

Эффекты применения пробиотического штамма U-21 в комбинированной модели паркинсонического синдрома у крыс

Ставровская А.^{1*}, Воронков Д.¹, Ольшанский А.¹, Кутукова К.¹, Марсова М.², Даниленко В.², Иллариошкин С.¹

¹ ФГБНУ «Научный центр неврологии», Москва, Россия

² ФГБУН Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, Москва, Россия

* alla_stav@mail.ru

Ключевые слова: болезнь Паркинсона; нейровоспаление; пробиотик; биомодель

Мотивация и цель: Данные об участии микробиоты в развитии болезни Паркинсона позволяют обсуждать способность бактериальных препаратов влиять на процессы, приводящие к нейродегенерации [1]. Целью работы была оценка влияния фармабиотика U-21 на основе штамма *Limosilactobacillus fermentum* на исходы модели БП, полученной при комбинированном воздействии ЛПС и параквата.

Методы и алгоритмы: Работа проведена на 30 самцах крыс Вистар (вес 330 г). Животным ($n = 18$) в компактную часть черной субстанции (кЧС) [2] справа вводили раствор липополисахарида из *E. Coli* (LPS) (4 мкг в 3 мкл физраствора), с левой стороны – тот же объем растворителя. Для анестезии применяли ксило-золетилловый наркоз. Начиная со 2-го дня после операции крысам через день внутрибрюшинно провели 7 инъекций параквата (Pq) в дозе 8 мг/кг в 0.9% NaCl. Контрольным животным ($n = 12$) проводили билатеральные интранигральные и внутрибрюшинные инъекции физраствора. Фармабиотик U-21 (108 КОЕ) [3] разводили в 3 мл физиологического раствора и вводили перорально, ежедневно по 0.3 мл раствора.

Далее животные были разделены на 4 группы: “NaCl+NaCl+NaCl”, “NaCl+NaCl+U-21” (по 6 в каждой группе) и “LPS+Pq+NaCl” и “LPS+Pq+U-21” (по 9 в каждой группе). Нарушения локомоции оценивали в тесте «Сужающаяся дорожка» (СД) [4] по количеству соскальзываний конечностей на нижнюю планку дорожки (в % от общего количества шагов). Тест проводили по окончании введения препаратов.

Для морфологического исследования животных декапитировали гильотиной, мозг извлекали и фиксировали 24 ч в 10 % формалине. На криостатных срезах ЧС (10 мкм), после обработки в цитратном буфере (pH = 6.0, 15 мин при 95 °C) иммунофлуоресцентным методом по протоколам производителей антител выявляли: тирозингидроксилазу (TH), α -синуклеин, фосфорилированный по остатку Ser-129, компонент C3 комплемента, нейрональный белок NeuN, глиофибрилярный белок астроцитов GFAP и маркер микроглии IBA1. Для визуализации применяли

антитела с флуорохромами CF488 и CF555, срезы заключали в среду Fluoroshield с DAPI.

Используя микроскопы Nikon Eclipse Ni-u и Nikon SMZ-25 и программу NIS Elements BR 4.2, на сериях из 12–18 срезов, взятых с равным интервалом на всем протяжении ЧС, оценивали интенсивность флуоресценции (в градациях яркости, 10 бит). Результаты для каждого животного усредняли. Вычисляли изменения в процентах, относительно левой, контрольной ЧС (без введения LPS) и обрабатывали в программе Prism 8.0, используя дисперсионный анализ (ANOVA) и тест Тьюки. Различия считали статистически значимыми при $p < 0.05$.

При иммунофлуоресцентном исследовании кишечника образцы тощей кишки фиксировали в течение 1 суток забуференным формалином, пропитывали 30 % раствором сахарозы и на криостате получали срезы толщиной 10 мкм. Иммунофлуоресцентные реакции проводили непрямым методом, используя первичные антитела к общему α -синуклеину (α -Syn), α -синуклеину, фосфорилированному по серину-129 (α -Syn-pS129) и маркер апоптоза – активированную каспазу 3, а также вторичные антитела, меченные флуорохромами CF448 и Cy3. Препараты исследовали и фотографировали под микроскопом NikonEclipse NiU с цифровой камерой Nikon DS-Qi. Морфометрию выполняли с помощью программы ImageJ (30–40 полей зрения на животное). Содержание общего и фосфорилированного α -синуклеина в миентеральных ганглиях оценивали косвенно путём измерения интенсивности флуоресцентного окрашивания на эти маркеры на площадь ганглия. Статистический анализ проводили в программе Statistica 8.0. при помощи критерия Манна–Уитни, различия признавали статистически значимыми при $p < 0.05$.

Результаты: Введение токсинов привело к увеличению числа соскальзываний задними конечностями, как по сравнению с числом соскальзываний передних конечностей у животных той же группы ($p = 0.021$), так и с числом соскальзываний задних конечностей по сравнению с контрольными группами ($p = 0.004$; $p = 0.018$). При введении фармабиотика U-21 была выявлена тенденция к сглаживанию выявленных нарушений локомоции как между модельными, так и контрольными группами.

Средняя интенсивность окрашивания на TH, на стороне введения LPS значимо ($p = 0.004$) снижалась в обеих группах с моделированием БП (“LPS+Pq+U-21” и “LPS+Pq+NaCl”) относительно контрольных групп.

Статистически значимое ($p = 0.012$) увеличение интенсивности окрашивания на α -Syn-pS129 выявили на стороне введения LPS в группе, не получавшей U-21. Содержащих α -синуклеин агрегатов у животных, получавших LPS и Pq, не выявили, но обнаруживали интенсивное окрашивание на α -Syn-pS129 в не-дофаминергических нервных волокнах и округлые, негативные к тирозингидроксилазе, внеклеточные включения.

В ЧС животных, получавших LPS+Pq, отмечали реактивные изменения IBA1-позитивной микроглии и GFAP-содержащих астроцитов относительно контроля. В группе "LPS+Pq+NaCl" деформация и гипертрофия отростков глии и усиление окрашивания были выраженные, чем в группе "LPS+Pq+U-21".

Окрашивание на C3 компонент комплемента в ЧС у контрольных животных выявляли преимущественно в нейропиле, тогда как в обеих группах, получавших LPS+Pq, отмечали окрашивание тел нейронов. При этом выраженность провоспалительной реакции в группе "LPS+Pq+NaCl" была выше, чем в других группах, что подтверждалось увеличением интенсивности окрашивания на компонент C3 комплемента ($p = 0.047$).

Исследование образцов кишечника показало, что введение LPS+Pq не вызывало апоптоза в ганглиях межмышечного сплетения тонкой и толстой кишки. Дополнительное введение штамма заметно снижало уровень апоптоза клеток эпителия толстой кишки. Кроме этого, введение LPS+Pq вызывало повышение интенсивности иммунофлуоресцентного окрашивания на α -Syn-pS129 в миентеральных ганглиях тонкой кишки, по сравнению с контролем. Введение штамма крысам-моделям БП достоверно снижало интенсивность иммунофлуоресцентного окрашивания на α -Syn-pS129 в миентеральных ганглиях тонкой и толстой кишки.

Выводы: Применение фармабиотика не привело к значимому ослаблению нарушений локомоции крыс-биомodelей. Морфологическое исследование показало, что штамм U-21 не повлиял на степень повреждения нейронов ЧС в комбинированной модели LPS+Pq, но при этом использование фармабиотика снижало накопление α -Syn-pS129 и провоспалительные изменения в веществе мозга. В целом, полученные результаты свидетельствуют о явном потенциале фармбиотика U-21 для предотвращения накопления БП-ассоциированного α -Syn и α -Syn-pS129, а также его возможного дальнейшего распространения по структурам ПНС и ЦНС на начальных стадиях развития паркинсонизма.

Финансирование: Работа поддержана грантом Министерства науки и высшего образования РФ для проведения крупных научных проектов по приоритетным направлениям научно-технологического развития (проект № 075-15-2024-638).

Effects of the probiotic strain U-21 in a combined model of parkinsonian syndrome in rats

Stavrovskaya A.^{1*}, Voronkov D.¹, Olshansky A.¹, Kutukova K.¹, Marsova M.²,
Danilenko V.², Illarioshkin S.¹

¹ Research Center of Neurology, Moscow, Russia

² Vavilov Institute of General Genetics, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

* alla_stav@mail.ru

Key words: Parkinson's disease; neuroinflammation; probiotic; biomodel

Motivation and Aim: Data on the involvement of microbiota in the development of Parkinson's disease allow discussing the ability of bacterial preparations to influence the processes leading to neurodegeneration [1]. The aim of the work was to evaluate the effect of the pharmabiotic U-21 based on the *Limosilactobacillus fermentum* strain on the outcomes of a PD model obtained by the combined action of LPS and paraquat.

Methods and Algorithms: The work was carried out on 30 male Wistar rats (weight 330 g). The animals ($n = 18$) were injected with a solution of lipopolysaccharide from *E. Coli* (LPS) (4 μg in 3 μl of saline) into the compact part of the substantia nigra (SNc) [2] on the right, and the same volume of solvent on the left side. Xyla-zoletil anesthesia was used. Starting from the 2nd day after the operation, the rats were injected intraperitoneally with paraquat (Pq) at a dose of 8 mg/kg in 0.9 % NaCl every other day for 7 injections. Control animals ($n = 12$) underwent bilateral intranigral and intraperitoneal injections of saline. The pharmabiotic U-21 (108 CFU) [3] was diluted in 3 ml of saline and administered orally, daily at 0.3 ml of solution.

The animals were then divided into 4 groups: "NaCl+NaCl+NaCl", "NaCl+NaCl+U-21" (6 in each group) and "LPS+Pq+NaCl" and "LPS+Pq+U-21" (9 in each group). Locomotor disorders were assessed in the "Narrowing Beam" test (NB) [4] by the number of slips of the limbs onto the lower plank of the track (as a % of the total number of steps). The test was carried out at the end of drug administration.

For morphological examination, the animals were decapitated with a guillotine, the brain was removed and fixed for 24 h in 10 % formalin. On cryostat sections of the SNc (10 μm), after treatment in citrate buffer (pH = 6.0, 15 min at 95 $^{\circ}\text{C}$), the following were detected by immunofluorescence according to the protocols of the antibody manufacturers: tyrosine hydroxylase (TH), α -synuclein phosphorylated at Ser-129 (α -Syn-pS129) residue, complement component C3, neuronal protein NeuN, glial fibrillary acidic protein GFAP and microglia marker IBA1. For visualization, antibodies with CF488 and CF555 fluorochromes were used, the sections were enclosed in Fluoroshield medium with DAPI.

Using Nikon Eclipse Ni-u and Nikon SMZ-25 microscopes, and the NIS Elements BR 4.2 program, on a series of 12–18 sections taken at equal intervals throughout the SNc, the fluorescence intensity was assessed (in brightness gradations, 10 bits). The results for each animal were averaged. Changes were calculated as a percentage relative to the left, control SNc (without LPS injection) and processed in the Prism 8.0 program using analysis of variance (ANOVA) and Tukey's test. Differences were considered statistically significant at $p < 0.05$.

In the immunofluorescence study of the intestine, samples of the jejunum were fixed for 1 day with buffered formalin, impregnated with a 30 % sucrose solution, and 10 μm thick sections were obtained on a cryostat. Immunofluorescence reactions were carried out by the indirect method using primary antibodies to total α -synuclein (α -Syn), α -Syn-pS129 and the apoptosis marker activated caspase 3, as well as secondary antibodies labeled with CF448 and Cy3

fluorochromes. The preparations were examined and photographed under a Nikon Eclipse NiU microscope with a Nikon DS-Qi digital camera. Morphometry was performed using the ImageJ program (30–40 fields of view per animal). The content of total and phosphorylated α -synuclein in the myenteric ganglia was assessed indirectly by measuring the intensity of fluorescent staining for these markers per ganglion area. Statistical analysis was performed in the Statistica 8.0 program using the Mann–Whitney test, differences were considered statistically significant at $p < 0.05$.

Results: The administration of toxins led to an increase in the number of slips by the hind limbs, both in comparison with the number of slips of the forelimbs in animals of the same group ($p = 0.021$), and with the number of slips of the hind limbs compared to the control groups ($p = 0.004$; $p = 0.018$). With the administration of the pharmabiotic U-21, a tendency to smooth out the identified locomotor disorders was revealed both between the model and control groups.

The average staining intensity for TH on the side of LPS injection significantly ($p = 0.004$) decreased in both groups with PD modeling ("LPS+Pq+U-21" and "LPS+Pq+NaCl") relative to the control groups.

A statistically significant ($p=0.012$) increase in the staining intensity for α -Syn-pS129 was revealed on the side of LPS injection in the group not receiving U-21. Aggregates containing α -synuclein were not detected in animals receiving LPS and Pq, but intense staining for α -Syn-pS129 was found in non-dopaminergic nerve fibers and round, tyrosine hydroxylase-negative, extracellular inclusions.

In the SNc of animals receiving LPS+Pq, reactive changes in IBA1-positive microglia and GFAP-containing astrocytes were noted relative to the control. In the "LPS+Pq+NaCl" group, the deformation and hypertrophy of glial processes and increased staining were more pronounced than in the "LPS+Pq+U-21" group. Staining for complement component C3 in the SNc in control animals was detected mainly in the neuropil, whereas in both groups receiving LPS+Pq, staining of neuronal bodies was noted. At the same time, the severity of the pro-inflammatory reaction in the "LPS+Pq+NaCl" group was higher than in other groups, which was confirmed by an increase in the staining intensity for complement component C3 ($p = 0.047$).

The study of intestinal samples showed that the introduction of LPS+Pq did not cause apoptosis in the ganglia of the intermuscular plexus of the small and large intestine. Additional administration of the strain noticeably reduced the level of apoptosis of colon epithelial cells. In addition, the introduction of LPS+Pq caused an increase in the intensity of immunofluorescent staining for α -Syn-pS129 in the myenteric ganglia of the small intestine, compared with the control. The introduction of the strain to PD model rats significantly reduced the intensity of immunofluorescent staining for α -Syn-pS129 in the myenteric ganglia of the small and large intestine.

Conclusion: The use of the pharmabiotic did not lead to a significant reduction in locomotor disorders in bio-model rats. Morphological study showed that the U-21 strain did not affect the degree of damage to SNc neurons in the combined

LPS+Pq model, but at the same time, the use of the pharmabiotic reduced the accumulation of α -Syn-pS129 and pro-inflammatory changes in the brain substance. In general, the results obtained indicate the clear potential of the U-21 pharmabiotic for preventing the accumulation of PD-associated α -Syn and α -Syn-pS129, as well as its possible further spread through the structures of the PNS and CNS at the initial stages of the development of parkinsonism.

Funding: The study was supported by a grant from the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation for major scientific projects in priority areas of scientific and technological development (project No. 075-15-2024-638).

Список литературы/References

1. Alipour Nosrani E., Tamtaji O.R., Alibolandi Z. et al. Neuroprotective effects of probiotics bacteria on animal model of Parkinson's disease induced by 6-hydroxydopamine: A behavioral, biochemical, and histological study. *J Immunoassay Immunochem.* 2021;42(2):106-120. doi 10.1080/15321819.2020.1833917
2. Иллариошкин С.Н., Левин О.С., Федотова Е.Ю., Колоколов О.В. Паркинсонизм и Черная Субстанция. Судьба Великого Открытия. М.: ООО Издательское предприятие "Атмосфера", 2019
3. Даниленко В.Н., Марсова М.В., Полуэктова Е.У. и др. Штамм *Lactobacillus fermentum* U-21, продуцирующий комплекс биологически активных веществ, осуществляющих нейтрализацию супероксид-аниона, индуцируемого химическими агентами. Патент на изобретение RU 2705250 C2, 06.11.2019. Заявка № 2018104322 от 05.02.2018
4. Sweis B.M., Bachour S.P., Brekke J.A. et al. A modified beam-walking apparatus for assessment of anxiety in a rodent model of blast traumatic brain injury. *Behav Brain Res.* 2016;296:149-156. doi 10.1016/j.bbr.2015.09.015