonnefont-Rousselot D., Faller P., Hureau C., Collin F. // *Redox Biol.* 2018. V. 14. P. 450–464.
34. Hinzman J.M., Thomas T.C., Quintero J.E., Gerhardt G.A., Lifshitz J. // *J. Neurotrauma.* 2012. V. 29. № 6. P. 1197–1208.
35. Dringen R., Hirrlinger J. // *Biol. Chem.* 2003. V. 384. № 4. P. 505–516.