

ОРИГИНАЛЬНАЯ СТАТЬЯ

УДК 577.1+615

doi: 10.26907/2542-064X.2024.2.283-296

БИОХИМИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ИНДУЦИРОВАННОГО ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОГО ПАРАЛИЧА ЗАДНИХ КОНЕЧНОСТЕЙ У МЫШЕЙ СТОКА СD-1

А.Н. Фаттахова¹, В.Г. Евтюгин¹, К.Н. Бушмелева²

¹Казанский (Приволжский) федеральный университет,
г. Казань, 420008, Россия

²Институт органической и физической химии имени А.Е. Арбузова ФИЦ «Казанский
научный центр РАН», г. Казань, 420088, Россия

Аннотация

Разработана модель фармакологического паралича задних конечностей у мышей. Во время первого периода, «подготовительного», ингибирование активности важного фермента обмена нейроаминов моноаминоксидазы А (МАО-А) приводило к повышению уровня стероидных гормонов и пролактина, снижению активности СYP 3A4 и СYP 2D6 в гепатоцитах и секреции астроцитарного белка S-100 в сыворотку крови. Во время второго периода, «манифестного», у мышей развивался паралич задних конечностей, наблюдалось накопление гранул кортизола, разрушение капилляров и агрегация деформированных эритроцитов в зоне коры и гиппокампа мозга.

Ключевые слова: МАО-А, моклобемид, фармакологический паралич у мышей.

Введение

Согласно Декларации по глобальной первичной профилактике инсульта и деменции Всемирной организации по борьбе с инсультом (2020 г.), при условии сохранения текущих тенденций профилактики инсульта к 2050 г. можно ожидать появления 200 млн пациентов с перенесенным инсультом и 106 млн пациентов, страдающих деменцией, а с каждым последующим годом – более 30 млн новых случаев инсульта, 12 млн случаев смерти от инсульта, 5 млн случаев смерти, вызванных деменцией. Такая ситуация представляет угрозу стабильности всей системы здравоохранения; однако ее можно предотвратить, поскольку значительная часть бремени заболеваний связана с потенциально модифицируемыми факторами риска и ранней диагностикой нейродегенеративных проявлений [1]. Современные стратегии первичной профилактики инсульта и сердечно-сосудистых заболеваний должны быть основаны на детектировании ранних маркеров апоптоза или некроза центральных нейронов и астроцитов до развития заболевания. Актуальной проблемой является разработка тестов для выявления предикторов инсульта и скрининга как всей популяции, так и пациентов из группы риска. Одним из предикторов может быть астроцитарный белок S-100 в периферической крови, который является маркером нарушения гематоэнцефалического барьера и обнаруживается у пациентов с нейродегенеративными заболеваниями

и диабетом [2, 3]. Проблема идентификации тканевых антигенов нервной ткани до развития инсульта остается острой [4].

Биохимические маркеры инсульта, которые выявляются у лабораторных животных, могут служить основанием для разработки экспресс-тестов для ранней диагностики факторов инсульта и выявления молекулярных маркеров неустойчивого состояния перед инсультом. Диагностика такого состояния является одним из важных способов профилактики инсультов [3].

Цель исследования состоит в разработке и биохимической характеристике модели фармакологического паралича задних конечностей и анализе содержания астроцитарного белка S100 как предиктора инсульта у мышей.

1. Материалы и методики исследования

1.1. Введение препарата мышам и получение органов и сыворотки крови для исследований. В опытах *in vivo* использовали мышей стока CD-1 обоего пола ($n = 50$), SPF-категории, предоставленных НПП «Питомник лабораторных животных» ФИБХ РАН, г. Пущино. Возраст животных к началу эксперимента составлял 4 недели, вес – 16–18 г. Мышей содержали, согласно Правилам содержания животных, в установке Techniplast IVC Transport Unit (Италия), на подстилке Rehofix (JRS, Германия), при условиях постоянной температуры 22–25 °C и влажности, в нормальном световом режиме. Животным предоставляли зерновой корм и воду *ad libitum*. Мыши были разделены на опытную и контрольную группы по 25 особей в каждой. Опытной группе один раз в день в течение 6 суток вводили внутривентально 100 мкл раствора селективного ингибитора моноаминоксидазы А (МАО-А) моклобемида (N-[2-(морфолин-4-ил)этил]-4-хлорбензамид) «Аурорикс» (La Roshe, Швейцария) в дозе 400 мг/кг в 0.9%-ном растворе NaCl. Через 6 суток 12 мышей опытной группы вывели из опыта. Оставшимся в опытной группе особям ($n = 13$) вводили раствор моклобемида в дозе 600 мг/кг в 0.9%-ном растворе NaCl и через 5 суток вывели их из опыта. Мыши в контрольной группе получали внутривентально 100 мкл 0.9%-ного раствора NaCl. По окончании эксперимента мышей контрольной группы вывели из опыта. Всех выведенных из опыта животных подвергали эвтаназии в камере с углекислым газом.

Пробы крови получали из левого желудочка сердца с помощью шприца и помещали кровь в вакуумные контейнеры с 0.2%-ным раствором этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА). Полученную кровь центрифугировали при 3000 g в течение 10 мин для осаждения форменных элементов крови и получения сыворотки. Сыворотку замораживали при –20 °C и использовали для определения гормонов и белка S-100. Печень, сердце и мозг животных экстерпарировали и помещали в раствор, содержащий 0.25 M сахарозы, 1 mM ЭДТА, 0.2 M трис-HCl буферный раствор с pH 7.4, и хранили при –18 °C. Микросомы печени, сердца и митохондриальные фракции мозга получали путем гомогенизирования и центрифугирования на холоду на центрифуге Optima L-90K ultracentrifuge (Beckman Coulter, США), как указано в работе [5]. Микросомные и митохондриальные фракции замораживали при –20 °C и использовали для определения активности МАО-А, цитохромов 3A4 и 2D6 [5]. Мозг животных использовали для получения ультратонких срезов и криосрезов для анализа с помощью просвечивающей электронной микроскопии и иммуноцитохимии.

1.2. Получение ультратонких срезов мозга мышей. Для получения ультратонких срезов использовали стандартный метод предварительной подготовки тканей [6], для чего мозг мыши инкубировали в растворе глутарового альдегида и обезживали в этаноле и пропиленоксиде, инкубировали в растворе OsO_4 и полимеризовали в смоле Эпон. Полученные с помощью микротомы Leica UC 7 (Carl Zeiss, Германия) ультратонкие срезы анализировали на электронном просвечивающем микроскопе JEM 100 CXII (JEOL, Япония).

1.3. Получение криосрезов мозга мышей для иммуцитохимического выявления гранул кортизола. С целью получения криосрезов для иммуцитохимического выявления гранул кортизола мозг мыши заливали в среду NEG 50 "Richard-Allan Scientific" (США), замораживали в криостате в течение 30 мин. Для изготовления срезов использовали криостат Microm HM 550 (Thermo Scientific, США), полученные срезы наносили на стекла "StarFrost" с полилизиновым покрытием. Срезы окрашивали с помощью коммерческого набора «Крезилловый фиолетовый» (Biovitrum, Россия) согласно инструкции фирмы-производителя и анализировали на световом микроскопе AXIO Vert A1 (Carl Zeiss, Германия). Для детектирования кортизола использовали первичные моноклональные антитела "Mouse IgG Cortisol-3" и вторичные антитела "Anti-mouse IgG Alexa Fluor 647" (Abcam, Великобритания). Полученные препараты анализировали с помощью конфокального лазерного микроскопа LSM 780 (Carl Zeiss, Германия).

1.4. Определение содержания гормонов в сыворотке крови мышей. Концентрацию гормонов пролактина, кортизола и дигидроэпиандростерон-сульфата (ДГЭА-С) в сыворотке крови мышей определяли методом твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА) с помощью коммерческих наборов «ИФА-пролактин», «СтероидИФА-кортизол», «ДГЭА-С-ИФА» (Алкор-Био, Россия) согласно инструкции фирмы-производителя. Концентрацию белка определяли спектрофотометрическим методом и рассчитывали по формуле $[c] = 1.58 \times A_{280} - 0.76 \times A_{260}$.

1.5. Определение активности МАО-А в микросомах и митохондриях тканей мышей. Активность МАО-А в митохондриальных фракциях мозга, микросомах сердца и печени мышей определяли по скорости дезаминирования норадреналина. Удельную активность выражали в нмоль 2,4-динитрофенилгидразона 3-метокси-4-гидроксиминдального альдегида, образовавшегося в 1 мг белка за 1 мин [5].

1.6. Определение концентрации и активности цитохромов P450 в микросомах печени и мозга мышей. Концентрацию цитохромов P450 в микросомах печени и мозга животных определяли по спектрам поглощения их фермент-субстратных комплексов, отравленных CO, и рассчитывали с помощью молярных коэффициентов поглощения $\epsilon_{450} = 91 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ для восстановленной формы цитохромов и $\epsilon_{420} = 41 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ для окисленной формы цитохромов [5]. В качестве субстратов для определения ферментативной активности CYP 3A4 и CYP 2D6 использовали лекарственные препараты эритромицин и флуоксетин (Озон Фарм, Россия) соответственно. Дифференциальные спектры опытных реакционных смесей относительно контрольной реакционной смеси получали на двухлучевом спектрофотометре UV-2700 (Shimadzu, Япония) при длине волны 340 нм в динамике в течение 5 мин. Активности гидроксирования эритроми-

цина и окислительного деалкилирования флуоксетина определяли по окислению НАДН в 1 мин на 1 нмоль СУР, используя молярный коэффициент поглощения для НАДН $\epsilon_{340} = 6.22 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ [5].

1.7. Иммунохимическое определение белка S-100 в сыворотке крови мышей. Сыворотку крови мышей разделяли с помощью стандартного денатурирующего электрофореза в полиакриламидном геле и проводили вестерн-блот-анализ фракций с помощью нитроцеллюлозных мембран (Invitrogen, США) согласно протоколу производителя (Bio-Rad, США) в течение 12 ч при постоянном напряжении 20 В в системе Bio-Rad для вестерн-блоттинга. Для детектирования белка S-100 мембраны инкубировали в буферном растворе, содержащем первичные моноклональные мышинные антитела против S-100 (Santa Cruz Biotechnology, США). В качестве вторичных антител использовали антимышинные моноклональные антитела, конъюгированные с пероксидазой (Sigma, Германия). В качестве хромогенного субстрата использовали диаминобензидин и 30%-ный H_2O_2 в 0.1 М трис-HCl, pH 7.6. Мембрану после окончания инкубации с субстратом анализировали на приборе ChemiDoc XRS+ (Bio-Rad, США).

1.8. Статистическая обработка результатов. Результаты представлены в виде $X \pm \text{SE}$, где X – среднее арифметическое значение величины, а SE – стандартная ошибка средней величины. Для оценки статистической значимости полученных результатов использовали параметрический критерий Стьюдента (t). Различия считали значимыми при $p < 0.05$. Все расчеты проводили с помощью программы EXCEL 13 (Microsoft, США).

2. Результаты исследования и их обсуждение

2.1. Биохимическая характеристика состояния мышей в «подготовительный» период, до паралича задних конечностей. Мыши стока CD-1 SPF-категории являются здоровыми животными и не несут в себе гены предрасположенности к каким-либо заболеваниям человека. Для индукции фармакологического ответа был использован обратимый ингибитор МАО-А моклобемид в дозах, превышающих рекомендованные дозы для пациентов и пересчитанных на вес животного с учетом коэффициента для лабораторной мыши, которые составили в среднем 0.4 мг/г веса мыши. Биохимические и физиологические эффекты от используемых в опытах доз моклобемида не описаны в фармакопейной статье данного лекарственного средства.

Анализ поведения и внешнего вида животных показал, что опытные мыши, особенно самцы, получавшие внутривбрюшинно по 100 мкл раствора моклобемида в дозе 400 мг/кг (6.8 мг/мышь), через 6 инъекций стали проявлять агрессивное поведение. Ранее в работах [7, 8] отмечалось агрессивное и аутичное поведение мышей, в геноме которых блокирован и не экспрессируется ген МАО-А (КО МАО-А мыши). Мыши, получавшие дозу 600 мг/кг (10.2 мг/мышь), после 5 инъекций стали ползать с парализованными задними конечностями по кругу. Они были выведены из опыта и подвергнуты эвтаназии в CO_2 -камере. Часть мозга мышей на границе гипоталамуса и коры с помощью секционного Атласа лабораторных мышей [9], согласно которому эта зона названа как *pes hippocampi* (Ammons's horn), и зона коры над этой структурой были выбраны для иммунохимического выявления гранул кортизола и исследований методом просвечи-

вающей электронной микроскопии. У мышей, получавших дозу 400 мг/кг, такие симптомы за время проведения опыта отсутствовали. Поэтому наблюдаемые симптомы, вызванные повышением дозы моклобемида, были отнесены к фармакологическим эффектам.

Анализ активности МАО-А, цитохромов P450 печени, определение содержания гормонов и астроцитарного белка S-100 в сыворотке крови проводили у мышей, получавших 400 мг/кг моклобемида в период, предшествующий параличу задних конечностей у мышей, получавших 600 мг/кг препарата.

Таким образом, проанализировано состояние, которое, возможно, привело к параличу задних конечностей у мышей. Согласно литературным данным, подавление активности МАО-А приводит к резкому увеличению концентрации норадреналина, адреналина, серотонина в синаптической зоне и возрастанию концентрации вазоактивного амина N-ацетилсеротонина в плазме крови [8]. В работе Zhao с соавторами [10] указано, что возрастание концентрации норадреналина и адреналина после инъекции ингибитора обратного захвата серотонина вызвало кровоизлияния в области сетчатки глаза у крыс. Моделирование локального ишемического повреждения коры головного мозга у крыс [11] привело к появлению в плазме крови ряда нейроспецифических белков, в том числе S-100.

Сравнительный анализ уровня МАО-А у опытных и контрольных мышей стока CD-1 (табл. 1) показал, что активность МАО-А с норадреналином в качестве субстрата у животных опытной группы достоверно снижалась в тканях сердца, мозга и печени по сравнению с показателями для животных контрольной группы.

Табл. 1

Активность МАО-А с норадреналином в митохондриальных фракциях и микросомах тканей органов мышей стока CD-1, получавших моклобеמיד в дозе 400 мг/кг (О), и контрольных животных (К) ($P = 0.95$)

Пол животных и число особей в группе	Удельная активность МАО-А, нмоль 2,4-динитрофенилгидразона 3-метокси-4-гидроксиминдального альдегида, образовавшегося в 1 мг белка за 1 мин					
	Сердце микросомы		Мозг митохондрии		Печень микросомы	
	К	О	К	О	К	О
Самцы: К(6); О(7)	1.5 ± 0.5	0.24 ± 0.01	0.58 ± 0.04	0.3 ± 0.1	2.40 ± 0.09	0.8 ± 0.2
Самки: К(6); О(6)	2.1 ± 0.2	0.3 ± 0.2	0.8 ± 0.2	0.31 ± 0.08	3.02 ± 0.01	0.9 ± 0.3

Таким образом, введение ингибитора МАО-А моклобемида в течение недели привело к стойкому снижению активности фермента во всех исследованных органах опытных животных, что характерно для антидепрессантов этого типа. Возможно, что подавление активности МАО-А высокими дозами моклобемида у мышей стока CD-1 привело к накоплению норадреналина, адреналина и серотонина в центральной нервной системе и вызвало агрессивное поведение животных, что характерно для синдрома немотивированной агрессии при низкой активности МАО-А [7, 8]. Для анализа влияния дефицита МАО-А на содержание гормонов в крови животных отбирали пробы во второй половине суток и

определяли уровень ДГЭА-С, кортизола и пролактина, поскольку показано, что снижение скорости метаболизма серотонина и норадреналина у лабораторных крыс приводило к активации гипоталамо-адренокортикального пути [8, 10] и повышению давления у КО МАО А мышей [12].

Интересно, что подавление активности МАО-А не оказывало влияния на уровень ДГЭА-С у мышей стока CD-1. В случае с кортизолом и пролактином наблюдали четкие гендерные различия. У самцов ингибирование активности МАО-А приводило к снижению уровня кортизола и пролактина на 60% и 62.5% ($p < 0.05$) соответственно. У самок, напротив, в этих же условиях выявлено повышение уровня кортизола и пролактина на 78% и 35% ($p < 0.05$) соответственно (табл. 2). По-видимому, гормональный ответ на изменение концентрации серотонина и норадреналина в центральной нервной системе во многих случаях зависит от пола животных. Известно, что кортизол способствует повышению артериального давления. Возможно, эффект кортизола обусловлен способностью гормона задерживать ионы натрия и влиять на сосудистый тонус и сенсibilизацию сосудов к вазоактивному эффекту норадреналина.

Табл. 2

Уровень гормонов в сыворотке крови мышей стока CD-1, получавших моклобемид в дозе 400 мг/кг (О), и контрольных животных (К) ($P = 0.95$)

Пол животных и число особей в группе	Дигидроэпиандростерон сульфат мкг/мл		Кортизол, пмоль/мл		Пролактин, мМЕ/л	
	К	О	К	О	К	О
Самцы: К(6); О(7)	0.26 + 0.01	0.29 + 0.02	78.8 + 0.2	31.4 + 0.2	3267 + 6	1224 + 15
Самки: К(6); О(6)	0.27 + 0.02	0.27 + 0.02	21.1 + 0.2	37.8 + 0.8	1245 + 25	1685 + 50

Известно, что стероидные гормоны являются регуляторами экспрессии и активности цитохромов P450 [13]. Возможно, изменение гормонального состояния опытных животных в условиях подавления активности МАО-А (табл. 2) может вызвать патологическое состояние всей системы детоксикации печени. Активность С-гидроксилирования эритромицина как маркера цитохрома P450 3A4 и N-деалкилирования флуоксетина как маркера цитохрома P450 2D6 достоверно снижалась у мышей, получавших моклобемид, независимо от пола особей (табл. 3).

Табл. 3

Активность цитохромов P450 3A4 и 2D6 в микросомах печени мышей стока CD-1, получавших моклобемид в дозе 400 мг/кг (О), и контрольных животных (К) ($P = 0.95$)

Пол животных и число особей в группе	3A4 с эритромицином, нмоль НАДН/нмоль СУР×мин		2D6 с флуоксетином, нмоль НАДН/ нмоль СУР×мин	
	К	О	К	О
Самцы: К(6); О(7)	6.3 + 0.7	3.1 + 0.2	5 + 1	4 + 1
Самки: К(6); О(6)	6.5 + 0.9	3.6 + 0.7	5.9 + 0.4	2.3 + 0.8

Следует отметить тот факт, что пролонгированное в течение 6 суток подавление активности МАО-А вызвало понижение активности двух самых

важных ферментативных систем детоксикации, цитохромов P450 3A4 и 2D6, на фоне изменения концентрации кортизола и пролактина в крови. Таким образом, можно признать, что ингибирование активности MAO-A и подавление активности цитохромов P450 печени вызвали классический стресс у опытных животных [8, 10, 12].

Белки S-100 представляют собой семейство Ca^{2+} -связывающих белков, которые в большом количестве экспрессируются в астроцитах и клетках нейроглии. Белки S-100 участвуют в регуляции фосфорилирования белков, энергетического обмена, сборки компонентов цитоскелета, миграции клеток, гомеостаза Ca^{2+} , а также в пролиферации и дифференциации клеток [2, 3]. Секретция белка S-100 в сыворотку крови считается маркером церебрального патологического процесса различной этиологии, геморрагического и ишемического инсультов [2, 3, 11], болезни Альцгеймера, нейродегенеративных процессов в результате хирургических операций и т. д. [14]. Белки S-100 присутствуют в тканях мозга в олигомерной форме с молекулярной массой около 10 кДа и в двумерной конформации [3].

В результате электрофоретического разделения сыворотки крови мышей стока CD-1 опытной и контрольной групп выделены фракции белков с молекулярным весом 37 и 12 кДа, которые предположительно соответствуют двумерной и олигомерной структурам S-100 [3] и обнаружены только в сыворотке крови мышей, получавших моклобемид в дозе 400 мг/кг (рис. 1).

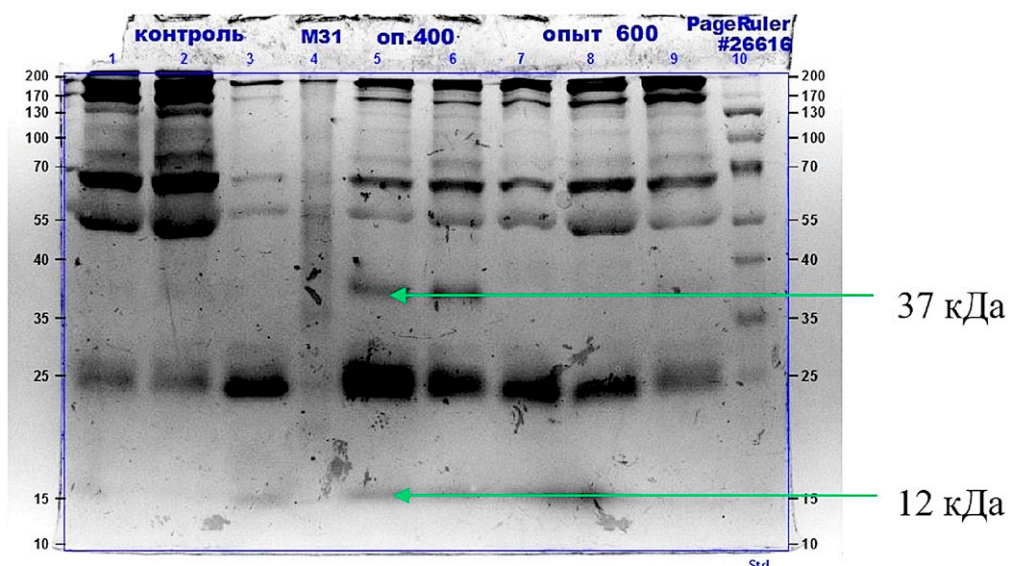


Рис. 1. Электрофореграмма белков в 12%-ном полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия: 1, 2, 3 – белки сыворотки крови мышей контрольной группы; 5, 6 – белки сыворотки крови мышей, получавших 400 мг/кг моклобемид; 7, 8, 9 – белки сыворотки крови мышей, получавших 600 мг/кг моклобемид; 4, 10 – маркеры молекулярного веса. Стрелкой указаны фракции 37 и 12 кДа

Вестерн-блот-анализ, в котором использовали первичные мышинные антитела против белка S-100 и вторичные антитела, конъюгированные с пероксидазой, показал, что в сыворотке крови мышей, получавших моклобемид в дозе 400 мг/кг, обнаружен белок S-100 в двумерной конформации и следы белка в

олигомерной конформации (рис. 2). Белок S-100B, член семейства S-100, является предиктором церебрального поражения у лабораторных животных [11]. Можно предположить, что высокие дозы ингибитора MAO-A моклобемида привели к возрастанию концентрации серотонина, норадреналина и вазоактивного амина N-ацетилсеротонина в ткани мозга мышей и, как следствие, к ишемии. Полученные данные о связи подавления активности MAO-A в мозге мышей и церебральной патологии подтверждаются результатами исследований ряда авторов [2, 3, 11].

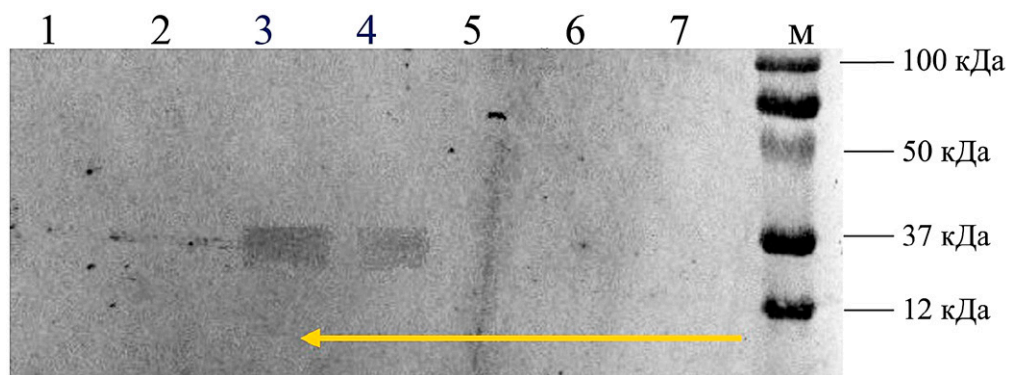


Рис. 2. Вестерн-блот-анализ белка S-100 после электрофоретического разделения в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия сыворотки крови мышей стока CD-1 контрольной и опытной групп. Детектирование белка S-100 проведено с помощью первичных моноклональных мышиных антител против белка S-100 и вторичных моноклональных антител, конъюгированных с пероксидазой, окраска диаминобензидином. 1, 2 – белки сыворотки крови мышей контрольной группы; 3, 4 – белки сыворотки крови мышей, получавших моклобеמיד в дозе 400 мг/кг; 5, 6, 7 – белки сыворотки крови мышей, получавших моклобеמיד в дозе 600 мг/кг; м – маркеры молекулярной массы. Стрелкой указаны следы белка S-100 в олигомерной форме

Таким образом, анализ биохимической картины состояния мышей в опытной группе до паралича задних конечностей показал, что подавление активности MAO-A под действием моклобемида в дозе 400 мг/кг (табл. 1) на фоне агрессивного поведения вызвало изменение содержания кортизола и пролактина в сыворотке крови (табл. 2), снижение активности главных систем детоксикации в печени, а именно CYP 3A4 и 2D6 (табл. 3), а также вызвало секрецию в кровь астроцитарного белка S-100 в двумерной конформации (рис. 1 и 2), что является маркером разрушения центральных астроцитов и ряда иных глиальных клеток [3, 4]. Известно, что белок S-100B в двумерной конформации секретируется астроцитами, пассивно высвобождается из поврежденных и/или некротических клеток. Наличие S-100B в плазме крови выше порогового уровня используется в диагностических/прогностических целях [3, 11].

2.2. Определение кортизола в ткани мозга мышей стока CD-1 с параличом задних конечностей. Для выявления патологических изменений в мозге мышей обоих полов с параличом задних конечностей криосрезы ткани мозга в зоне гиппокампа и коры (рис. 3, а) окрашивали крезильовым фиолетовым и анализировали методом световой микроскопии (рис. 3, б). Стрелками указаны неокрашенные включения.

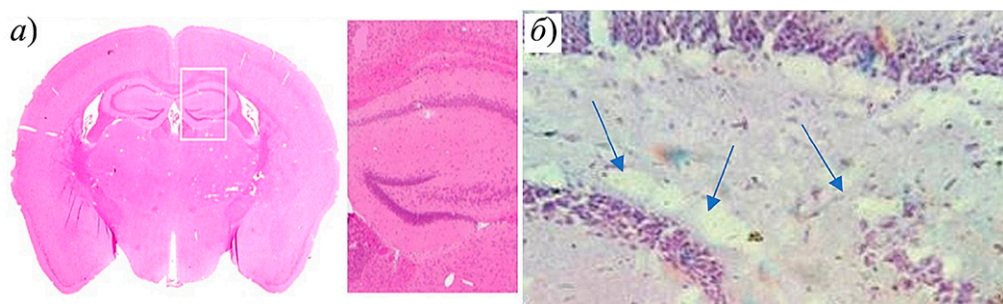


Рис. 3. Область исследования мозга на границе гиппокампа и коры мышей стока CD-1 с параличом задних конечностей: *а* – область мозга мышей CD-1, выбранная для исследования кровеносных капилляров и гранул кортизола; *б* – изображение световой микроскопии выбранной области исследования, краситель – крезильовый фиолетовый. Стрелками указаны включения, не являющиеся миелином или нейронами. Увеличение 400×

На криосрезах зоны гиппокампа и коры мозга мышей, получавших моклобемид в дозе 600 мг/кг и имевших паралич задних конечностей, обнаружено повышенное содержание кортизола независимо от пола (рис. 4, *а* и *б*), что, по нашему мнению, свидетельствует о значительном церебральном стрессе.

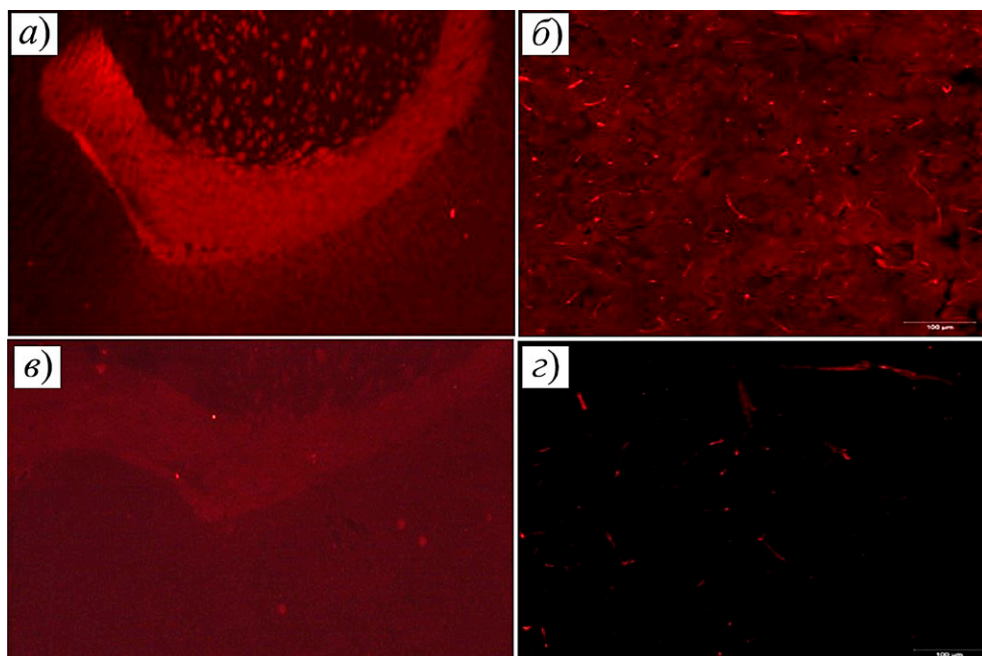


Рис. 4. Микрофотографии криосрезов мозга мышей стока CD-1 с параличом задних конечностей по данным конфокальной лазерной микроскопии: гранулы кортизола на криосрезах в области гиппокампа (*а*) и коры мозга (*б*) мышей опытной группы, получавших моклобемид в дозе 600 мг/кг; срез гиппокампа (*в*) и коры мозга (*г*) мышей, получавших 0.9%-ный NaCl. Увеличение 400×

Следует отметить, что содержание кортизола в сыворотке крови, установленное методом ИФА, отличалось у самцов и самок (табл. 2). Однако в криосрезах центральных областей гиппокампа и коры головного мозга независимо от гендерной принадлежности концентрация кортизола возрастала (рис. 4, *а–г*).

Вместе с тем, как известно, кортизол способствует адаптации к стрессу, повышенные концентрации этого гормона способствуют росту давления в ткани мозга [15] и, возможно, повышают вероятность разрушения астроцитов и нейронов и вероятность секреции астроцитарного белка S-100 (рис. 2).

2.3. Анализ ультратонких срезов мозга мышей. Анализ ультратонких срезов мозга (рис. 3, б) мышей опытной группы показал множественные кровоизлияния, нарушения капилляров и скопления атипичных эритроцитов (рис. 5, а). Подобные эффекты наблюдали ранее у лабораторных мышей и крыс при нарушении метаболизма нейромедиаторов [8, 10, 12]. Полученные в ходе проведенных исследований данные позволяют связать паралич задних конечностей с церебральным поражением, причиной которого является ингибитор МАО-А моклобемид в высокой дозе, превышающей терапевтические дозы для пациентов. В мозге мышей, получавших физиологический раствор, подобные нарушения целостности капилляров или скопления патологических эритроцитов не наблюдали (рис. 5, б).

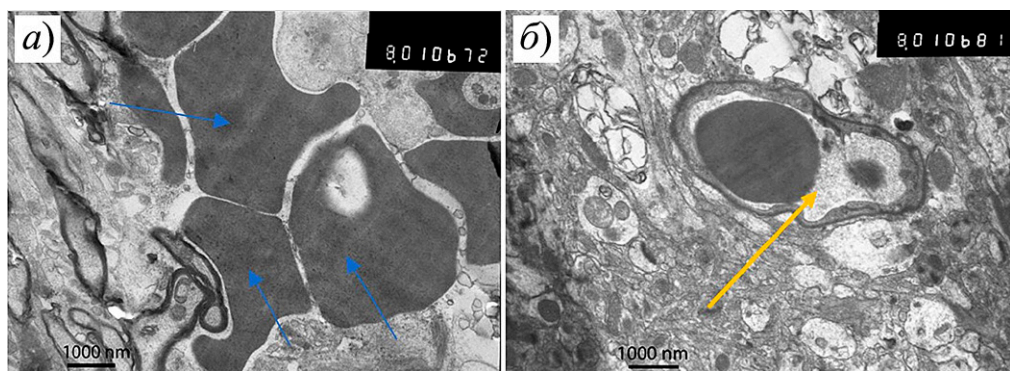


Рис. 5. Микрофотографии ультратонких срезов мозга мышей стока CD-1 с параличом задних конечностей: а – типичная картина ультратонкого среза мозга мышей, получавших моклобемид в дозе 600 мг/кг, голубыми стрелками показаны атипичные эритроциты вне кровеносного русла; б – типичная картина ультратонкого среза мозга мышей контрольной группы, желтой стрелкой показан кровеносный капилляр, окруженный непрерывной основной пластинкой, которая также покрывает поверхность перicyтов, охватывающих эндотелий

Таким образом, проведено исследование патологического процесса на примере модели индуцированного фармакологического паралича задних конечностей у мышей, вызванного моклобемидом.

Заключение Комитета по этике. Исследование проведено в соответствии с Хельсинкской декларацией 2000 г. «О гуманном отношении к животным», Европейской конвенцией о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (ETS N 123), и Директивой Европейского Парламента и Совета Европейского Союза 2010/63/ЕС о защите животных, используемых для научных целей. Протокол исследования одобрен Комиссией по биоэтике Казанского (Приволжского) федерального университета (протокол № 43 от 24.10.2023).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Литература

1. *Brainin M., Feigin V.L., Norrving B., Martins S.C.O., Hankey G.J., Hachinski V.* Global prevention of stroke and dementia: The WSO Declaration // *Lancet Neurol.* 2020. V. 19, No 6. P. 487–488. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(20\)30141-1](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(20)30141-1).
2. *Sorci G., Bianchi R., Riuizi F., Tubaro C., Arcuri C., Giambanco I., Donato R.* S100B protein, a damage-associated molecular pattern protein in the brain and heart, and beyond // *Cardiovasc. Psychiatry Neurol.* 2010. V. 2010. Art. 656481. <https://doi.org/10.1155/2010/656481>.
3. *Ercole A., Thelin E.P., Holst A., Bellander B.M., Nelson D.W.* Kinetic modelling of serum S100B after traumatic brain injury // *BMC Neurol.* 2016. V. 16, No 1. Art. 93. <https://doi.org/10.1186/s12883-016-0614-3>.
4. *Zhao Y., Zhang X., Chen X., Wei Y.* Neuronal injuries in cerebral infarction and ischemic stroke: From mechanisms to treatment // *Int. J. Mol. Med.* 2022. V. 49, No 2. Art. 15. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2021.5070>.
5. *Фаттахова А.Н.* Лабораторный практикум. Методическое руководство. Казань: Лаборатория оперативной печати Казанского педагогического колледжа, 2013. 30 с.
6. *Kuo J.* Electron microscopy // Walker J.M., Rapley R. (Eds.) *Molecular Biomechanics Handbook*. Ser.: Springer Protocols Handbooks. Totowa, NJ: Humana Press, 2008. P. 975–1008. https://doi.org/10.1007/978-1-60327-375-6_54.
7. *Chen K., Kardys A., Chen Y., Flink S., Tabakoff B., Shih J.C.* Altered gene expression in early postnatal monoamine oxidase A knockout mice // *Brain Res.* 2017. V. 1669. P. 18–26. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2017.05.017>.
8. *Bortolato M., Godar S.C., Tambaro S., Li F.G., Devoto P., Coba M.P., Chen K., Shih J.C.* Early postnatal inhibition of serotonin synthesis results in long-term reductions of perseverative behaviors, but not aggression, in MAO A-deficient mice // *Neuropharmacology.* 2013. V. 75. P. 223–232. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2013.07.003>.
9. *Iwaki T., Yamashita T., Haykawa T.* A Color Atlas of Sectional Anatomy of the Mouse. Braintree Sci. Inc., 2001. P. 78.
10. *Zhao H., Yin Y., Lin T., Wang W., Gong L.* Administration of serotonin and norepinephrine reuptake inhibitors tends to have less ocular surface damage in a chronic stress-induced rat model of depression than selective serotonin reuptake inhibitors // *Exp. Eye Res.* 2023. V. 231. Art. 109486. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2023.109486>.
11. *Суфьянова Г.З., Хлесткина М.С., Шапкин А.Г., Аргунова Г.А.* Концентрация нейроспецифических белков в плазме крови при моделировании фокального ишемического повреждения головного мозга у крыс // *International Scientific Review of the Problems of Modern Science and Education: Proc. LXII Int. Corresp. Sci. Pract. Conf.* Boston, 2019. P. 67–72.
12. *Lairez O., Calise D., Bianchi P., Ordener C., Spreux-Varoquaux O., Guilbeau-Frugier C., Escourrou G., Seif I., Roncalli J., Pizzinat N., Galinier M., Parini A., Mialet-Perez J.* Genetic deletion of MAO-A promotes serotonin-dependent ventricular hypertrophy by pressure overload // *J. Mol. Cell. Cardiol.* 2009. V. 46, No 4. P. 587–595. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2008.12.017>.
13. *Haduch A., Danek P.J., Kuban W., Pukło R., Alenina N., Gołębiowska J., Popik P., Bader M., Daniel W.A.* Cytochrome P450 2D (CYP2D) enzyme dysfunction associated with aging and serotonin deficiency in the brain and liver of female Dark Agouti rats // *Neurochem. Int.* 2022. V. 152. Art. 105223. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2021.105223>.
14. *Калинин Р.Е., Пшеничников А.С., Зорин Р.А., Сучков И.А., Соляник Н.А.* Биохимические показатели церебрального повреждения при операциях на сонных артериях (обзор

- литературы) // *Ангиология и сосудистая хирургия*. 2022. Т. 28, № 1. С. 148–153. <https://doi.org/10.33029/1027-6661-2022-28-1-148-153>.
15. *Виноградов Д.Б., Паначев И.В., Бабин К.А.* Изменения уровня кортизола и лабораторных показателей обмена биогенных аминов при алкогольном делирии // *Непрерывное медицинское образование и наука*. 2018. Т. 13. № 4. С. 16–19.

Поступила в редакцию 30.10.2023

Принята к публикации 27.12.2023

Фаттахова Альфия Нурлимановна, кандидат биологических наук, доцент кафедры биохимии, биотехнологии и фармакологии Института фундаментальной медицины и биологии

Казанский (Приволжский) федеральный университет

ул. Кремлевская, д. 18, г. Казань, 420008, Россия

E-mail: afattakh57@gmail.com

Евтюгин Владимир Геннадьевич, кандидат биологических наук, доцент кафедры зоологии и общей биологии Института фундаментальной медицины и биологии, директор Междисциплинарного центра «Аналитическая микроскопия»

Казанский (Приволжский) федеральный университет

ул. Кремлевская, д. 18, г. Казань, 420008, Россия

E-mail: vevtugyn@gmail.com

Бушмелева Ксения Николаевна, младший научный сотрудник лаборатории переработки растительного сырья для экологически чистого агрохозяйства

Институт органической и физической химии имени А.Е. Арбузова ФИЦ «Казанский научный центр РАН»

ул. Академика Арбузова, д. 8, г. Казань, 420088, Россия

E-mail: ks.bushmelewa09@yandex.ru

ISSN 2542-064X (Print)

ISSN 2500-218X (Online)

UCHENYE ZAPISKI KAZANSKOGO UNIVERSITETA. SERIYA ESTESTVENNYE NAUKI
(Proceedings of Kazan University. Natural Sciences Series)

2024, vol. 166, no. 2, pp. 283–296

ORIGINAL ARTICLE

doi: 10.26907/2542-064X.2024.2.283-296

Biochemical Characteristics of Pharmacologically Induced Hind Limb Paralysis in CD-1 Mice

A.N. Fattakhova^{a}, V.G. Evtugyn^{a**}, K.N. Bushmeleva^{b***}*

^aKazan Federal University, Kazan, 420008 Russia

*^bArbuzov Institute of Organic and Physical Chemistry, FRC Kazan Scientific Center,
Russian Academy of Sciences, Kazan, 420088 Russia*

E-mail: ^{}afattakh57@gmail.com, ^{**}vevtugyn@gmail.com, ^{***}ks.bushmelewa09@yandex.ru*

Received October 30, 2023; Accepted December 27, 2023

Abstract

A model of pharmacological paralysis in the hind limbs of CD-1 mice was introduced. In the initial phase (before paralysis), the activity of MAO-A, a key enzyme of neuroamine metabolism, was inhibited, leading to increased levels of steroid hormones and prolactin, as well as to a decrease in hepatic CYP3A4 and CYP2D6 activities and astrocytic S-100 protein secretion into the blood serum. In the second phase (paralysis manifestation), the mice exhibited hind limb paralysis development, accumulation of cortisol

granules, destruction of capillaries, and aggregation of deformed red blood cells in the cerebral cortex and hippocampal regions.

Keywords: MAO-A, moclobemide, pharmacological paralysis in mice

Institutional Review Board Statement. The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki (2000) for the humane treatment of research animals, the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes (ETS N 123), and the Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council on the protection of animals used for scientific purposes. The animal protocol was approved by the Commission on Bioethics of Kazan Federal University (protocol no. 43 dated October 24, 2023).

Conflicts of Interest. The authors declare no conflicts of interest.

Figure Captions

- Fig. 1. Electropherogram of serum proteins in 12% polyacrylamide gel with sodium dodecyl sulfate: 1, 2, 3 – serum proteins of control mice; 5, 6 – serum proteins of mice treated with 400 mg/kg moclobemide; 7, 8, 9 – serum proteins of mice treated with 600 mg/kg moclobemide; 4, 10 – molecular weight markers. The arrow indicates the 37 and 12 kDa fractions.
- Fig. 2. Western blot analysis of S-100 protein after electrophoretic separation in polyacrylamide gel with sodium dodecyl sulfate of control and experimental CD-1 mice serum. Detection of S-100 protein was performed using primary monoclonal mouse antibodies against S-100 protein and secondary monoclonal antibodies conjugated to peroxidase, diaminobenzidine staining. 1, 2 – serum proteins of control mice; 3, 4 – serum proteins of mice treated with 400 mg/kg moclobemide; 5, 6, 7 – serum proteins of mice treated with 600 mg/kg moclobemide; m – molecular weight markers. The arrow indicates S-100 protein traces in the oligomeric form.
- Fig. 3. Region of interest in the brain of CD-1 mice with hind limb paralysis at the hippocampal–cortical interface: *a* – brain region of CD-1 mice selected for studying blood capillaries and cortisol granules; *b* – light microscopy image of the selected brain region, cresyl violet staining. The arrows indicate inclusions that are not myelin or neurons. Magnification 400×.
- Fig. 4. Microphotographs of the brain cryosections from CD-1 mice with hind limb paralysis based on confocal laser microscopy: cortisol granules on the cryosections in the hippocampal (*a*) and cerebral cortex (*b*) regions of experimental mice treated with 600 mg/kg moclobemide; cryosections of the hippocampal (*c*) and cerebral cortex (*d*) regions of mice treated with 0.9% NaCl. Magnification 400×.
- Fig. 5. Microphotographs of the ultrathin sections of the brain of CD-1 mice with hind limb paralysis. *a* – typical picture of an ultrathin section of the brain in mice treated with 600 mg/kg moclobemide, the blue arrows indicate atypical red blood cells outside the bloodstream; *b* – typical picture of an ultrathin section of the brain in control mice, the yellow arrow shows the blood capillary surrounded by a continuous base plate, which also covers the surface of pericytes enclosing the endothelium.

References

1. Brainin M., Feigin V.L., Norrving B., Martins S.C.O., Hankey G.J., Hachinski V. Global prevention of stroke and dementia: The WSO Declaration. *Lancet Neurol.*, 2020, vol. 19, no. 6, pp. 487–488. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(20\)30141-1](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(20)30141-1).
2. Sorci G., Bianchi R., Riuzzi F., Tubaro C., Arcuri C., Giambanco I., Donato R. S100B protein, a damage-associated molecular pattern protein in the brain and heart, and beyond. *Cardiovasc. Psychiatry Neurol.*, 2010, vol. 2010, art. 656481. <https://doi.org/10.1155/2010/656481>.
3. Ercole A., Thelin E.P., Holst A., Bellander B.M., Nelson D.W. Kinetic modelling of serum S100B after traumatic brain injury. *BMC Neurol.*, 2016, vol. 16, no. 1, art. 93. <https://doi.org/10.1186/s12883-016-0614-3>.
4. Zhao Y., Zhang X., Chen X., Wei Y. Neuronal injuries in cerebral infarction and ischemic stroke: From mechanisms to treatment. *Int. J. Mol. Med.*, 2022, vol. 49, no. 2, art. 15. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2021.5070>.
5. Fattakhova A.N. *Laboratornyi praktikum. Metodicheskoe rukovodstvo* [A Practical Laboratory Course. Methodological Guide]. Kazan, Lab. Oper. Pechati Kazan. Pedagog. Koll., 2013. 30 p. (In Russian)

6. Kuo J. Electron microscopy. In: Walker J.M., Rapley R. (Eds.) *Molecular Biomethods Handbook*. Ser.: Springer Protocols Handbooks. Totowa, NJ, Humana Press, 2008, pp. 975–1008. https://doi.org/10.1007/978-1-60327-375-6_54.
7. Chen K., Kardys A., Chen Y., Flink S., Tabakoff B., Shih J.C. Altered gene expression in early postnatal monoamine oxidase A knockout mice. *Brain Res.*, 2017, vol. 1669, pp. 18–26. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2017.05.017>.
8. Bortolato M., Godar S.C., Tambaro S., Li F.G., Devoto P., Coba M.P., Chen K., Shih J.C. Early postnatal inhibition of serotonin synthesis results in long-term reductions of perseverative behaviors, but not aggression, in MAO A-deficient mice. *Neuropharmacology*, 2013, vol. 75, pp. 223–232. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2013.07.003>.
9. Iwaki T., Yamashita T., Haykawa T. *A Color Atlas of Sectional Anatomy of the Mouse*. Braintree Sci. Inc., 2001, p. 78.
10. Zhao H., Yin Y., Lin T., Wang W., Gong L. Administration of serotonin and norepinephrine reuptake inhibitors tends to have less ocular surface damage in a chronic stress-induced rat model of depression than selective serotonin reuptake inhibitors. *Exp. Eye Res.*, 2023, vol. 231, art. 109486. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2023.109486>.
11. Sufianova G.Z., Khlestkina M.S., Shapkin A.G., Argunova G.A. Neurospecific proteins in the blood plasma when modeling focal ischemic brain injury in rats. *International Scientific Review of the Problems of Modern Science and Education: Proc. LXII Int. Corresp. Sci. Pract. Conf.* Boston, 2019, pp. 67–72. (In Russian)
12. Lairez O., Calise D., Bianchi P., Ordener C., Spreux-Varoquaux O., Guilbeau-Frugier C., Escourrou G., Seif I., Roncalli J., Pizzinat N., Galinier M., Parini A., Mialet-Perez J. Genetic deletion of MAO-A promotes serotonin-dependent ventricular hypertrophy by pressure overload. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 2009, vol. 46, no. 4, pp. 587–595. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2008.12.017>.
13. Haduch A., Danek P.J., Kuban W., Puklo R., Alenina N., Gołębiowska J., Popik P., Bader M., Daniel W.A. Cytochrome P450 2D (CYP2D) enzyme dysfunction associated with aging and serotonin deficiency in the brain and liver of female Dark Agouti rats. *Neurochem. Int.*, 2022, vol. 152, art. 105223. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2021.105223>.
14. Kalinin R.E., Pshennikov A.S., Zorin R.A., Suchkov I.A., Solyanik N.A. Biochemical parameters of cerebral lesions in carotid artery surgery (a literature review). *Angiol. Sosudistaya Khir.*, 2022, vol. 28, no. 1, pp. 148–153. <https://doi.org/10.33029/1027-6661-2022-28-1-148-153>. (In Russian)
15. Vinogradov D.B., Panachev I.V., Babin K.A. Changes in the level of cortisol and the laboratory parameters of biogenic amine metabolism in alcoholic delirium. *Nepreryvnoe Med. Obraz. Nauka*, 2018, vol. 13, no. 4, pp. 16–19. (In Russian)

⟨ Для цитирования: Фаттахова А.Н., Евтюгин В.Г., Бушмелева К.Н. Биохимическая характеристика индуцированного фармакологического паралича задних конечностей у мышей стока CD-1 // Учен. зап. Казан. ун-та. Сер. Естеств. науки. 2024. Т. 166, кн. 2. С. 283–296. <https://doi.org/10.26907/2542-064X.2024.2.283-296>. ⟩

⟨ For citation: Fattakhova A.N., Evtugyn V.G., Bushmeleva K.N. Biochemical characteristics of pharmacologically induced hind limb paralysis in CD-1 mice. *Uchenye Zapiski Kazanskogo Universiteta. Seriya Estestvennye Nauki*, 2024, vol. 166, no. 2, pp. 283–296. <https://doi.org/10.26907/2542-064X.2024.2.283-296>. (In Russian) ⟩