

## ПОВЕДЕНЧЕСКИЕ АНОМАЛИИ В ГЕНЕТИЧЕСКОЙ МОДЕЛИ МИОДИСТРОФИИ ДЮШЕННА У МЫШЕЙ

© Солдатов В.О.<sup>1</sup>, Карагодина А.Ю.<sup>1</sup>, Патраханов Е.А.<sup>1</sup>, Покровский В.М.<sup>1</sup>, Пученкова О.А.<sup>1</sup>, Белашова А.В.<sup>1</sup>, Егорова Т.В.<sup>2</sup>, Поликарпова А.В.<sup>2</sup>, Дейкин А.В.<sup>1</sup>, Покровский М.В.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Белгородский государственный национальный исследовательский университет (НИУ БелГУ)

Россия, 308015, Белгородская обл., г. Белгород, ул. Победы, д. 85

<sup>2</sup> Институт биологии гена РАН (ИБГ РАН)

Россия, 119334, г. Москва, ул. Вавилова, д.34/5

Мутации гена *Dmd*, кодирующего мембранный белок дистрофин, ассоциированы с развитием тяжелых X-сцепленных мышечными заболеваниями – миодистрофии Дюшенна и Беккера. При этом наряду с классическими симптомами со стороны поперечнополосатой мускулатуры мутации дистрофина могут приводить к снижению когнитивных функций и поведенческим аномалиям.

**Цель:** проведение пилотного анализа поведенческих и когнитивных особенностей у мышей с генетическим дефектом, воспроизводящим фенотип миодистрофии Дюшенна.

**Материалы и методы.** Для оценки особенностей моторных функций и поведения мыши *Dmd*<sup>Del8-34</sup> (n=13) и контрольные животные дикого типа (n=12) были подвергнуты исследованию в тестах «Удержание груза», «Ротарод», «Приподнятый крестообразный лабиринт» и «Распознавание объектов».

**Результаты.** Было обнаружено, что мыши, несущие мутацию *Dmd*<sup>Del8-34</sup> характеризуются снижением моторных функций, демонстрируют признаки тревожности, а также проявляют низкую исследовательскую активность. Обнаруженные особенности когнитивного и эмоционального статуса совпадают с клиническими наблюдениями, свидетельствующими о повышенном риске развития у пациентов с мутациями гена *Dmd* расстройств аутистического спектра и обсессивно-компульсивного расстройства. Таким образом было доказано, что с 8 недели жизни мыши линии *Dmd*<sup>Del8-34</sup> демонстрируют снижение показателей в тестах «Ротарод» и «Удержание груза». Поведенческое тестирование в тесте «Приподнятый крестообразный лабиринт» выявило снижение времени, достигающее статистически достоверной разницы в сравнении с контролем дикого типа на 12й неделе и при оценке когнитивных функций в тесте «Распознавание объектов» было показано, что мыши *Dmd*<sup>Del8-34</sup> демонстрируют увеличение значения индекса дискриминации, что является признаком увеличения эффективности гиппокампальной памяти.

**Заключение.** Проведенное исследование позволило выявить некоторые поведенческие аномалии у генетически-модифицированных мышей, несущих крупную делецию экзонов 8-34 гена *Dmd*, кодирующего дистрофин.

**Ключевые слова:** транскрипция; миодистрофия Дюшенна; поведенческие тесты; моторные нарушения.

**Солдатов Владислав Олегович** – канд. мед. наук, науч. сотрудник Лаборатории геномного редактирования в биомедицине и ветеринарии, НИУ БелГУ, г. Белгород. ORCID iD: 0000-0001-9706-0699. E-mail: [pharmsoldatov@gmail.com](mailto:pharmsoldatov@gmail.com) (автор, ответственный за переписку)

**Карагодина Анастасия Юрьевна** – мл. науч. сотрудник НИИ фармакологии живых систем, НИУ БелГУ, г. Белгород. ORCID iD: 0000-0001-9440-5866. E-mail: [anastasiavolmedic@gmail.com](mailto:anastasiavolmedic@gmail.com)

**Патраханов Евгений Александрович** – мл. науч. сотрудник НИИ фармакологии живых систем, НИУ БелГУ, г. Белгород. ORCID iD: 0000-0002-8415-4562. E-mail: [pateval7@gmail.com](mailto:pateval7@gmail.com)

**Покровский Владимир Михайлович** – мл. науч. сотрудник НИИ фармакологии живых систем, НИУ БелГУ, г. Белгород. ORCID iD: 0000-0003-3138-2075. E-mail: [vmypokrovsky@yandex.ru](mailto:vmypokrovsky@yandex.ru)

**Пученкова Олеся Андреевна** – мл. науч. сотрудник мл. науч. сотрудник НИИ фармакологии живых систем, НИУ БелГУ, г. Белгород. ORCID iD: 0000-0002-7657-0937. E-mail: [lesya759@yandex.ru](mailto:lesya759@yandex.ru)

**Белашова Анастасия Владимировна** – студент, НИУ БелГУ, г. Белгород. ORCID iD: 0000-0001-9737-6378. E-mail: [belashova\\_av@mail.ru](mailto:belashova_av@mail.ru)

**Егорова Татьяна Владимировна** – науч. сотрудник лаборатории моделирования и терапии наследственных заболеваний, ИБГ РАН, г. Москва. ORCID iD: 0000-0002-3346-3242. E-mail: [egorovatv@genebiology.ru](mailto:egorovatv@genebiology.ru)

**Поликарпова Анна Вадимовна** – канд. биол. наук, науч. сотрудник лаборатории моделирования и терапии наследственных заболеваний, ИБГ РАН, г. Москва. ORCID iD: 0000-0001-9442-8371. E-mail: [a.polikarpova.marlin@gmail.com](mailto:a.polikarpova.marlin@gmail.com)

**Дейкин Алексей Васильевич** – канд. биол. наук, доцент, директор «Объединенный центр генетических технологий», НИУ БелГУ, г. Белгород. ORCID iD: 0000-0001-9960-0863. E-mail: [deykin@bsu.edu.ru](mailto:deykin@bsu.edu.ru)

**Покровский Михаил Владимирович** – д-р мед. наук, профессор кафедры фармакологии и клинической фармакологии, руководитель НИИ фармакологии живых систем, НИУ БелГУ, г. Белгород. ORCID iD: 0000-0002-2761-6249. E-mail: [mpokrovsky@yandex.ru](mailto:mpokrovsky@yandex.ru)

Поддержание структурной и ультраструктурной целостности мышечной ткани является результатом непосредственного вклада тысяч структурных белков [1]. Ключевую роль в их числе занимают белки цитоскелета, участвующие

в формировании пространственной организации, обеспечении физико-механических свойств и сократительной активности миоцитов [2, 3]. При этом закономерным последствием мутаций в данных белках является развитие

анатомических и функциональных аномалий, объединенных термином «наследственные миопатии».

Среди наиболее изучаемых белков, аномалии которых ассоциированы с наследственными миопатиями, можно выделить дистрофин. Мутации в гене *Dmd*, кодирующем дистрофин, являются причиной развития наиболее распространенных X-сцепленных мышечных дистрофий – миодистрофии Дюшенна и миодистрофии Беккера. Дистрофин располагается на мышечной сарколемме в мембранном белковом комплексе, который соединяет цитоскелет с базальной мембраной [4]. Хотя точная функция дистрофина неизвестна, доказано, что данный белок участвует в механической стабилизации сарколеммы, а его недостаток приводит к механическому повреждению мембран и активации множества патофизиологических процессов, многие из которых сходятся на изменении внутриклеточной динамики кальция [5]. Кроме того, поскольку дистрофин играет важную роль в процессах митотического деления, при болезни Дюшенна нарушается клеточная поляриность и миогенная дифференцировка стволовых клеток [6]. Стволовые клетки, лишённые функционального дистрофина, подвергаются aberrantному асимметричному делению с амплификацией centrosом, ошибками ориентации веретена и удлинённым клеточным циклом [7, 8].

В случае утраты белкового продукта дистрофина вследствие крупных делеций или сдвига рамки считывания сарколемма становится уязвимой к механическим деформациям, возникающим при сокращении или растяжении мышц. При этом накапливаются структурные повреждения, которые приводят к развитию воспаления и фиброза, ограничивающих функциональные резервы мышечной ткани [9]. Как следствие, доминирующими симптомами при *Dmd*-ассоциированных миодистрофиях являются мышечная гипотония, а также сердечная и дыхательная недостаточность. Однако, помимо мышечных симптомов, в спектре клинических проявлений миодистрофии Дюшенна [10] и миодистрофии Беккера [11] также были описаны поведенческие и когнитивные нарушения разной степени выраженности. По всей видимости, причиной нейропсихических аномалий при дистрофинопатиях является вовлечённость дистрофина в развитие или функционирование нервной системы [12]. Транскриптомный анализ показывает, что уровень экспрессии дистрофина в нервной ткани составляет около 10% от такового в миоцитах, но разнообразие его изоформ в головном мозге значительно выше, чем в скелетных мышцах [13-15].

В целом, выяснение нейробиологических аспектов дистрофинопатии представляет несомненный интерес как с фундаментальной, так и с практической точки зрения. В данной работе нами была поставлена цель провести пилотный анализ поведенческих и когнитивных особенностей у мышей с генетическим дефектом, воспроизводящим фенотип миодистрофии Дюшенна.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

*Создание мышинной модели миодистрофии Дюшенна.* В исследовании были использованы генетически-модифицированные мыши, полученные в 2019 г. с помощью CRISPR/Cas9-опосредованного нокаута гена *Dmd* [16]. Данная модель воспроизводит мутацию, обнаруженную у пациента русского происхождения, и несет самую большую в делецию гена *Dmd* среди созданных ранее мышинных линий [17].

Для воспроизведения крупной делеции размером 430 кб, охватывающей экзоны 8-34 дистрофина, была использована инъекция двух гидовых РНК и мРНК Cas9 в одноклеточные эмбрионы мышей. Последовательность гидовых РНК была выбрана с помощью онлайн-ресурса СНОР-СНОР. Три пары гидовых РНК были протестированы *in vitro* на плаزمиде, содержащей целевой фрагмент гена *Dmd* и *ex vivo* на бластоцистах мышей [16]. Наиболее оптимальные последовательности были использованы для микроинъекций в оплодотворённые мышинные яйцеклетки. Генетически-модифицированные эмбрионы были пересажены мышам-реципиентам для получения первичных мутантов. Нуклеотидная последовательность границ делеции была определена путем прямого секвенирования продуктов ПЦР по Сэнгеру. Кроме того, предсказанные нецелевые сайты взаимодействия гидовых РНК были проверены на отсутствие модификаций с помощью рестрикционного анализа и Сэнгеровского секвенирования [16]. Самки мышей, несущие делецию экзонов 8-34 в гене *Dmd* (*Dmd*<sup>Del8-34</sup>), были использованы для размножения и формирования ядра линии.

*Тест «Приподнятый крестообразный лабиринт».* Для оценки уровня тревожности в точках 8, 10 и 12 недель от момента рождения мышей проводили тест «приподнятый крестообразный лабиринт». Интенсивность освещения светлых рукавов составляла 150 лк, темных рукавов – 30 лк. При оценке результатов теста рассчитывали отношение времени нахождения в светлом рукаве к общему времени нахождения в установке крестообразного лабиринта (5 минут) [18]. Поверхность установки обрабатывали антисептиком и дезодорировали дистиллированной водой

после каждого животного. Чтобы при начале тестирования первое животное попадало в эквивалентный с последующими феромоновый фон в тест было включено нулевое животное.

**Тест «Распознавание объектов».** Для оценки когнитивных функций в точках 8, 10 и 12 недель от момента рождения животных изучали в тесте «Распознавание объектов». Для этого мышей на 10 минут сажали в бокс 40×40 см, в котором располагались 2 одинаковых предмета. В течение сессии фиксировали время, проведенное в зоне ≤2 см от предмета, и при расположении животного краниальной стороной к нему, то есть время изучения объекта. Через час проводили повторную сессию, в которой один из предметов был заменен на новый. Анализируемым параметром являлось соотношение «время изучения нового предмета/общее время изучения старого и нового предметов» на протяжении второй сессии [19]. Животных, не проявлявших изучающего поведения, исключали из теста. Для снижения влияния феромонового фона предпринимали меры, описанные в предыдущем блоке.

**Тест «Ротарод».** Для оценки моторных функций и координации проводили тест «Ротарод». Перед началом тестирования проводили три тренировочные сессии. Непосредственно во время эксперимента, каждое животное было аккуратно помещено на стержень, вращающийся с начальной скоростью 2 оборота в минуту. Каждые 10 секунд скорость увеличивали на 0,5 оборота в минуту. Максимальная продолжительность сессии составляла 500 с. Для каждого животного фиксировали время падения со стержня. Каждому животному предоставлялось 3 попытки и при анализе результатов учитывали максимальный показатель. Если животное падало менее, чем через 5 секунд после установки на платформу, попытку не учитывали.

**Тест «Удержание груза».** Наконец, животных оценивали в тесте, предложенном для оценки силы в 2000 году Робертом Диконом. Тест основан на рефлексорной склонности мышей хвататься за окружающие предметы в момент, когда исследователь пытается приподнять их за хвост. Позволяя животным хвататься за груз с губчатым металлическим волокном на конце, проводили оценку максимальной массы, которую мышшь может полностью поднять и удерживать не менее 3 секунд. Всего было использовано 6 грузов, возрастающей массы от 15 до 75 г. За поднятие каждого груза мышшь получала баллы в зависимости от его массы. Тестирование прекращали на минимальном грузе, который мышшь не может удержать [20].

**Статистическая обработка.** Все количественные данные были проанализированы на нормальность распределения в тесте Шапиро-Уилка. Кроме того, попарно сравниваемые

группы были оценены на равенство дисперсий с применением теста Левена. В случае нормального распределения и равенства дисперсий сравниваемых групп был использован попарный t-тест Стьюдента с поправкой Бонферрони. В случае ненормального распределения или при неравенстве дисперсий был использован непараметрический U-тест Манна-Уитни с поправкой Бонферрони. Статистическую обработку и визуализацию данных проводили с использованием программ Microsoft Excel 2013 и GraphPad Prism 9.0.0.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ моторных функций продемонстрировал, что с 8 недели жизни мышши линии *Dmd<sup>Del8-34</sup>* демонстрируют снижение показателей в тестах «Ротарод» и «Удержание груза» (рис. 1 и 2). Несмотря на то, что статистическая достоверность обнаружена только на 12й неделе жизни в тесте «Удержание груза», общая тенденция к ухудшению показателей моторных функций прослеживается на всех этапах исследования, что подтверждает мышечную дисфункцию, вызванную мутацией *Dmd<sup>Del8-34</sup>*.

Поведенческое тестирование в тесте «Приподнятый крестообразный лабиринт» выявило снижение времени, проведенного в открытом рукаве и снижение количества свешиваний у мышшей *Dmd<sup>Del8-34</sup>*, достигающее статистически достоверной разницы в сравнении с контролем дикого типа на 12й неделе (рис. 3). Подобный результат может свидетельствовать о повышенном уровне тревожности в данной линии мышшей.

При оценке когнитивных функций в тесте «Распознавание объектов» было показано, что мышши *Dmd<sup>Del8-34</sup>* демонстрируют увеличение значения индекса дискриминации, что является признаком увеличения эффективности гиппокампальной памяти (рис. 4).

Тем не менее, при оценке общего времени, потраченного животными на изучение объектов, было обнаружено, что мутантные животные в целом проявляют меньшую исследовательскую активность (рис. 5). В этой связи, увеличение индекса дискриминации, скорее всего является погрешностью, вызванной снижением общего времени, проведенного при изучении как нового, так и знакомого объектов. При этом пропорциональное снижение обоих параметров ведет к искажению значений их математического соотношения.

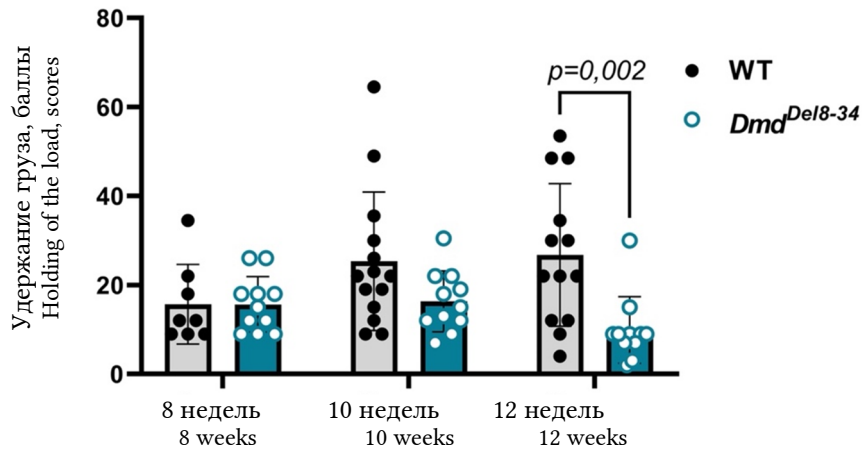


Рис. 1. Результаты теста «Удержание груза».

Fig. 1. Results of the Load Hold test.

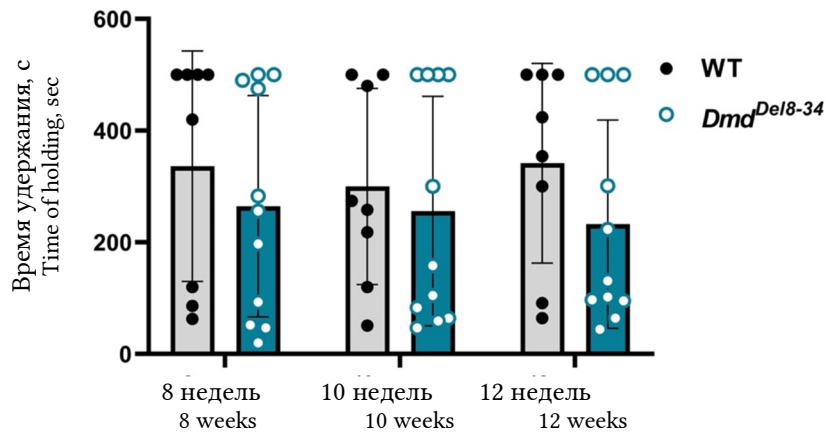


Рис. 2. Результаты теста «Ротарод».

Fig. 2. Results of the Rotarod test.

Таким образом, представляется затруднительным дать однозначную оценку когнитивных способностей животных с мутацией *Dmd*<sup>Del8-34</sup> по результатам теста «Распознавание объектов», в связи с тем, что мутантные мыши склонны к снижению общей исследовательской активности.

Дистрофин является крупным белком (427 кДа), связывающим цитоскелетные актиновые нити с белками мембраны. В составе сложного надмолекулярного комплекса дистрофин стабилизирует плазматическую мембрану поперечнополосатых мышечных клеток и участвует в ряде важнейших клеточных процессов, таких как деление и дифференцировка [21].

Ген *Dmd* является самым большим геном в человеческом геноме, включающим 79 экзонов и охватывающим >2200 кб [22]. Помимо мышечной ткани, *Dmd* также экспрессируется в сетчатке, почках и центральной нервной системе (ЦНС) [23]. Таким образом, неврологиче-

ские симптомы могут являться закономерным следствием мутаций дистрофина, которые значительно снижают экспрессию или функциональную активность белка. Действительно, в своих классических работах Дюшенн де Булонь уже описал когнитивную дисфункцию у мальчиков с миодистрофией Дюшенна [24]. Известно, что у трети (34,8%) пациентов общий интеллект ниже среднего значения нормальной популяции [25]. Кроме того, при миодистрофии Дюшенна чаще присутствуют такие неврологические аномалии как синдром дефицита внимания и гиперактивности (СДВГ), обсессивно-компульсивное расстройство (ОКР), расстройство аутистического спектра, проблемы с чтением [25-28], а также эпилепсия [29-32].

Интересно, что неврологический дефицит при мутациях в гене *Dmd* может не сопровождаться мышечными симптомами [33]. Подобное наблюдение может быть объяснено различиями

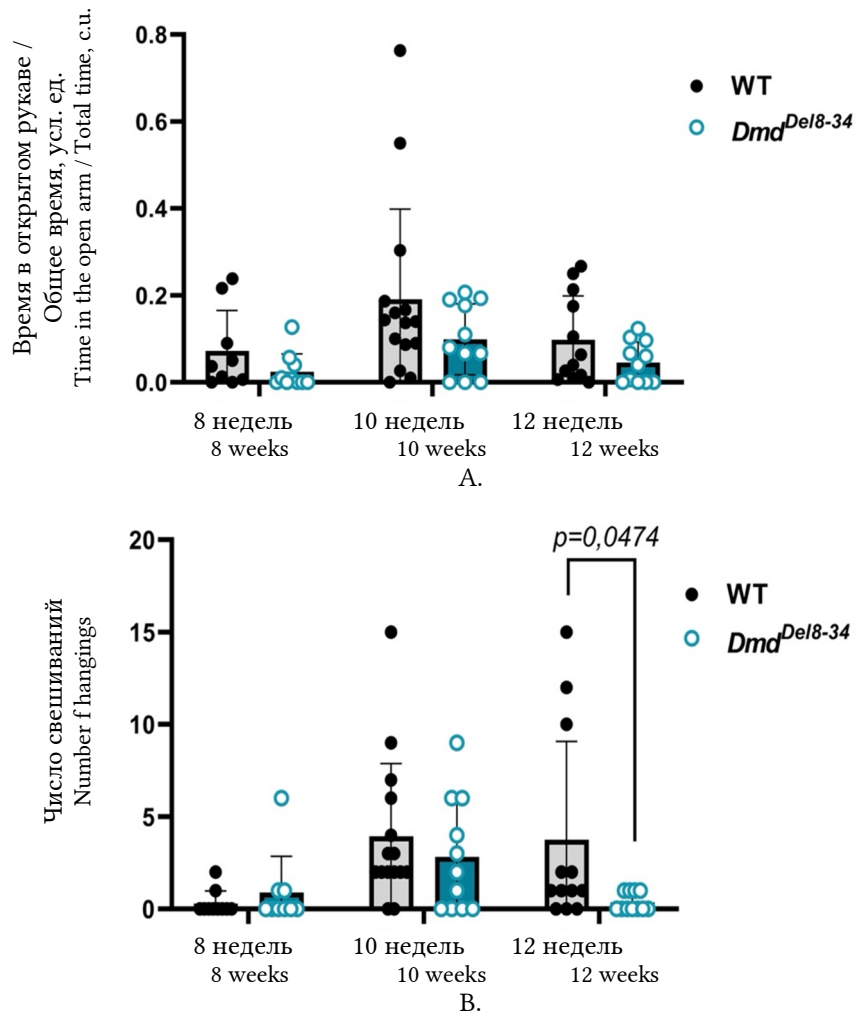


Рис. 3. Поведенческие параметры в тесте «Приподнятый крестообразный лабиринт»: А – Результаты оценки времени, проведенного в открытом рукаве приподнятого крестообразного лабиринта; В – Результаты оценки количества свешиваний при тестировании в приподнятом крестообразном лабиринте.

Fig.3. Behavioral parameters in the Elevated Plus Maze test: A - Results of evaluating the time spent in the open arm of the elevated plus maze; B - The results of assessing the number of overhangs during testing in an elevated plus maze.

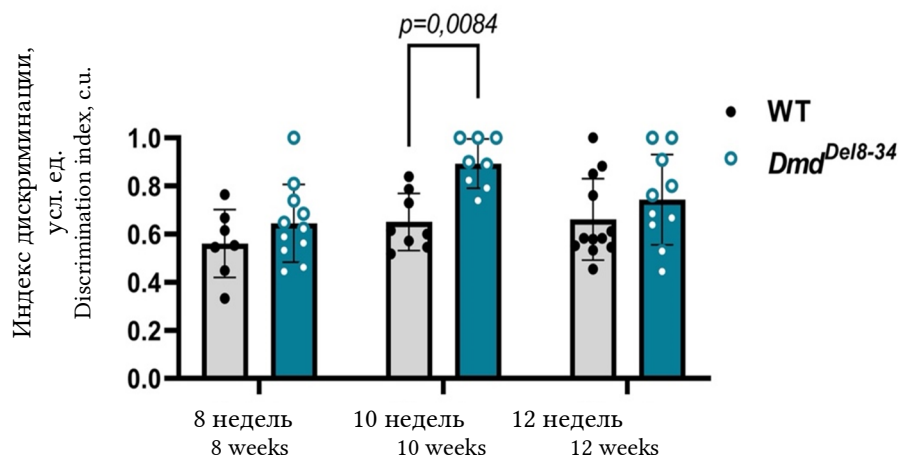


Рис. 4. Результаты определения индекса дискриминации в тесте «Распознавание объектов».

Fig. 4. The results of determining the discrimination index in the "Object Recognition" test.

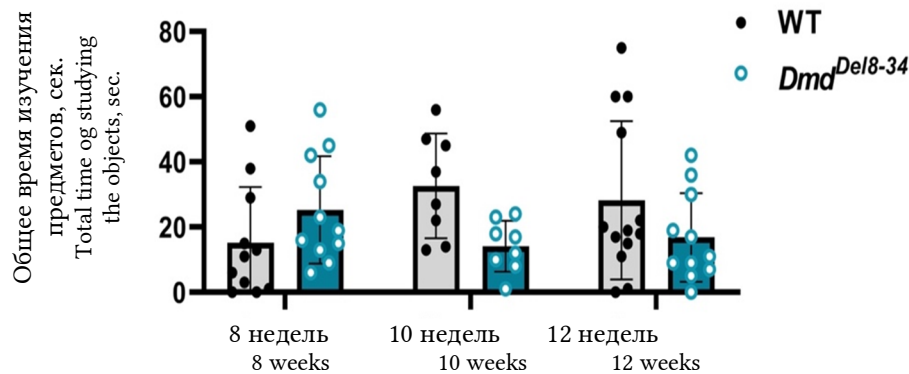


Рис. 5. Общее время изучения предметов в тесте «распознавание объектов».

Fig. 5. The total time of studying objects in the "object recognition" test.

в профиле изоформ, экспрессирующихся в нервной и мышечной тканях.

В мозге дистрофин в основном находится в гиппокампе, префронтальной коре и мозжечке [34, 35]. Разные сплайс-варианты дистрофина обнаруживаются в нейронах, глии, или сосудистых клетках [36-38]. Полноразмерный дистрофин расположен исключительно в постсинапсе нейронов и встречается в клетках гиппокампа, пирамидальных клетках коры и клетках Пуркинье [39-41]. Локализация полноразмерной формы предполагает ее участие в процессах синаптической передачи. Ряд данных также указывает на важный вклад дистрофина в кластеризацию ГАМК-рецепторов [42-46].

Наши данные, полученные на мышах с очень крупной делецией гена *Dmd* указывают на наличие поведенческих аномалий, которые выражаются в увеличении тревожности и снижении исследовательской активности. Интересно, что это совпадает с наблюдениями, полученными на пациентах с миодистрофией Дюшенна, которые характеризуются повышенным риском развития расстройств аутистического спектра и ОКР. Результаты использованного в данном исследовании теста «Распознавание объектов» не позволяют однозначно судить о наличии и степени когнитивной дисфункции у мышей *Dmd*<sup>Del8-34</sup>, ввиду того что мыши проявляли низкий интерес как к новому, так и к старому объектам. Тем не менее, дальнейшие исследования, направленные на оценку когнитивных функций, могут помочь оценить влияние делеции экзонов 8-34 на функции гиппокампа и корковых структур, связанных с памятью.

Симптомы нарушений со стороны высшей нервной деятельности являются характерной, но не обязательной частью клинической картины *Dmd*-ассоциированных миодистрофий. Проведенное исследование позволило выявить некоторые поведенческие аномалии у генетически-

модифицированных мышей, несущих крупную делецию гена дистрофина, аналогичную обнаруженной у пациента с миодистрофией Дюшенна. Полученные результаты могут быть полезны для понимания роли дистрофина в головном мозге, а также для расширения сведений о немышечных симптомах миодистрофии Дюшенна и миодистрофии Беккера.

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

#### ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена в рамках гранта (соглашение с Минобрнауки России №075-15-2022 от 06.05.2022) по реализации Программы стратегического академического лидерства «Приоритет-2030», Стратегического проекта «Наука XXI века», кластера проектов «Развитие генетических технологий», в интересах реализации программы консорциума «Генетические технологии для биомедицины, сельского хозяйства и промышленной микробиологии», подраздел «Молодые лидеры в науке».

#### СООТВЕТСТВИЕ ПРИНЦИПАМ ЭТИКИ

Работы по получению и размножению генетически-модифицированной линии животных *Dmd*<sup>Del8-34</sup> были выполнены в Центре коллективного пользования Института биологии гена РАН (протокол заседания локального этического комитета 18-12/2018). Затем для фенотипической характеристики линии, 13 мутантов и 12 контрольных самцов мышей дикого типа были переведены в виварий НИИ фармакологии живых систем НИУ БелГУ (протокол заседания локального этического комитета 01-05/20а). После дислокации животных содержали в карантинном режиме в течение 14 дней. На всех этапах исследования животные содержались в условиях контролируемого освещения 12/12 часов при температуре 21-23°C и влажности 40-60%. Очищенная вода и про- автоклавированный корм были представлены в сво-

бодном доступе. Поведенческие тесты выполняли в вечернее время с 17:00 по 20:00.

Все манипуляции с животными проводили квалифицированные сотрудники в соответствии с требованиями Положения о лабораторной практике в РФ 2003 г. и Директивы 2010/63/EU Европейского парламента и Европейского союза по охране животных, используемых в научных целях, а также руководства ARRIVE. В карантинный период, а также на протяжении исследования животных ежедневно осматривал штатный ветеринарный врач НИИ фармакологии живых систем.

#### ЛИЧНЫЙ ВКЛАД АВТОРОВ

Солдатов В.О. – создание идеи, планирование исследования, проведение исследования, статистическая обработка, написание статьи; Карагодина А.Ю. – подготовка экспериментальных животных, написание статьи; Патраханов Е.А. – проведение исследования, статистическая обработка; Покровский В.М. – наблюдение и уход за животными, хендлинг животных; Пученкова О.А. – статистическая обработка, разработка дизайна исследования; Белашова А.В. – формализация списка литературы, проведение поведенческих тестов; Егорова Т.В. – подготовка и генотипирование экспериментальных животных, проведение анализа; Поликарпова А.В. – подготовка и генотипирование экспериментальных животных, проведение анализа; Дейкин А.В. – консультация по вопросам проведения отдельных этапов экспериментальных работ, обеспечение качества. Покровский М.В. – планирование исследования, консультация по вопросам проведения отдельных этапов экспериментальных работ, обеспечение качества.

#### ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Terry E.E., Zhang X., Hoffmann C., Hughes L.D., Lewis S.A., Li J., Wallace M.J., Riley L.A., et al. Transcriptional profiling reveals extraordinary diversity among skeletal muscle tissues. *Elife*. 2018;7:e34613. DOI: 10.7554/eLife.34613.
2. Frontera W.R., Ochala J. Skeletal muscle: a brief review of structure and function. *Calcif Tissue Int*. 2015;96(3):183–195. DOI: 10.1007/s00223-014-9915-y.
3. Colson B.A., Gruber S.J., Thomas D.D. Structural dynamics of muscle protein phosphorylation. *J Muscle Res Cell Motil*. 2012;33(6):419–429. DOI: 10.1007/s10974-012-9317-6.
4. Gao Q.Q., McNally E.M. The Dystrophin Complex: Structure, Function, and Implications for Therapy. *Compr Physiol*. 2015;5(3):1223–1239. DOI: 10.1002/cphy.c140048.
5. Duan D., Goemans N., Takeda S., Mercuri E., Aartsma-Rus A. Duchenne muscular dystrophy. *Nat Rev Dis Primers*. 2021;7(1):13. DOI: 10.1038/s41572-021-00248-3.
6. Dumont N.A., Wang Y.X., von Maltzahn J., Pasut A., Bentzinger C.F., Brun C.E., Rudnicki M.A. Dystrophin expression in muscle stem cells regulates their polarity and asymmetric division. *Nat Med*. 2015;21(12):1455–1463. DOI: 10.1038/nm.3990.
7. Chang N.C., Chevalier F.P., Rudnicki M.A. Satellite Cells in Muscular Dystrophy — Lost in Polarity. *Trends Mol Med*. 2016;22:479–496. DOI: 10.1016/j.molmed.2016.04.002.
8. Dumont N.A., Wang Y.X., von Maltzahn J., Pasut A., Bentzinger C.F., Brun C.E., Rudnicki M.A. Dystrophin expression in muscle stem cells regulates their polarity and asymmetric division. *Nat Med*. 2015;21:1455–1463. DOI: 10.1038/nm.3990.
9. Muntoni F., Torelli S., Ferlini A. Dystrophin and mutations: one gene, several proteins, multiple phenotypes. *Lancet Neurol*. 2003;2(12):731–740. DOI: 10.1016/s1474-4422(03)00585-4.
10. Rae M.G., O'Malley D. Cognitive dysfunction in Duchenne muscular dystrophy: a possible role for neuromodulatory immune molecules. *J Neurophysiol*. 2016;116(3):1304–1315. DOI: 10.1152/jn.00248.2016.
11. Ferrero A., Rossi M. Cognitive profile and neuropsychiatric disorders in Becker muscular dystrophy: A systematic review of literature. *Neurosci Biobehav Rev*. 2022;137:104648. DOI: 10.1016/j.neubiorev.2022.104648.
12. Lidov H.G. Dystrophin in the nervous system. *Brain Pathol*. 1996;6(1):63–77. DOI: 10.1111/j.1750-3639.1996.tb00783.x.
13. Muntoni F., Torelli S., Ferlini A. Dystrophin and mutations: one gene, several proteins, multiple phenotypes. *Lancet Neurol*. 2003;2:731–740. DOI: 10.1016/s1474-4422(03)00585-4.
14. Anderson J.L., Head S.I., Morley J.W. Duchenne muscular dystrophy and brain function M. Hedge, A. Ankala (Eds.), Muscular Dystrophy. *Intech*. 2012: 91–122. DOI: 10.5772/24928.
15. Gorecki D.C., Barnard E.A. Specific expression of G-dystrophin (Dp71) in the brain. *NeuroReport*. 1995;6:893–896. DOI: 10.1097/00001756-199504190-00017.
16. Egorova T.V., Zotova E.D., Reshetov D.A., Polikarpova A.V., Vassilieva S.G., Vlodavets D.V., Gavrilov A.A., Ulianov S.V., et al. CRISPR/Cas9-generated mouse model of Duchenne muscular dystrophy recapitulating a newly identified large 430 kb deletion in the human DMD gene. *Dis Model Mech*. 2019;12(4):dmm037655. DOI: 10.1242/dmm.037655.
17. Lim K.R.Q., Nguyen Q., Dzierlega K., Huang Y., Yokota T. CRISPR-Generated Animal Models of Duchenne Muscular Dystrophy. *Genes (Basel)*. 2020;11(3):342. DOI: 10.3390/genes11030342.
18. Gonzalez L.E., File S.E. A five minute experience in the elevated plus-maze alters the state of the benzodiazepine receptor in the dorsal raphe nucleus. *J Neurosci*. 1997;17(4):1505–1511. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.17-04-01505.1997.
19. Leger M., Quiedeville A., Bouet V., Haelewyn B., Boulouard M., Schumann-Bard P., Freret T. Object recognition test in mice. *Nat Protoc*. 2013;8(12):2531–2537. DOI: 10.1038/nprot.2013.155.
20. Deacon R.M. Measuring the strength of mice. *J Vis Exp*. 2013;(76):2610. DOI: 10.3791/2610.
21. Gao Q.Q., McNally E.M. The Dystrophin Complex: Structure, Function, and Implications for Therapy. *Compr Physiol*. 2015;5(3):1223–1239. DOI: 10.1002/cphy.c140048.

22. Koenig M., Hoffman E.P., Bertelson C.J., Monaco A.P., Feener C., Kunkel L.M. Complete cloning of the Duchenne muscular dystrophy (DMD) cDNA and preliminary genomic organization of the DMD gene in normal and affected individuals. *Cell*. 1987;50:509–517. DOI: 10.1016/0092-8674(87)90504-6.
23. Ahn A.H., Kunkel L.M. The structural and functional diversity of dystrophin. *Nat Genet.* 1993;3:283–291. DOI: 10.1038/ng0493-283.
24. Duchenne G.B.A. Reserches sur la paralysie musculaire pseudeohypertrofique, ou paralysie myosclerosique. *Arch Gen Med.* 1868;11:5–25, 179–209, 305–121, 421–143, 552–188
25. Cotton S., Voudouris N.J., Greenwood K.M. Intelligence and Duchenne muscular dystrophy: full-scale, verbal, and performance intelligence quotients. *Dev Med Child Neurol.* 2001;43:497–501. DOI: 10.1017/s0012162201000913.
26. Hendriksen J.G., Vles J.S. Are males with Duchenne muscular dystrophy at risk for reading disabilities? *Pediatr Neurol.* 2006;34:296–300. DOI: 10.1016/j.pediatrneurol.2005.08.029.
27. Hendriksen J.G., Vles J.S. Neuropsychiatric disorders in males with Duchenne muscular dystrophy: frequency rate of attention-deficit hyperactivity disorder (ADHD), autism spectrum disorder, and obsessive-compulsive disorder. *J Child Neurol.* 2008;23:477–481. DOI: 10.1177/0883073807309775.
28. Snow W.M., Anderson J.E., Jakobson L.S. Neuropsychological and neurobehavioral functioning in Duchenne muscular dystrophy: a review. *Neurosci Biobehav Rev.* 2013;37:743–752. DOI: 10.1016/j.neubiorev.2013.03.016.
29. Etemadifar M., Molaei S. Epilepsy in boys with Duchenne muscular dystrophy. *J Res Med Sci.* 2004;3:116–119.
30. Goodwin F., Muntoni F., Dubowitz V. Epilepsy in Duchenne and Becker muscular dystrophies. *Eur J Paediatr Neurol: Off J Eur Paediatr Neurol Soc.* 1997;1:115–119. DOI: 10.1016/s1090-3798(97)80042-6
31. Pane M., Messina S., Bruno C., D'Amico A., Villanova M., Brancalion B., Sivo S., Bianco F., et al. Duchenne muscular dystrophy and epilepsy. *Neuromuscul Disord.* 2013;23(4):313–315. DOI: 10.1016/j.nmd.2013.01.011.
32. Lee A.J., Buckingham E.T., Kauer A.J., Mathews K.D. Descriptive Phenotype of Obsessive Compulsive Symptoms in Males With Duchenne Muscular Dystrophy. *J Child Neurol.* 2018;33(9):572–579. DOI: 10.1177/0883073818774439.
33. de Brouwer A.P., Nabuurs S.B., Verhaart I.E., Oudakker A.R., Hordijk R., Yntema H.G., Hordijk-Hos J.M., Voesenek K., et al. A 3-base pair deletion, c.9711\_9713del, in DMD results in intellectual disability without muscular dystrophy. *Eur J Hum Genet.* 2014;22(4):480–485. DOI: 10.1038/ejhg.2013.169.
34. Chamberlain J.S., Pearlman J.A., Muzny D.M., Gibbs R.A., Ranier J.E., Caskey C.T., Reeves A.A. Expression of the murine Duchenne muscular dystrophy gene in muscle and brain. *Science.* 1988;239(4846):1416–1418. DOI: 10.1126/science.3347839.
35. Lidov H.G., Byers T.J., Kunkel L.M. The distribution of dystrophin in the murine central nervous system: an immunocytochemical study. *Neuroscience.* 1993;54:167–187. DOI: 10.1016/0306-4522(93)90392-s.
36. Blake D.J., Kröger S. The neurobiology of Duchenne muscular dystrophy: learning lessons from muscle? *Trends Neurosci.* 2000;23:92–99. DOI: 10.1016/s0166-2236(99)01510-6.
37. Graciotti L., Minelli A., Minciacchi D., Procopio A., Fulgenzi G. GABAergic miniature spontaneous activity is increased in the CA1 hippocampal region of dystrophic mdx mice *Neuromuscul Disord.* 2008;18:220–226. DOI: 10.1016/j.nmd.2007.11.009.
38. Lidov H.G., Selig S., Kunkel L.M. Dp140: a novel 140 kDa CNS transcript from the dystrophin locus. *Hum Mol Genet.* 1995;4:329–335. DOI: 10.1093/hmg/4.3.329.
39. Anderson J.L., Head S.I., Rae C., Morley J.W. Brain function in Duchenne muscular dystrophy. *Brain.* 2002;125:4–13. DOI: 10.1093/brain/awf012.
40. Cyrulnik S.E., Hinton V.J. Duchenne muscular dystrophy: a cerebellar disorder? *Neurosci Biobehav Rev.* 2008;32:486–496. DOI: 10.1016/j.neubiorev.2007.09.001.
41. Lidov H.G. Dystrophin in the nervous system. *Brain Pathol.* 1996;6:63–77. DOI: 10.1111/j.1750-3639.1996.tb00783.x.
42. Brünig I., Suter A., Knuesel I., Lüscher B., Fritschy J.M. GABAergic terminals are required for postsynaptic clustering of dystrophin but not of GABA(A) receptors and gephyrin. *J Neurosci: Off J Soc Neurosci.* 2002;22:4805–4813. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.22-12-04805.2002.
43. Kueh S.L., Head S.I., Morley J.W. GABA(A) receptor expression and inhibitory post-synaptic currents in cerebellar Purkinje cells in dystrophin-deficient mdx mice. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2008;35:207–210. DOI: 10.1111/j.1440-1681.2007.04816.x.
44. Vaillend C., Billard J.M. Facilitated CA1 hippocampal synaptic plasticity in dystrophin-deficient mice: role for GABAA receptors? *Hippocampus.* 2002;12: 713–717. DOI: 10.1002/hipo.10068.
45. Craig A.M., Kang Y. Neurexin-neuroligin signaling in synapse development. *Curr Opin Neurobiol.* 2007;17:43–52. DOI: 10.1016/j.conb.2007.01.011.
46. Albrecht D.E., Froehner S.C. Syntrophins and dystrobrevins: defining the dystrophin scaffold at synapses. *Neurosignals.* 2002;11:123–129. DOI: 10.1159/000065053.

Поступила в редакцию 29.10.2022

Подписана в печать 23.12.2022

---

**Для цитирования:** Солдатов В.О., Карагодина А.Ю., Патраханов Е.А., Покровский В.М., Пученкова О.А., Белашова А.В., Егорова Т.В., Поликарпова А.В., и др. Поведенческие аномалии в генетической модели миодистрофии Дюшенна у мышей. *Человек и его здоровье.* 2022;25(4):63–72. DOI: 10.21626/vestnik/2022-4/08. EDN: LUMSQM.

---

## BEHAVIORAL ABNORMALITIES IN A GENETIC MODEL OF DUCHENNE MYODYSTROPHY IN MICE

© Soldatov V.O.<sup>1</sup>, Karagodina A.Yu.<sup>1</sup>, Patrakhanov E.A.<sup>1</sup>, Pokrovsky V.M.<sup>1</sup>, Puchenkova O.A.<sup>1</sup>, Belashova A.V.<sup>1</sup>, Egorova T.V.<sup>2</sup>, Polikarpova A.V.<sup>2</sup>, Deikin A.V.<sup>1</sup>, Pokrovsky M.V.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Belgorod State National Research University (NRU BelGU)

85, Podedby Str., Belgorod, Belgorod region, 308015, Russian Federation

<sup>2</sup> Institute of Gene Biology of Russian Academy of Sciences (IGB RAS)

2, Polevaya St., Perm, Perm Krai, 614990, Russian Federation

Mutations in the *Dmd* gene encoding the membrane protein dystrophin are associated with the development of severe X-linked muscle diseases Duchenne and Becker myodystrophy. At the same time, along with the classic symptoms of striated muscles, dystrophin mutations can lead to a decrease in cognitive functions and behavioral abnormalities.

**Objective:** conducting a pilot analysis of behavioral and cognitive characteristics in mice with a genetic defect that reproduces the phenotype of Duchenne myodystrophy.

**Materials and methods.** To assess the features of motor functions and behavior, *Dmd*<sup>Del8-34</sup> (n=13) and control animals of the wild type (n=12) were subjected to research in the tests "Load retention", "Rotarod", "Elevated plus maze" and "Object recognition".

**Results.** It was found that mice carrying the *Dmd*<sup>Del8-34</sup> mutation are characterized by a decrease in motor functions, show signs of anxiety, and also show low exploratory activity. The detected features of the cognitive and emotional status are consistent with clinical observations indicating an increased risk of developing autism spectrum disorders and obsessive-compulsive disorder in patients with *Dmd* gene mutations. Thus, it was proved that from the 8<sup>th</sup> week of life, mice of the *Dmd*<sup>Del8-34</sup> line show a decrease in performance in the Rotarod and Load Retention tests. Behavioral testing in the Elevated Plus Maze test revealed a decrease in time reaching a statistically significant difference compared to the wild-type control at week 12, and when assessing cognitive functions in the Object Recognition test, it was shown that *Dmd*<sup>Del8-34</sup> mice show an increase in the discrimination index value, which is a sign of increased efficiency of hippocampal memory.

**Conclusion.** The study made it possible to identify some behavioral anomalies in genetically modified mice carrying a large deletion of exons 8-34 of the *Dmd* gene encoding dystrophin.

**Keywords:** transgenesis; Duchenne myodystrophy; behavioral tests; motor disorders.

**Soldatov Vladislav O.** – Cand. Sci. (Med.), Researcher at the Laboratory of Genomic Editing in Biomedicine and Veterinary Medicine, NRU BelGU, Belgorod, Russian Federation. ORCID iD: 0000-0001-9706-0699. E-mail: [pharmsoldatov@gmail.com](mailto:pharmsoldatov@gmail.com) (corresponding author)

**Karagodina Anastasia Yu.** – junior researcher at the Research Institute of Pharmacology of Living Systems, NRU BelGU, Belgorod, Russian Federation. ORCID iD: 0000-0001-9440-5866. E-mail: [anastasiavolmedic@gmail.com](mailto:anastasiavolmedic@gmail.com)

**Patrakhanov Evgeny A.** – junior researcher of the Research Institute of Pharmacology of Living Systems, NRU BelGU, Belgorod, Russian Federation. ORCID iD: 0000-0002-8415-4562. E-mail: [pateval7@gmail.com](mailto:pateval7@gmail.com)

**Pokrovsky Vladimir M.** – junior researcher of the Research Institute of Pharmacology of Living Systems, NRU BelGU, Belgorod, Russian Federation. ORCID iD: 0000-0003-3138-2075. E-mail: [vmpokrovsky@yandex.ru](mailto:vmpokrovsky@yandex.ru)

**Puchenkova Olesya A.** – junior researcher, Research Institute of Pharmacology of Living Systems, NRU BelGU, Belgorod, Russian Federation. ORCID iD: 0000-0002-7657-0937. E-mail: [lesya759@yandex.ru](mailto:lesya759@yandex.ru)

**Belashova Anastasia V.** – student, NRU BelGU, Belgorod, Russian Federation. ORCID iD: 0000-0001-9737-6378. E-mail: [belashova\\_av@mail.ru](mailto:belashova_av@mail.ru)

**Egorova Tatyana V.** – researcher at the Laboratory for Modeling and Therapy of Hereditary Diseases, IGB RAS, Moscow, Russian Federation. ORCID iD: 0000-0002-3346-3242. E-mail: [egorovatv@genebiology.ru](mailto:egorovatv@genebiology.ru)

**Polikarpova Anna V.** – Cand. Sci. (Biol.), Researcher at the Laboratory for Modeling and Therapy of Hereditary Diseases, IGB RAS, Moscow, Russian Federation. ORCID iD: 0000-0001-9442-8371. E-mail: [a.polikarpova.marlin@gmail.com](mailto:a.polikarpova.marlin@gmail.com)

**Deikin Aleksey V.** – Cand. Sci. (Biol.), Associate Professor, Director of the United Center for Genetic Technologies, NRU BelGU, Belgorod, Russian Federation. ORCID iD: 0000-0001-9960-0863 e-mail: [deykin@bsu.edu.ru](mailto:deykin@bsu.edu.ru)

**Pokrovsky Mikhail V.** – Dr. Sci. (Biol.), Professor of the Department of Pharmacology and Clinical Pharmacology, Head of the Research Institute of Pharmacology of Living Systems, NRU BelGU, Belgorod, Russian Federation. ORCID iD: 0000-0002-2761-6249. E-mail: [mpokrovsky@yandex.ru](mailto:mpokrovsky@yandex.ru)

### CONFLICT OF INTEREST

The authors declare the absence of obvious and potential conflicts of interest related to the publication of this article.

### SOURCE OF FINANCING

The work was carried out within the framework of a grant (agreement with the Ministry of Education and Science of Russia No. 075-15-2022 dated 05/06/2022) for the implementation of the Strategic Academic Leadership Program Priority-2030, the Strategic Project "Science of the 21st Century", the cluster of projects "Development of Genetic Technologies", in the interests of implementing program of the consortium "Genetic technologies for biomedicine, agriculture and industrial microbiology", subsection "Young leaders in science".

## CONFORMITY WITH THE PRINCIPLES OF ETHICS

Work on obtaining and propagating the genetically modified animal line *Dmd<sup>Del8-34</sup>*<sup>34</sup> was carried out at the Center for Collective Use of the Institute of Gene Biology of the Russian Academy of Sciences (minutes of the meeting of the local ethical committee 18-12/2018). Then, for the phenotypic characterization of the line, 13 mutants and 12 control male wild-type mice were transferred to the vivarium of the Research Institute of Pharmacology of Living Systems, National Research University BelSU (minutes of the meeting of the local ethical committee 01-05/20a). After deployment, the animals were kept in quarantine for 14 days. At all stages of the study, the animals were kept under controlled lighting for 12/12 hours at a temperature of 21-23°C and a humidity of 40-60%. Purified water and autoclaved food were freely available. Behavioral tests were performed in the evening from 17:00 to 20:00.

All manipulations with animals were performed by qualified personnel in accordance with the requirements of the Regulations on laboratory practice in the Russian Federation of 2003 and Directive 2010/63/EU of the European Parliament and the European Union on the protection of animals used for scientific purposes, as well as the ARRIVE guidelines. During the quarantine period, as well as during the study, the animals were examined daily by the staff veterinarian of the Scientific Research Institute of Pharmacology of Living Systems.

## AUTHORS CONTRIBUTION

Soldatov V.O. – creating the idea, planning the study, conducting the study, statistical processing, writing the article; Karagodina A.Y. – preparation of experimental animals, writing the article; Patrakhanov E.A. – conducting research, statistical processing; Pokrovsky V.M. – observation and care of animals, handling of animals; Puchenkova O.A. – statistical processing, research design development; Belashova A.V. – formalization of the list of references, conduction of behavioral tests; Egorova T.V. – preparation and genotyping of experimental animals, analysis; Polikarpova A.V. – preparation and genotyping of experimental animals, analysis; Deikin A.V. – consultation on the conduct of individual stages of experimental work, quality assurance. Pokrovsky M.V. – research planning, consultation on the implementation of individual stages of experimental work, quality assurance.

Received 29.10.2022

Accepted 23.12.2022

---

**For citation:** Soldatov V.O., Karagodina A.Yu., Patrakhanov E.A., Pokrovsky V.M., Puchenkova O.A., Belashova A.V., Egorova T.V., Polikarpova A.V., et al. Behavioral abnormalities in a genetic model of Duchenne myodystrophy in mice. *Humans and their health*. 2022;25(4):63–72. DOI: 10.21626/vestnik/2022-4/08. EDN: LUMSQM

---