

На правах рукописи

Шуваев Антон Николаевич

**КЛЕТОЧНЫЕ И МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ
РАЗВИТИЯ ПОЛИГЛУТАМИНОВЫХ АТАКСИЙ И
ПАТОГЕНЕТИЧЕСКИЕ ПРИНЦИПЫ ИХ КОРРЕКЦИИ**

3.3.3. – патологическая физиология

1.5.22. – клеточная биология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
доктора медицинских наук

Красноярск

2023

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научные консультанты:

1. Салмина Алла Борисовна – доктор медицинских наук, профессор, заведующий отделом молекулярных и клеточных механизмов нейропластичности Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научный центр неврологии», г. Москва.

2. Каспаров Сергей Ашотович - доктор медицинских наук, профессор, заведующий лабораторией физиологии, фармакологии и нейронаук Университета г. Бристоль (Великобритания).

Официальные оппоненты:

1. Никитин Сергей Сергеевич – доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой генетики неврологических болезней Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Медико-генетический научный центр имени академика Н.П. Бочкова».

2. Зайцев Алексей Васильевич - доктор биологических наук, научный сотрудник, руководитель лаборатории молекулярных механизмов нейронных взаимодействий Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова» Российской академии наук.

3. Мухина Ирина Васильевна – доктор биологических наук, профессор, заведующая кафедрой нормальной физиологии им. Н.Ю. Беленкова института фундаментальной медицины федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Приволжский исследовательский медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт нейронаук и медицины», г. Новосибирск

Защита состоится: «___» _____ 2024 года в ___ часов на заседании диссертационного совета 24.1.158.01 на базе Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Институт экспериментальной медицины» по адресу 197022, Санкт-Петербург, Каменноостровский пр., д. 71. С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Институт экспериментальной медицины» по адресу: 197022, Санкт-Петербург, ул. Академика Павлова, д. 12, и на сайте: <https://iemsfb.ru/science/diss/diss001-022-02/>

Автореферат разослан «___» _____ 2024г.

Ученый секретарь диссертационного совета
доктор биологических наук

Алешина Галина Матвеевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования.

Полиглутаминовые спиноцеребеллярные атаксии образуют одну из наиболее часто встречающихся групп наследственных нейродегенеративных заболеваний мозжечка. Среди них, спиноцеребеллярная атаксия 1 типа (СЦА1) доминирует в славянской популяции (1; 2). Более того, в России регистрируется резкое увеличение заболеваемости СЦА1 у коренного населения Якутии. Это самый большой очаг заболеваемости СЦА1 в мире (3). На сегодняшний момент патогенетической терапии полиглутаминовых спиноцеребеллярных атаксий не разработано, заболевание неуклонно прогрессирует и заканчивается смертью от поражения зон ствола мозга, отвечающих за витальные функции. Отсутствие патогенетической терапии при полиглутаминовых спиноцеребеллярных атаксиях требует изучения данных состояний и делает эту проблему актуальной.

Полиглутаминовые спиноцеребеллярные атаксии характеризуется чрезмерным удлинением CAG тринуклеотидных повторов соответствующих генов (4). Такая мутация приводит к появлению патологических белков с удлинённой полиглутаминовой цепочкой, их неправильной конформации, и приобретению ими токсических свойств, что вызывает гибель клеток мозга (5). Изначально считалось, что мутация в различных генах при разных полиглутаминовых спиноцеребеллярных атаксиях должна приводить к разным нарушениям функций мутантных белков и различным проявлениям заболевания. Однако клинически наблюдается большая схожесть проявлений при всех полиглутаминовых атаксиях, лишь с некоторыми индивидуальными особенностями (6), что может указывать на схожие патогенетические процессы, а значит и схожие подходы к их коррекции. Однако изменение молекулярных каскадов, приводящих к морфологическим и функциональным нарушениям структур мозжечка при полиглутаминовых спиноцеребеллярных атаксиях, слабо изучены, общие принципы развития патологии не показаны.

Поэтому в данной работе было уделено внимание общим патогенетическим аспектам, возникающим при развитии полиглутаминовых атаксий. Известно, что наиболее рано и выражено вовлекается в патологический процесс клетки Пуркинье. Их гибель, тесным образом связана с негативными эффектами мутантных полиглутаминовых белков. Так, атаксин 1 образует с другими белками комплекс, взаимодействующий с ядерным рецептором регуляции транскрипции, ROR α (7). Его мутантная форма с удлинённой полиглутаминовой цепочкой не имеет возможности образовывать комплексы с ROR α , что приводит к деградации данного рецептора и нарушению транскрипции десятков различных генов, отвечающих за метаболизм, рост и развитие клеток, а также элиминацию синапсов (8). Вероятно этот механизм лежит в основе нарушения развития клеток Пуркинье и при других полиглутаминовых спиноцеребеллярных атаксиях, но такие исследования не проводились.

Ранее было показано на нокаутных животных, что выше описанные витальные функции в клетках Пуркинье критически зависят от наличия и активации метаботропного глутаматного рецептора 1 типа, mGluR1 (9). Также данный рецептор был замечен в развитии кратко- и долговременной синаптической пластичности в синапсах клеток Пуркинье с параллельными и лиановидными

волокон (9). Однако роль mGluR1 в патогенезе спиноцеребеллярных атаксий и, в частности СЦА1, ранее не была изучена. Поэтому выявление эффектов мутантных полиглутаминовых белков на функцию ROR α и связанных с ним экспрессируемых белков, таких как mGluR1, представляет особый интерес.

Поэтому наиболее перспективными подходами к коррекции mGluR1-опосредованного пути передачи сигналов в клетках Пуркинье при полиглутаминовых спиноцеребеллярных атаксиях является усиление выведения мутантных нерастворимых белков с помощью убиквитин-протеасомной системы (10) и активация комплекс-образующих с mGluR1 метаболитных рецепторов, таких как ГАМК β рецепторы. Данной задачи можно достичь при помощи таргетной доставки рекомбинантного гена, а также имеющихся на рынке фармакологических препаратов – активаторов ГАМК β рецептором, таких как баклофен.

Высокий интерес представляет также трансплантация стволовых клеток в область нейродегенерации. Попадая в организм реципиента, стволовые клетки выделяют ряд биологически активных веществ таких, как факторы роста (BDNF, NT-3 or GDNF) и т.д. и могут способствовать поддержанию нормальной морфологии и функции нейронов (11). Из большого ряда стволовых клеток, мезенхимальные стволовые клетки (МСК) представляются наиболее перспективными, так как уже используются в экспериментах на моделях нейродегенерации в силу их высокой потенциальной пользы в лечении данных состояний, а также низкой опасности в отношении формирования новообразований (12).

Ранее было показано, что нормальный атаксин 1 локализуется в ядре не только нейронов, но и других клеток мозжечка, в частности, астроцитов (13). Но вовлечение астроцитов в патогенез полиглутаминовых спиноцеребеллярных атаксий, а также молекулярная основа данного процесса, является наименее изученной темой. Изучение нейрон-астроцитарных взаимодействий коры мозжечка поможет адаптировать опыт контроля эксайтотоксичности и активации нейропротекции в синапсах большого мозга с помощью уже известных фармакологических средств, таких как мемантин, к патологическим условиям при полиглутаминовых спиноцеребеллярных атаксиях.

Степень разработанности темы исследования.

Изучение патофизиологии полиглутаминовых атаксий началось сразу после открытия мутации, приводящей к развитию СЦА1, в апреле 1993 года (Banfi et al., 1994) и проводилось на культуре клеток НЕК, культуре дрожжей (Tsai et al., 2004), дрозофилах (Fernandez-Funez et al., 2000) и грызунах (Watase et al., 2002). Изначально были описаны токсические эффекты на развитие и выживаемость нейронов мутантного белка Атаксина 1, его неправильный фолдинг с образованием цитоплазматических агрегатов (Matilla et al., 1998). Поэтому одним из современных направлений в исследовании полиглутаминовых СЦА является инактивация токсического мутантного Атаксина с помощью генов-блокаторов транскрипции (Keiser et al., 2016; Taniguchi et al., 2016; Konno et al., 2014), заместительной клеточной и генной терапии (при использовании стволовых клеток) (Matsuura et al., 2014), иммунотерапии — образованию антител к олигомерам мутантных Атаксинов (Lasagna-Reeves et al., 2016), а также коррекции поздних проявлений клеточной патологии митохондрий и эндоплазматического ретикула при использовании антиоксидантов (Stucki et al., 2016).

Наибольшим недостатком выше перечисленных экспериментальных подходов является ограниченное количество молекул-мишеней, а также широкий спектр побочных эффектов, связанных с патологической модуляцией экспрессии генов при генной терапии и малигнизации при введении плюрипотентных стволовых клеток (Kuniakova et al., 2015). Подходом с наименьшими побочными эффектами является использование антиоксидантов, однако данный подход показал малую эффективность на моделях полиглутаминовых СЦА (Shinnet al., 2021). Всё это не позволяет провести даже пилотные исследования на ограниченной группе больных. Отсутствие патогенетической терапии и симптоматических препаратов, способных улучшить качество и увеличить продолжительность жизни больных полиглутаминовыми СЦА, свидетельствуют о крайне низкой разработанности темы исследования.

Цель исследования

Выявление новых клеточных и молекулярных механизмов развития полиглутаминовых атаксий с использованием общих полиглутаминовых и оптогенетических моделей, а также частных моделей спиноцеребеллярной атаксии 1 типа; разработка на их основе подходов к патогенетической коррекции данных состояний.

Для достижения поставленной цели были сформулированы следующие **задачи**:

1. Создать векторные модели, описывающие общие и частные звенья патогенеза полиглутаминовых атаксий: модель спиноцеребеллярной атаксии 1 типа с отсроченной экспрессией мутантного атаксина 1 в клетках Пуркинье, оптогенетическую модель астроглиоза мозжечка и модель с селективной экспрессией мутантного атаксина 1 в глии Бергмана.
2. В модели спиноцеребеллярной атаксии 1 типа и полиглутаминовой модели показать молекулу-мишень для мутантных белков, влияющую на морфологию клеток Пуркинье и экспрессию на поверхности их дендритов mGluR1. Изучить процессы кратко- и долговременной синаптической пластичности в условиях недостаточности mGluR1 в данных моделях.
3. На оптогенетической модели астроглиоза мозжечка и модели с селективной экспрессией мутантного атаксина 1 в глии Бергмана показать клеточные нарушения трёхкомпонентного синапса и установить вклад транспортёра глутамата EAAT1 в эксайтотоксичность в описанных моделях.
4. На трансгенной полиглутаминовой модели оценить внутривенный путь векторной доставки аденовирусного рекомбинантного гена MSCV-GFP-P2A-CRAG с последующим синтезом в клетках Пуркинье сигнальной ГТФазы CRAG, влияющей на клиренс мутантных полиглутаминовых нерастворимых белков. Показать положительный эффект от введения на морфологию клеток Пуркинье в данной модели. Оценить восстановление синаптической пластичности на полиглутаминовой модели и модели с селективной экспрессией мутантного атаксина 1 в клетках Пуркинье при данном типе введения рекомбинантного гена.
5. Оценить эффект от введения мезенхимальных стволовых клеток в подболобочное пространство в области верхних двухолмий трансгенных модельных полиглутаминовых животных на морфологию клеток Пуркинье, и mGluR1-обусловленные процессы в них. Описать восстановление двигательных

навыков у данных животных после введения мезенхимальных стволовых клеток.

6. На трансгенной модели с селективной экспрессией мутантного атаксина 1 в клетках Пуркинье показать эффекты и длительность влияния низких доз баклофена, после его однократного введения в кору мозжечка, на mGluR1-опосредованный путь передачи сигналов.
7. В оптогенетической модели астроглиоза мозжечка показать эффект от длительного приёма мемантина per os на ключевые звенья патогенеза в развитии эксайтотоксичности, оценить морфологию и функцию глии Бергмана и клеток Пуркинье, а также на восстановление двигательных функций у данных животных. Оценить возможные побочные эффекты при длительном приёме мемантина.

Научная новизна

Созданы модели спиноцереbellарной атаксии 1 типа: с отсроченным началом заболевания, максимально приближенная по времени к естественному дебюту у больных и с селективной экспрессией атаксина 1 в астроцитах мозжечка. Создана оптогенетическая модель астроглиоза мозжечка, описывающая астроцитарное звено патогенеза полиглутаминовых спиноцереbellарных атаксий. Показан общий молекулярный механизм нарушения морфологии клеток Пуркинье при полиглутаминовых спиноцереbellарных атаксиях в виде уменьшения экспрессии RoRa. Был количественно оценён эффект от недостаточности mGluR1 в моделях спиноцереbellарной атаксии 1 типа посредством регистрации и измерения характеристик mGluR1-опосредованных медленных возбуждающих синаптических токов. Показана зависимость моторного обучения от mGluR1-опосредованной синаптической пластичности, так как у животных с нарушением долговременной депрессии и эндоканнабиноид-опосредованного подавления синаптического возбуждения наблюдалось развитие атаксического фенотипа. Показана успешная внутривенная доставка рекомбинантного гена в клетки Пуркинье, экспрессирующего сигнальную ГТФазу CRAG. Доказано восстановление mGluR1-опосредованного пути передачи сигналов при экспрессии CRAG в двух моделях полиглутаминовых спиноцереbellарных атаксий. Показана эффективная трансплантация мезенхимальных стволовых клеток при их инъекции в подболобочное пространство в области верхних двухолмий трансгенным модельным полиглутаминовым животным. Установлено, что наличие мезенхимальных стволовых клеток в коре мозжечка восстанавливает морфологию клеток Пуркинье и mGluR1-опосредованный путь передачи сигналов. Экспериментально доказано, что однократное введение низких доз баклофена в кору мозжечка трансгенных животных с селективной экспрессией мутантного атаксина 1 в клетках Пуркинье вызывает длительное восстановление mGluR1-опосредованного пути передачи сигналов посредством активации ГАМКв рецепторов и приводит к уменьшению атаксического фенотипа. Установлено, что долговременный приём мемантина животными с оптогенетической моделью астроглиоза мозжечка оказывает выраженное влияние на трёхкомпонентный синапс в виде восстановления морфологии клеток Пуркинье и глии Бергмана. Уменьшение эксайтотоксичности в синапсах клеток Пуркинье во время применения мемантина происходит из-за восстановления экспрессии транспортёра возбуждающих аминокислот EAAT1 в глии Бергмана.

Теоретическая и практическая значимость работы

Данное исследование имеет важное значение как для практической, так и для фундаментальной медицины. Выявлены молекулярные механизмы нарушения сигнализации в клетках Пуркинье при полиглутаминовых атаках на ранней и развёрнутой стадии заболевания.

Полученные данные о молекулярно-клеточных механизмах позволяют разработать таргетное патогенетическое лечение полиглутаминовых спиноцеребеллярных атаксий, которое может быть направлено на коррекцию как астроцитарного, так и нейронного компонента синапса коры мозжечка.

Открытые нами изменения на ранней стадии заболевания, такие как нарушение сигнализации mGluR1, могут быть частично скорректированы такими препаратами, как баклофен. Этот препарат уже используется в рутинной практике врача для лечения других заболеваний. Нарушения, имеющие место на поздней стадии, такие как эксайтотоксичность, могут быть успешно скорректированы мемантином, который способствует сохранению EAAT1 – молекул, участвующих в обратном захвате глутамата из синаптической щели. Также положительные эффекты CRAG и стволовых клеток на мозжечок модельных животных помогут в дальнейшем более эффективно бороться с этими полиглутаминовыми заболеваниями на любой стадии.

Выявленные нами общие звенья патогенеза, позволяют вышеуказанные фармакологические средства использовать в клинических исследованиях для разработки терапии полиглутаминовых спиноцеребеллярных атаксий.

Методология и методы исследования

Работа проведена на переживающих срезах мозжечка мышей линии CD1 и трансгенных мышях линии C57BL/6. В работе использовались иммуногистохимическое исследование срезов мозжечка, электрофизиологические методы (локальной фиксации потенциала, запись полевых потенциалов) мембраны клеток, тестирование поведения животных с выявлением нарушений функции мозжечка, методы оптогенетики, стереотаксическое введение веществ в кору мозжечка, генетические методы исследования (ПЦР), Ca^{2+} имиджинг. Достоверность полученных данных подтверждена методами математической статистики.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Общими звеньями патогенеза полиглутаминовых спиноцеребеллярных атаксий являются нарушение mGluR1-опосредованного пути передачи сигналов и развитие эксайтотоксичности, что приводит к изменению морфологии клеток Пуркинье и глии Бергмана, а также нарушению синаптической пластичности нейронов коры мозжечка и появлению атаксического синдрома у модельных животных.
2. Коррекция mGluR1-опосредованного пути передачи сигналов в клетках Пуркинье возможна двумя путями: 1- поддержание достаточного количества mGluR1 на шипиках дендритов при сохранной морфологии клеток Пуркинье посредством усиления клиренса мутантных белков и введения стволовых клеток в зону нейродегенерации; 2- перераспределение молекулярной сигнализации с помощью комплекс-образующих с mGluR1 метаболитных рецепторов, таких как ГАМКв.

3. Уменьшение явлений эксайтотоксичности в синапсах клеток Пуркинье возможно при длительном введении мемантина животным с оптогенетической неспецифической моделью астроглиоза мозжечка, общей для всех полиглутаминовых спиноцеребеллярных атаксий. Мемантин восстанавливает морфологию глии Бергмана и клеток Пуркинье, а также улучшает трансинаптическую передачу в синапсах коры мозжечка. Побочными эффектами, в виде появления тревожности при хроническом потреблении мемантина, можно пренебречь, в силу выраженного его положительного влияния на нейроны мозжечка при нейродегенеративном процессе.

Степень достоверности

Высокая степень достоверности полученных результатов подтверждается тем, что научные положения и выводы обоснованы и получены с использованием системного подхода к решению поставленных задач. В экспериментах использовалась достаточная выборка исследуемых животных в соответствии с основными регламентами работы с лабораторными живыми объектами. Эксперименты проводились на высокотехнологичном оборудовании с использованием современных методов исследований. Полученные результаты были подвергнуты адекватному статистическому анализу.

Личный вклад соискателя

Автором были определены цели и задачи, разработан дизайн исследования, отработаны протоколы экспериментальной части работы. Усреднённая полиглутаминовая модель, а также векторные модели СЦА1 были созданы при совместном участии учёных Университета Гунма (Н. Hitai, К. Takayama, Н. Hosoi, Т. Torashima), а также Университета Бристоля (S. Kasparov). Также векторная модель селективной экспрессии мутантного атаксина 1 в астроцитах и S100 β опосредованная модель астроглиоза были разработаны и изучались совместно с исследователем КрасГМУ Белозор О.С. Автором самостоятельно набран материал для исследований, проведено поведенческое исследование животных, иммуногистохимические исследования, моделирование патологии на животных, ПЦР исследования, электрофизиологические эксперименты и оптогенетическая стимуляция. Автором проведена статистическая обработка данных, полученных в ходе исследований, и интерпретация полученных результатов; подготовка публикаций и оформление рукописи диссертации.

Апробация работы

Данные, полученные в работе, были доложены на международных конференциях в виде устных и стендовых докладов: на 35-й ежегодной конференции японского общества Нейронаук, г. Ниагоя, 2012; 36-й ежегодной конференции японского общества Нейронаук «Neuroscience 2013», г. Киото; 5-й ежегодной конференции международного общества радиационной нейробиологии, г. Такасаки, 2013; «Russia-Japan medical symposium», г. Красноярск, 2018 г.; «II Всероссийской научной конференции с международным участием «ОПТОГЕНЕТИКА+ 2018», г. Санкт-Петербург, 2020г; научной конференции с международным участием «Разработка лекарственных средств - традиции и перспективы», г. Томск 2021г;

По результатам работы опубликовано 15 печатных работ в журналах, индексируемых аналитическими базами Scopus, Web of Science, RSCI, в том числе в журналах, рекомендованных ВАК для публикации материалов диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук.

Работа была выполнена при поддержке грантов: Грант Фонда содействия развитию малых форм предприятий в научно-технической сфере «УМНИК» 2017-2019 гг. (11950ГУ/2017); Гранты РФФИ КО_а 2017-2019 гг. (17-54-10005) и Аспиранты 2019-2022 гг. (19-315-90044), Грант Красноярского краевого фонда науки 2021-2022 гг. (№ 636).

Структура и объем диссертации

Диссертация оформлена в соответствии с Национальным стандартом Российской Федерации ГОСТ Р7.0.11-2011. Материал диссертации изложен на 345 страницах машинописного текста, иллюстрирован 115 рисунками и 19 таблицами. Работа состоит из введения, 4 глав (обзор литературы, материалы и методы, результаты, обсуждение результатов), заключения, выводов, списка литературы. Список литературы включает 527 источников, в том числе 15 отечественных и 512 зарубежных.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

В введении обоснована актуальность темы диссертационного исследования, определены цель и задачи исследования, описаны научная новизна, практическая и теоретическая значимость работы, сформулированы положения, выносимые на защиту.

В первой главе приводится анализ научной литературы по теме исследования. Описаны известные данные о СЦА1, о функциях атаксина 1 в норме и его роли в патогенезе СЦА1. Часть главы посвящена описанию ГБ, роли астроцитов в трёхкомпонентном синапсе, их влиянии на синаптическую передачу в норме и при нейродегенерации. Глава проиллюстрирована таблицами и рисунками.

Вторая глава посвящена описанию материалов и методов исследования. Объект исследования: мыши линий В16 и CD1. Исследования выполняли после утверждения заявки и протокола на использование лабораторных животных на заседании биоэтической комиссии по работе с животными при локальном этическом комитете ФГБОУ ВО КрасГМУ им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого (выписка из протокола № 70/2016 от 06.06.2016 г.).

Использовались следующие мышинные модели: 1. Отсроченная лентивирусная модель СЦА1 избирательной экспрессии мутантного атаксина 1 в КП мозжечка животных В16 (введение LVV MSCV-ATXN1[Q76]-GFP в кору мозжечка) была создана при совместном участии учёных Университета Гунма Н. Hirai и Н. Nosoі (Shuvaev et al., 2017). 2. Классическая модель СЦА1 с использованием трансгенных мышей линии B05, селективно экспрессирующих мутантный атаксин 1 в КП мозжечка (Burright et al., 1995). 3. Максимально приближенная к реальному течению заболевания, СЦА1 модель с использованием СЦА1-К1 мышей, с неспецифической экспрессией атаксина 1 (Watase et al., 2002). 4. Модель «усреднённого» полиглутаминового заболевания с использованием мышей линии В16, экспрессирующих удлинённую полиглутаминовую цепочку без других функциональных сайтов белка (сделана на основе трансгена ATXN-3, не содержащего Джозефинового домена - 286 аминокислот на N-конце) была создана при совместном участии учёных Университета Гунма Н. Hirai и Т. Torashima (Oue et al., 2009). 5. Второй вариант модели с той же патологической последовательностью сделан на основе LVV MSCV-polyQ/GFP для исследования токсических эффектов LVV была создана при совместном участии учёных

Университета Гунма Н. Hirai и К. Takayama (Sawada et al., 2010). 6. Модель нейродегенерации «staggeger», вызванная делецией 122-bp гена *roga*, кодирующего фактор транскрипции «ROR α » (Hamilton et al., 1996). 7. Lentивирусная модель СЦА1 избирательной экспрессии мутантного атксина 1 в астроцитах (введение LVV GFAP-Атаксин 1[Q85]-Flag в кору мозжечка) была создана при участии профессора Университета Бристоль S. Kasparov (Shuvaev et al., 2021). 8. Оптогенетическая аденовирусная модель «усреднённого» «неспецифической» нейродегенерации мозжечка (введение AVV GFAP-ChR2-mKate) была создана при участии профессора Университета Бристоль S. Kasparov (Shuvaev et al., 2021). 9. Модель нейродегенерации, вызванная астроцитозом мозжечка (введение белка S100 β в кору мозжечка) (Belozor et al., 2019). Все 9 моделей животных, охватывающих наиболее важные звенья патогенеза полиглутаминовых атаксий.

Были осуществлены следующие подходы к патогенетическому лечению СЦА1 модельных животных:

1. Таргетная доставка генов: Заместительная терапия плохо синтезируемых белков: MSCV-GFP-P2A-mGluR1-WPRE; L7-4mCMV-GFP-P2A-mtTA+TRE-NA-mGluR1. Клиренс агрегированных белков посредством активации белков убиквитин-протеасомной системы: MSCV-GFP-P2A-CRAG.

2. Трансплантация стволовых клеток: Мезенхимальные стволовые клетки из костного мозга мыши, линия KUM10 (MCK).

3. Фармакотерапия: воздействие на пути передачи сигналов: баклофен. Воздействие на эксайтотоксичность: мемантин.

В исследовании были использованы следующие методы:

Создание вирусных векторов. Создание лентивирусных векторов (LVV). Белок вируса типа G Везикулярного стоматита (VSV-G) псевдотипов векторов ВИЧ были использованы в исследованиях. Основа плазмид-хелперов была выделена из рCAGGS (Hitoshi et al., 1991). Вирусные векторы были сконструированы для экспрессии GFP или GFP и укороченной формы атксина 3 с 69 глутаминовыми повторами (удлинённая полиглутаминовая цепочка; polyQ) (Oue et al., 2009) под контролем мышинового промотора вируса стволовых клеток (MSCV) (Hawley et al., 1994) или укороченного L7 промотора (tr-L7), включающего в себя, 1 kb оригинального специфического L7 промотора клеток Пуркинью (Oberdick et al., 1990). Детальное производство векторов было описано в наших работах (Iizuka et al., 2009), (Torashima et al., 2006). Коротко, вирусные вектора производились при трансфекции клеток эндонефроса человека (НЕК) 293Т в смеси с четырьмя плазмидами с использованием метода кальций фосфатной преципитации. Клетки культивировались в Dulbecco's модифицированной Eagle's среде (DMEM) с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки, 50 Ед/мл пенициллина G и 50 μ г/мл стрептомицина (рН 7.35) при 37 $^{\circ}$ C в 5% CO $_2$ окружении. Клетки были посеяны в один слой за 24 ч до трансфекции. Смесь из четырёх плазмид, содержащих рCAGkGP1R, рCAG4RTR2, рCAG-VSV-G и рCL20с- основных лентивирусных плазмид. 16 часов после трансфекции, клетки были промыты солевым фосфатным буфером, не содержащим Ca $^{2+}$ и Mg $^{2+}$ (PBS(-)) дважды. Среда, содержащая частицы векторов, были собраны 40 ч после трансфекции. Среда с образцами, содержащая вирусных частиц были профильтрованы через 0.22- μ m мембрану и отцентрифугированы при 25,000 об/мин в течение 90 мин. Супернатант удаляли. По окончании центрифугирования вирусы были

суспензированы в 90µл PBS(-) (pH 7.4). Вирусные титры были в пределах 5×10^9 – 5×10^{10} трансдукций ЕД/мл. Вирусные вектора содержались при 4°C и использовались для инъекции в течение 1 недели.

Создание аденоассоциированных вирусных векторов (AAV). N-концевой укороченный атаксин 3 с чрезмерно увеличенной полиглутаминовой цепочкой был избирательно экспрессирован в КП с помощью КП специфического L7 промотора (Oue et al., 2009). Для экспрессии терапевтического гена в КП с помощью аденоассоциированного вирусного вектора серотипа-9 (AAV9), мы использовали мышинового промотора вируса стволовых клеток (MSCV), который имеет сильную транскрипционную активность в КП (Takayama et al., 2008). Экспрессия плазмид рAAV/MSCV-GFP-P2A-CRAG была получена через ферментативные реакции с использованием рNAV (Tamayose et al., 1996) и рCL20c/MSCV-GFP-P2A-CRAG (Torashima et al., 2008). Рекомбинантные одноцепочечные AAV9 вектора были созданы при помощи котрансфекции НЕК293 клеток с тремя плазмидами, рAAV/MSCV-GFP-P2A-CRAG, рHelper (Stratagene, La Jolla, CA, USA), и рAAV2/9 (предоставлены Dr. J. Wilson). Вирусные частицы были очищены с помощью преципитации аммонием сульфатом и йодиксанол непрерывное центрифугирование с постоянным повышением скорости, как было описано ранее (Miyake et al., 2012). Геномный титр очищенных AAV9 векторов, определяемых с помощью real-time ПЦР были 9.9×10^{14} векторных геномов/мл.

Создание аденовирусных векторов (AVV). Для достижения высокого уровня экспрессии ChR2 в ГБ, мы использовали AVV с увеличенным GFAP промотором (Liu et al., 2008). Векторная конструкция GFAP-ChR2-mKate использовалась ранее (Gourine et al., 2010), (Figueiredo et al., 2014). Этот вектор с красным флуоресцирующим белком, mKate, использовался, как маркер трансдуцированных клеток. Пролиферация AVV происходила в клетках НЕК 293 до полного цитопатического эффекта, после чего, вирусные частицы высвобождались посредством сонификации. Мёртвые остатки НЕК клеток удалялись центрифугированием ($3000 \times g$ 10 мин). AVV очищались при ультрацентрифугировании (Optima X, Beckmann Coulter, Brea, CA, USA) в градиенте CsCl, алиquotировались и хранились при -80 °C.

Введение векторных конструкций. Вирусные векторы, были введены двум группам мышей: незрелым мышам на 6-7 день после рождения (P6-P7) и трёхнедельным мышам (P21-P25), в период, когда завершается формирование нейронных путей. Незрелые и трёхнедельные мыши анестезировались при помощи 2% изофлурана (скорость подачи: 1 л/мин). Трёхнедельным мышам внутрибрюшинно вводился хлорал гидрат (350 мг/кг веса животного), соответственно для создания глубокой анестезии. Вирусные векторы вводились в кору мозжечка, согласно протоколам, разработанным нами (Iizuka et al., 2009), (Torashima et al., 2006). Каждая мышь (P21-25) фиксировалась в стереотаксическом аппарате, место последующего введения выбривали. Делался срединный сагиттальный разрез кожи мозгового черепа, и оголялись кости черепа в области расположения мозжечка. Просверливалось трепанационное отверстие 5–6 мм каудальнее брегмы. Поршень шприца типа Hamilton присоединялся к микрокомпрессору (UltramicroPump II; World Precision Instruments (WPI), Sarasota, FL, USA), а кончик его шприца помещался в область молекулярного слоя коры червя мозжечка (6-я доля), затем 10 µл раствора вируса вводилось со скоростью

200 нл/мин с помощью микропроцессорного контроллера (Micro4; WPI). Использовались данные объём и скорость, так как при быстром введении тканей в области инъекции подвергаются набуханию, при медленном введении раствор вируса может распространяться на соседние доли мозжечка через межклеточные пространства, что приводит к инфицированию больших областей. После окончания введения вируса, шприц удалялся, кожа черепа ушивалась, животному присваивался порядковый номер. Для создания оптогенетической модели нейродегенерации, после завершения введения векторной конструкции, отверстие введения на черепе расширялось, к нему подводился светодиод, который надёжно фиксировался к костям черепа с помощью цемента. После всех описанных процедур животное помещалось на обогревающую подушку до выхода его из наркоза. После выхода животного из наркоза, его помещали в обычную клетку к другим животным.

Введение AAV в яремную вену животным и их ПЦР тестирование. Мышата в возрасте P1 и P2 получали инъекцию очищенного раствора AAV9 через внешнюю яремную вену с помощью 0.1-мл шприца Гамильтон (Hamilton Company, Reno, NV, USA) тонкой иглой диаметром 0,32мм (Becton Dickinson & Co, Franklin Lakes, NJ, USA). Животные без введения AAV использовались как контроль.

Культивирование и ведение МСК. KUM10, линия мезенхимальных стволовых клеток (МСК), выделялась из костного мозга мышей линии C57/B6. Клетки культивировались в среде M061101, содержащей 10 % фетальной бычьей сыворотки и антибиотиков (GP BioSciences, Yokohama, Japan) в присутствии 5 % CO₂ при 37 °С.

Введение в оболочки, покрывающие мозжечок. Мышей анестезировали кетаминном (100 мг/кг) и ксилазином (20 мг/кг) и помещали на стереотаксическое устройство. Кожа рассекалась сагиттально для обнажения черепа. Просверливалось небольшое отверстие 0 мм латеральнее и 5 мм каудальнее брегмы. Кончик иглы шприца (Hamilton, Reno, NV, USA) вводился через твёрдую мозговую оболочку в мягкие мозговые оболочки над верхним двухолмием. Шприц был соединён с микроинжектором (UltramicroPump II; World Precision Instruments (WPI), Sarasota, FL, USA), который управлялся контроллером (Micro4; WPI). GFP-меченные МСКs (6×10^5 клеток) с помощью LVV MSCV-GFP, суспензированные в 10 µл культуральной среде, вводились со скоростью 300 нл/мин.

Инtrateкальное введение МСК. Глубоко анестезированные мыши помещались на стереотаксический аппарат. Введение производилось в области между затылочной костью и 1-м шейным позвонком, где оболочки покрывают продолговатый мозг. Таким образом, игла шприца (BD, Franklin Lakes, NJ, USA) вводилась в субарахноидальное пространство. После удаления, приблизительно 15 µл СМЖ, 3×10^3 МСКs суспензированных в 10 µл культуральной среды, вводились в течение 1 мин.

Генетические методы. *Генотипирование с помощью рутинного ПЦР исследования.* Три недели после введения AAV в вену, производилось генотипирование мышей (гетерозиготные модельные мыши или мыши дикого типа) с помощью стандартного метода ПЦР при использовании специфических праймеров 5'-ATGTACCCATACGATGTTCC-3' (прямой) и 5'-CTAGCGAGGGAATGAAGAAT-3' (обратный).

Количественная RT-ПЦР. РНК выделялось из полушарий мозжечка животных в возрасте P45 или P46 с помощью набора RNeasy (Qiagen, Hilden, Germany), и подвергалось обратной транскрипции с помощью набора ReverTra AceR qPCR RT Kit (TOYOBO, Osaka, Japan). Измерения производились с помощью набора THUNDERBIRD qPCR Mix (TOYOBO) на амплификаторе Dice TP800 (Takara-Bio, Shiga, Japan) с циклами 95 °C в течение 5 сек и 60 °C в течение 30 сек. Уровень VEGF мРНК нормировался к уровню GAPDH. Изменения экспрессии VEGF были представлены относительно уровня показателей животного дикого типа. Использованы следующие пары праймеров: GAPDH, 5'-ACAACCTTTGGCATTTGTGGAA-3', 5'-GATGCAGGGATGATGTTCTG-3'; VEGF, 5'-CTGTGCAGGCTGCTGTAACG-3', 5'-GTTCCCGAAACCCTGAGGAG-3'.

Исследование поведения животных. *Тест «Rotarod».* Координацию исследовали с помощью метода вращающейся дорожки «Rotarod» (Rota-Rod Treadmill МК-610; Muromachi Kikai). Применялся протокол с постепенным нарастанием скорости вращения «accelerating protocol» (с 0 до 40 об/мин в течение 3 минут). В течение последующих 2 минут дорожка вращалась с одинаковой скоростью 30 об/мин. Каждому животному давалось 4 попытки. Интервал между попытками составлял 30 минут. Мы записывали время нахождения животного на вращающейся дорожке и брали среднее значение.

Исследование движений задних конечностей. Протокол исследования был разработан Endo et al., 2009. Животных анестезировали 2% изофлураном, после чего им приклеивали круглые отражательные элементы (2 мм в диаметре) на выбранные участки кожи левой конечности: гребень подвздошной кости, большой вертел, коленное сочленение, латеральную лодыжку, пятый плюснефаланговый сустав, и палец на ступне. Движения конечности записывались с частотой 200 кадров/сек с помощью высокоскоростной камеры (HAS-220, DITECT, Inc.). Анализ движений производился в сагиттальной плоскости, параллельно направлению движения мышцы. Программа анализа изображений «DIPP-Motion Pro 2D» (DITECT, Inc.) использовалась для обработки движений в двух измерениях точек на суставах и для реконструирования диаграммы движения конечности.

Выработка условного рефлекса на отрицательное подкрепление (Fear conditioning). Протокол проводился три дня подряд в соответствии со стандартным подходом (Shoji et al., 2014). Тестовое устройство представляло собой акриловую квадратную камеру (размер 33 x 25 x 28 см), которая была помещена внутрь звуконепроницаемой камеры (размер 170 x 210 x 200 см) для минимизации внешнего шума во время испытаний. Над тестовой камерой устанавливали подсветку (светодиоды 100 люкс) и динамик для подачи условного раздражителя. Сетчатый пол был подключен к генератору (Ugo Basile, Gemonio, Италия) для подачи электрического сигнала в качестве безусловного стимула. В 1-й день создавали условия для замирания (тест на кондиционирование). Мышей помещали в камеру и позволяли свободно исследовать в течение 120 с. После этого предъявляли слуховой стимул (белый шум, 55 дБ) в течение 30 с, а в течение последних 2 с белого шума подавали электрический разряд 0,3 мА. Чтобы установить связь условного и безусловного рефлексов повторяли раздражение три раза за сеанс через 120, 240 и 360 с после начала испытания. Процесс тестирования фиксировали с помощью системы видеонализа животных ANY MAZE (Behavior Tracking Software, Stoelting, Чикаго, Иллинойс, США). Мы измеряли эпизоды

замирания и время замирания (в секундах) во время теста. Спустя 24 часа проводили контекстный тест, при котором мышей помещали в ту же камеру на 300 с при отсутствии каких-либо раздражителей. Сигнальный тест был проведен на 3-й день в новой среде. Эта тестовая камера отличалась цветом стен, структурой пола (без решетки) и освещенностью 30 люкс, что обеспечивало новый контекст по сравнению с камерой, связанной с условиями первого дня. Тест состоял из 180-секундного периода исследования новой среды мышами с последующей подачей белого шума в течение 180-секунд, но без электростимула.

Приподнятый крестообразный лабиринт. Приподнятый крестообразный лабиринт использовали для исследования тревожноподобного поведения (423). Лабиринт состоял из двух открытых рукавов (6 см × 32 см) и двух закрытых рукавов (6 см × 32 см с непрозрачными стенками высотой 19 см) с центральной площадкой 6 см × 6 см и был поднят на 54 см над полом. В окружающей комнате было темно, а лабиринт освещался верхним светом. Мышь помещали в центр лабиринта лицом к открытому рукаву и позволяли исследовать его в течение 5 минут. В течение этого времени движение определялось автоматически с помощью системы видеонализа животных ANY MAZE. Регистрировалось время нахождения в закрытых рукавах. Перед каждым испытанием лабиринт очищали 70%-ным этанолом (Asher et al., 2021).

Тест подвешивания мыши за хвост. Тест подвешивания за хвост (TST) используется для выявления поведенческого отчаяния и для оценки эффектов антидепрессантов у мышей (Krishnan et al., 2011), (Cryan et al., 2005). Мышь подвешивали за хвост на высоте более 10 см от пола на 6 мин. Периоды и время полной неподвижности определяли с помощью системы видеонализа ANY MAZE. Мыши, которые взбирались по собственному хвосту или падали вниз, были исключены из анализа.

Вестерн-блоттинг. Кора мозжечка, трансгенных животных и экспрессирующих вирусные генетические конструкции, была исследована с помощью вестерн-блоттинга, согласно установленным протоколам (Torashima et al., 2008). Исследуемый материал был растворён в лизирующем буфере, содержащем 50 мл PBS и 5 мл EDTA, 0.4% раствор Triton X-100 был также добавлен вместе с коктейлем ингибиторов протеаз (Nacalai Tesque, Kyoto, Japan). После обработки ультразвуком, концентрированные белки в образцах определялись с помощью прибора NIPA (non-interfering protein assay; Calbiochem, Darmstadt, Germany). Затем, образцы подвергались электрофорезу в 10% SDS полиакриламидном геле и переносились на PVDF мембраны (Immobilon; Millipore, Temecula, CA, USA), с последующим блокированием 4% раствором обезжиренного сухого молока в Tris-буферизованном солевом растворе, содержащем 0.2% Tween-20. Блоты инкубировались вместе с поликлональными антителами кролика или мыши к исследуемым белкам. Вторичные антитела были HRP-конъюгированы с антикроличьими или антимышиными IgG (Bio-Rad, Tokyo, Japan), соответственно, в разведении 1:4000. Иммунореактивные банды визуализировались с помощью усиленного хемилюминесцентного реагента (ECL plus; GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA).

Изготовление срезов живых тканей. Мыши (P26-P35 и P36-45) были декапетированы, вскрыта черепная коробка и забран головной мозг. Головной мозг целиком был охлаждён в ледяном растворе Рингера ((в мМ): 234 сахарозы,

2.5 KCl, 1.25 NaH₂PO₄, 10 MgSO₄, 0.5 CaCl₂, 26 NaHCO₃, 11 D-глюкозы), в течение 1 мин, который аэрировался смесью газов 95% O₂ и 5% CO₂. Затем был выделен червь мозжечка и использовался для приготовления парасагиттальных срезов. Для записи полевых потенциалов производилась фронтальная нарезка полушарий большого мозга. Срезы (толщиной 250-µм) были нарезаны с помощью вибротома (D.S.K. Super microslicer Zero 1, Japan) и инкубировались до момента их использования в эксперименте, но не менее 1 часа при комнатной температуре во внеклеточном растворе, имеющим следующий состав (в mM): 125 NaCl, 2.5 KCl, 1.25 NaH₂PO₄, 1 MgCl₂, 2 CaCl₂, 26 NaHCO₃, 10 D-глюкозы и 0.1 пикротоксина, который аэрировался смесью газов 95% O₂ и 5% CO₂.

Электрофизиологические методы исследования. *Метод локальной фиксации потенциала (Patch clamp).* Записи в режиме «целая клетка» проводились, согласно принципам, описанным ранее (Iizuka et al., 2009); (Torashima et al., 2008). Потенциал КП был фиксирован на уровне -70 мВ для записи ПВ-возбуждающих постсинаптических токов (ВПСТ) и на уровне -10 мВ для записи ЛВ-ВПСТ. Селективная стимуляция ЛВ и ПВ была подтверждена при помощи подавляющих парных импульсов (PPD) и усиливающих парных импульсов (PPF) амплитуд ВПСИ в межстимуляционном интервале в 50 мсек, соответственно. Записи в режиме «целая клетка» производились с визуально различимых КП с использованием 40x водно-иммерсионного объектива, прикреплённого к прямому микроскопу (Axioskop; Zeiss, Oberkochen, Germany), при комнатной температуре (26 °C). Соппротивление фиксирующих пипеток составляло 3–4 МΩ. Эти пипетки заполнялись внутриклеточным раствором, содержащим (в mM) 65 K-глюконата, 65 Cs-метансульфоната, 10 KCl, 1 MgCl₂, 4 Na₂АТФ, 1 NaГТФ, 20 HEPES, 0.4 EGTA и 5 сахарозы (pH 7.3, выверенная с помощью CsOH). Срезы продолжительно инкубировались во внеклеточном растворе, содержащем (в mM): 125 NaCl, 2.5 KCl, 1.25 NaH₂PO₄, 1 MgCl₂, 2 CaCl₂, 26 NaHCO₃, 10 d-глюкозы и 0.1 пикротоксина. Данный раствор постоянно аэрировался смесью газов, содержащим 95% O₂ и 5% CO₂. Пипетки для стимуляции (диаметр кончика 5–10-µм) заполнялись простым внеклеточным раствором и использовались для наложения прямоугольного импульса при очаговой стимуляции (продолжительность, 100 мсек; амплитуда, 5–500 µA). КП были фиксированы при -70 мВ для записи ПВ-ВПСТ и при -10 мВ для записи ЛВ-ВПСТ. Селективная стимуляция ЛВ и ПВ была подтверждена при помощи ППИ и УПИ амплитуд ВПСТ в межстимуляционном интервале 50 мсек, соответственно. Усилитель ЕРС-8 (НЕКА Instruments, Lambrecht, Germany) и программное обеспечение pCLAMP9 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) использовались для записи и анализа данных. Производилась фильтрация сигналов с частотой 3 кГц и оцифровка с частотой 10 кГц (Digidata 1320A; Molecular Devices). Чтобы найти множественную иннервацию ЛВ КП, стимуляционный электрод систематически перемещался вдоль гранулярного слоя, также увеличивалась сила раздражения в каждой точке соприкосновения электрода с гранулярным слоем. LTD была исследована, как это описано ранее (Hirai et al., 2005); (Torashima et al., 2008). После получения стабильных ПВ-ВПСТ, регистрируемых в течение 10 мин, LTD вызывалась при помощи совместной стимуляции, состоящей из 30 единичных ПВ стимулов вместе с деполяризационным импульсом смещения изначального потенциала с -70 мВ до +20 мВ, длящимся 200 мсек. Гиперполяризационный импульс (-10 мВ, 50 мсек)

был применён за 420 мсек до каждого ПВ стимула для наблюдения за сопротивлением доступа. Если сопротивление изменялось более чем на 20%, такие записи не включались в результаты исследований. ПВ-ВПСТ регистрировались каждые 10 сек при помощи стеклянного электрода, расположенного в молекулярном слое (продолжительность импульса, 10 мсек; сила, 20–100 μA) приблизительно в удалении на 100 μm от мягкой мозговой оболочки. Амплитуды ПВ-ВПСТ усреднённые за 1 мин были выбраны как среднее значение (6 импульсов за 1 минуту). Усреднённые амплитуды ПВ-ВПСТ после стимуляции анализировались и выражались в процентном соотношении к усреднённым амплитудам до применения стимуляции. Для записи медленных ВПСТ, сила электрического раздражения была отрегулирована относительно АМРА вызванных быстрых ВПСТ амплитудой 500 pA. Для выделения медленных ВПСТ срезы омывались 6-циано-2,3-дигидрокси-7-нитро-квиноксилатом (CNQX), антагонистом глутаматных АМРА рецепторов. Затем, медленные ВПСТ вызывались наложением электрического стимула на ПВ в 200 Гц.

Запись полевых потенциалов. Срезы мозга перфузировали насыщенным кислородом (95% O₂ + 5% CO₂) внеклеточным раствором, содержащим (в mM) 125 NaCl, 2,5 KCl, 2 CaCl₂, 1 MgCl₂, 1,25 NaH₂PO₄, 26 NaHCO₃ и 10 глюкоза при pH 7.2 со скоростью ~2 мл/мин. Для оценки суммарной синаптической активности нейронов пВПСП регистрировали из зон CA1 и CA3 вентрального гиппокампа с помощью электродов из боросиликатного стекла с сопротивлением 5–10 МОм, заполненных внеклеточным раствором. Активность нейронов вызывали электрической стимуляцией (длительность 0,1 мс, 0,33 Гц) с использованием платиноиридиевого электрода 5 МОм, помещенного на коллатераль Шаффера. Регистрация данных (фильтр 3 кГц) и преобразование в цифровой формат осуществлялись с помощью усилителя НЕКА ЕРС10. Были измерены амплитуда пВПСП, время нарастания, τ и коэффициент усиления парных импульсов (PPF). PPF регистрировали с интервалом 50 мс между первым и вторым пВПСП и измеряли как отношение второго пВПСП к первому пВПСП.

Ca²⁺ имиджинг. ПВ стимулировали импульсами тока (60 мсек, 5-100 μA) через стеклянную пипетку, заполненную внеклеточным раствором. Для улучшения визуализации стимулируемой зоны дендритов в КП на конфокальном изображении, кончик стимуляционной пипетки погружался в раствор раствором PBS, содержащий 0.1-0.2% Alexa Fluor 488-конъюгированным козы к IgG кролика (Life Technologies) в течение 3-10 сек до использования (Ishikawa et al., 1993). Сигнал от подсвеченного кончика пипетки на поверхности молекулярного слоя никогда не забивал Ca²⁺ сигналы дендритов КП, так как её фокус всегда был выше. Для записи Ca²⁺ сигналов, делались конфокальные флуоресцентные изображения с частотой ~30 кадров/сек (33 мсек экспозиция, 512 × 512 пикселей, без фильтра) с помощью 40× водно иммерсионного объектива (LUMPLFLN 40XW, Olympus, Tokyo, Japan), CCD камеры (iXon3 DU-897E-CS0-#BV-500, Andor, Belfast, Northern Ireland) и высоко скоростной заглушки (CSU-X1, Yokogawa Electric, Tokyo, Japan), прикреплённой к микроскопу (BX51WI, Olympus, Tokyo, Japan). Исследуемая область дендритов КП была выбрана так, чтобы ветвление дендритов лежало максимально в одной плоскости, чтобы избежать перекрытия с сигналами вне фокуса. Более 5 исследуемых областей (ROI) одного и того же размера (обычно десятки ROI) исследовались для описания процесса в дендритах, и каждая ROI

сравнивалось с нефлуорисцирующим внеклеточным пространством, чтобы избежать возможной неправильной оценки флуоресценции из-за заднего фона. Правильность положения ROI также подтверждалась на усреднённых снимках или изображениях с максимальной проецированной интенсивностью, полученных от более 300 снимков. Размер ROI был намного меньше, чем внутренний размер Ca^{2+} сигнала дендритов, распространяющегося радиально от точки стимуляции. Таким образом мы смогли минимизировать появление ложных Ca^{2+} сигналов. Средняя флуоресценция во время t (F_t) в каждой ROI измерялась относительно свечения заднего фоне, и Ca^{2+} -зависимое увеличение флуоресценции измерялось при подсчёте $\Delta F/F_{\text{базового}}$, где $F_{\text{базовое}}$ – это средняя интенсивность свечения до стимуляции ПВ и $\Delta F = F_t - F_{\text{базовое}}$. Свечение заднего фона было получено из области, не содержащей элементы записи на том же снимке. Ca^{2+} трейсы ($\Delta F/F_{\text{базовый}}$) от каждой ROI было показано одинаково, с некоторыми вариациями. Для оценки Ca^{2+} сигналов, пиковых значений, интегралов и времени полуспада измерялись значения из всех Ca^{2+} трейсов, и их максимальные значения были взяты для репрезентативных данных конкретной клетки. Для достижения mGluRs-опосредованных процессов в ПВ-КП синапсах, была применена короткая высокочастотная тетанус-стимуляция. Сила импульса была подобрана так, что амплитуда первой ПВ ВПСТ была примерно 100 pA и без признаков активации ЛВ. После обнаружения Ca^{2+} сигналов, вызванных раздражением ПВ, NBQX (10-20 μM) и D-AP5 (50-100 μM) применялись внеклеточно для изоляции mGluR-опосредованных медленных Ca^{2+} сигналов в дендритах.

Введение биоцитина и морфологический анализ КП. Для последующей визуализации морфологии КП, 0.5% биоцитин (Sigma-Aldrich, CO., St. Louis, USA), разведённый во внутриклеточном растворе, вводился посредством пассивной диффузии через фиксирующую пипетку в КП в режиме «целая клетка». Срезы мозжечка затем фиксировались в 4% растворе параформальдегида. После фиксации в течение одной ночи при 4°C, срезы были промыты в фосфатно-солевом буфере (3 раза по 5 мин) и обработаны 0.1 М в фосфатно-солевом буфере (pH 7.4), содержащим конъюгированный стрептавидин-Алекса 594. После 2 ч инкубации в этом растворе при комнатной температуре, в темноте, срезы были нанесены на предметные стёкла и покрыты покровным стеклом с добавлением монтирующей жидкости. Срезы анализировались с помощью конфокального лазер-сканирующего микроскопа (LSM 5 PASCAL; Carl Zeiss, Вена, Германия). При конфокальной микроскопии срезы мозжечка сканировались с интервалом глубины в 1 μm в режиме Z-stack. Для визуализации дендритов, флуоресценция, исходящая от Алекса-546 (возбуждаемая Гелиевым/Неоновым лазером) и GFP (возбуждаемая аргоновым лазером) собиралось в два канала с фильтрами на 560 нм и 480-520 нм, соответственно. Подсчёт площади дендритов КП, меченых биоцитином, производился с помощью анализирующей программы IP Lab.

Статистический анализ результатов. При оценке полученных фактических данных были использованы методы статистического описания, а также методы проверки статистических гипотез. Полученные значения выражались, как среднее \pm стандартная ошибка среднего, с приведением количества исследованных КП или животных, либо в виде Me (Q1; Q3) где Me – медиана, Q1 и Q3 – нижний и верхний квартили. В экспериментах использовалось не менее 3 животных в каждой группе, до 15 независимых измерений на группу. При нормальном распределении выборки

(оценка по критерию Колмогорова-Смирнова) статистический анализ различий между группами проводили с помощью непарного/парного t-теста Стьюдента. При распределении отличном от нормального использовали U-критерий Манна-Уитни. При сравнении нескольких групп использовали дисперсионный анализ через апостериорный критерий Тьюки. В анализе таблиц сопряженности для выборок маленьких размеров использовался точный тест Фишера после множественной парной коррекции Холмса. Во всех случаях различия принимали значимыми при $p \leq 0,05$.

Мы оценивали дендритную и соматическую ёмкости путем оптимизации двухчленного экспоненциального ряда кривой зависимости тока от скачка напряжения, чтобы найти постоянные времена τ_i . Здесь $R_{ss} = 4 \text{ M}\Omega$ – входное сопротивление, A_i – свободные параметры. Индексы d и s обозначают дендритный и соматический компоненты соответственно. Результирующая емкость затем рассчитывалась как $C_i = \tau_i / R_m$ {i = d, s}. R_m – сопротивление мембраны. Оптимизация проводилась в программе ClampFit 10.7 software. $V_{\text{step}} = 10 \text{ мВ}$ (Major et al., 1993): $I_{\text{clamp}}(t) = V_{\text{step}} \left(\frac{1}{R_{ss}} - A_d \tau_d e^{-t/\tau_d} - A_s \tau_s e^{-t/\tau_s} \right)$.

DSE анализировали с использованием уравнения двойной экспоненциальной

$$DSE = 100 + A \left(e^{-\frac{t}{\tau_1}} - e^{-\frac{t}{\tau_2}} \right) \left\{ A = \frac{100a\tau_1\tau_2}{\tau_1 - \tau_2} \right\}$$

формы:

Эта кривая удобна для предсказания изменений проводимости в синапсах (Sterratt et al., 2011). Эта модель была подогнана к экспериментальным данным путем минимизации суммы квадратов остатков по Нелдеру-Миду, чтобы найти «А» – максимальное снижение ВПСТ в процентах от начального уровня, и « τ_1 » и « τ_2 » – периоды полураспада для ВПСТ, чтобы достичь минимума и восстановиться до начальных 100%, соответственно. Для получения 95% доверительных интервалов для параметров А, τ_1 и τ_2 использовался метод параметрической начальной загрузки. Этот анализ был выполнен с использованием пакета Python 3.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Спектр патогенетических изменений при полиглутаминовых СЦА. Сложные разнонаправленные патологические механизмы при СЦА1 обуславливают широкий спектр нарушений, как в КП, так и в других клетках коры мозжечка. Для наглядной демонстрации общности этих процессов мы сравнили СЦА1 модели с другими моделями нейродегенерации мозжечка. Во всех этих моделях мы нашли нарушение морфологии КП, трансинаптической передачи и синаптической пластичности, связанной с mGluR1 передачей сигналов.

Нарушение морфологии КП в полиглутаминовых моделях СЦА. Ёмкость мембраны КП у гетерозиготных PolyQ трансгенных животных ($174.2 \pm 12.6 \text{ pF}$, $n=27$) была значительно меньше таковой в сравнении с животными дикого типа ($808.8 \pm 20.1 \text{ pF}$, $n=24$), что показывает, в первую очередь, на значительное уменьшение площади дендритов. Другие пассивные свойства мембраны тела КП, как сопротивление доступа и сопротивление мембраны не отличались в этих исследуемых группах.

Анализ кинетики ПВ ВПСТ показал значительное ускорение времени подъёма и коэффициента спада (τ) у гетерозиготных полиглутаминовых животных в

сравнении с животными дикого типа, что можно объяснить падением ёмкости дендритов за счёт их укорочения и большей компактности. Не было найдено значимых отличий в кинетике ЛВ ВПСТ, а также PPF и PPD в данных исследуемых группах (Таблица 1).

Таблица 1. Электрофизиологические свойства нативных КП дикого типа и КП от PolyQ трансгенных животных.

	Cm (pF)	Ra (MΩ)	Rm (MΩ)	ПВ ВПСТ			ЛВ ВПСТ			
				Подъём	Спад	PPF	Макс	Подъём	Спад	PPD
ДТ без введения (n=24/4)	808.8 ± 20.1	10.0 ± 0.3	249.9 ± 22.1	2.9 ± 0.2	9.6 ± 0.6	1.6 ± 0.1	724.5 ± 51.9	0.7 ± 0.0	5.8 ± 0.5	0.7 ± 0.2
PolyQ без введения (n=27/4)	174.2 ± 12.6	13.4 ± 0.7	300.6 ± 33.9	1.6 ± 0.1	4.1 ± 0.3	1.5 ± 0.1	721.3 ± 87.9	0.8 ± 0.1	5.9 ± 0.4	0.7 ± 0.0

Исследованы животные в возрасте 13-16 недель. Ra, сопротивление доступа; подъём, время подъёма; спад, константа времени спада; PPF, коэффициент усиления парных импульсов; PPD, коэффициент угнетения парных импульсов. Показатели PPF и PPD были получены при наложении двух импульсов с разницей во времени в 50 мс. Данные представлены как среднее ± стандартная ошибка среднего (SEM).

Для понимания схожих патоморфологических изменений в КП мы провели окрашивание кальбиндином срезов мозжечка в СЦА1 KI модели (Рисунок 1А). Толщина МС уменьшилась со $174,8 \pm 4,5$ $\mu\text{м}$ (n=11 от 3 животных) до $144,0 \pm 2,2$ $\mu\text{м}$ (n=14 от 3 животных) соответственно, $p = 2,1 \times 10^{-5}$ (Рисунок 1Б).

Эти морфологические изменения соответствовали падению емкости мембраны, выявленному при измерении емкости мембраны КП (Cm) в срезах мозжечка с помощью пэтч-клэмп, которая была значительно снижена у мышей СЦА1 KI ($p = 0,002$ и $p = 0,0012$, соответственно, Рисунок 1В).

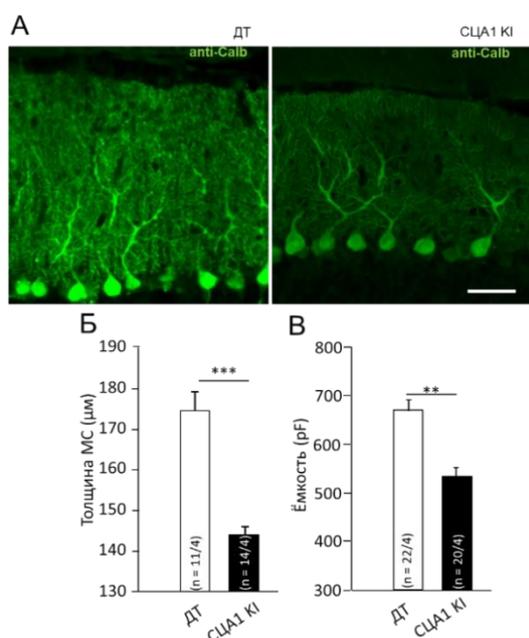


Рисунок 1. Мутантный атаксин 1 вызывает изменения в морфологии КП у модельных СЦА1 мышей. (А) Конфокальные изображения коры мозжечка, меченные анти-Кальбиндином (анти-Calb) (маркер КП), показывают коллапс молекулярного слоя (МС) у СЦА1 KI мышей. Мерная шкала 50 $\mu\text{м}$. Средняя (Б) длина МС и (В) емкость КП снижены у данных животных. В скобках указано количество (n) исследованных срезов или КП и животных (срезы/животные) или (КП/животные). Звездочки указывают на статистически значимое различие по сравнению с соответствующими контролями (критерий Стьюдента; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

В трансгенных моделях полиглутаминовых СЦА таких, как СЦА1 KI, экспрессия патологического гена начинается в пренатальном периоде, тогда как модели с отсроченной экспрессией атаксина 1 могут дать понимание о ранних нарушениях в КП у больных СЦА1, когда дебют имеет место на 3-4 десятилетия жизни. Для создания модели приближенной к естественному течению полиглутаминовых заболеваний мы создали отсроченную СЦА1 мышиную модель посредством введения в кору мозжечка LVV, кодирующую удлинённую полиглутаминовую последовательность. Так после введения LVV MSCV-ATXN1[Q30]-GFP и LVV MSCV-ATXN1[Q76]-GFP в кору мозжечка не наблюдалось каких-либо различий в морфологии КП с неинъецированными контрольными животными и животными экспрессирующими LVV MSCV-GFP (Рисунок 2).

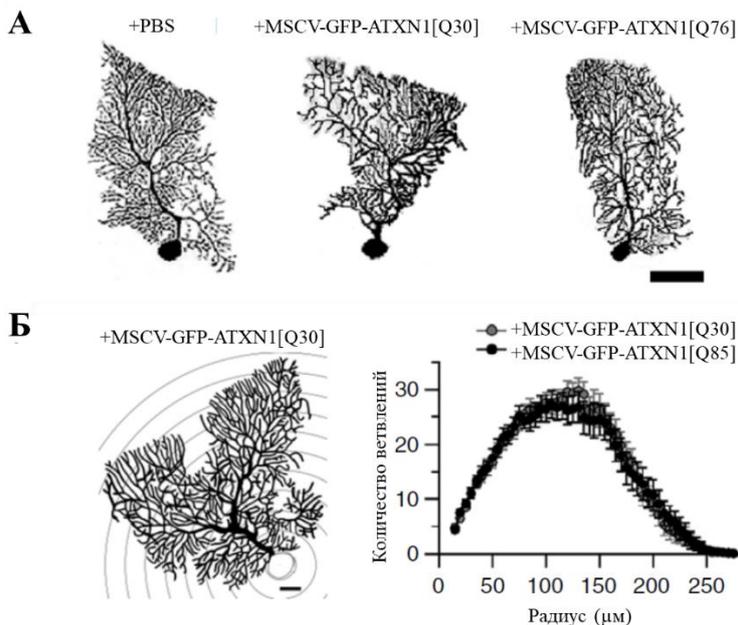


Рисунок 2. Морфология КП, экспрессирующих трансгенный мутантный атаксин 1. А, репрезентативные биоцитин-меченные изображения КП через 8 недель после введения LVV. Мерная шкала = 50 μ m. Б, анализ Шоля показывает сложность морфологии КП. Слева – репрезентативное изображение с концентрическими кругами с шагом в 20 μ m. Сомы КП (серый цвет) была исключена из анализа. Мерная шкала = 20 μ m. Справа – среднее

количество ветвлений дендритов на разном расстоянии от тела клетки. Двухфакторный дисперсионный анализ не показал различия в морфологии дендритов (F справа, влияние генотипа, $F_{1,38} = 0.08$, $P = 0.77$; взаимодействие, $F_{52,1976} = 0.31$, $P > 0.99$).

Нарушение синаптической пластичности КП в полиглутаминовых СЦА моделях. Мы исследовали SSE для проверки mGluR1 сигнального пути в КП PolyQ трансгенных животных. В ответ на тетанус стимуляцию, амплитуда ПВ ВПСТ в контрольной группе КП от животных дикого типа (ДТ) уменьшалась до $17,6 \pm 2,3\%$ от уровня до стимуляции. Возвращение амплитуды до исходных значений занимало более 60 с. В противовес этому, амплитуда ПВ ВПСТ в КП от PolyQ трансгенных животных повышалась до $107,5 \pm 12,4\%$ непосредственно после стимуляции и в максимуме достигала 140 % от уровня контрольных значений ($p < 0,01$) (Рисунок 3А). Это доказывает, что у PolyQ трансгенных животных имеет место нарушение mGluR1 сигнального пути. Однако здесь нельзя исключить нарушение выделения эндоканнабиноидов. Для проверки этой гипотезы мы исследовали mGluR независимую эндоканнабиноид-опосредованную синаптическую пластичность (DSE). Однако DSE в КП от PolyQ трансгенных

животных не была нарушена и статистически значимо не отличалась от DSE в КП от животных ДТ (Рисунок 3Б).

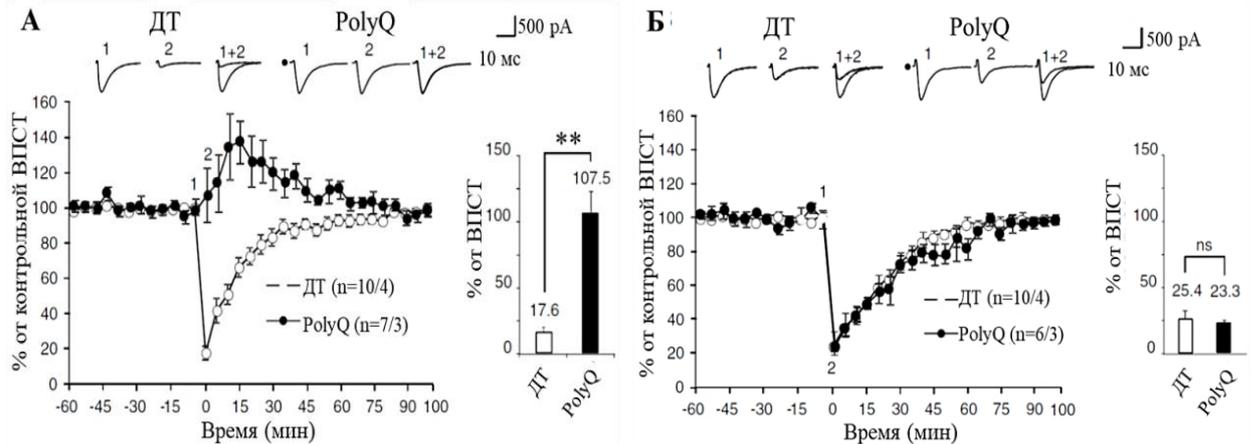


Рисунок 3 Нарушение синаптически вызванного подавления возбуждения (SSE), но не подавления возбуждения посредством деполяризации (DSE) в ПВ ВПСТ у PolyQ трансгенных животных. Амплитуда ПВ ВПСТ была фиксирована на уровне приблизительно 400 пА до стимуляции SSE или DSE. А Динамика изменения амплитуд ПВ ВПСТ до и после тетанус-стимуляции показывает абсолютное отсутствие SSE в КП PolyQ трансгенных животных. Справа показан график усреднённых амплитуд ПВ ВПСТ сразу после тетанус-стимуляции (временная точка 2) нормированных к уровню до стимуляции (временная точка 1). Б Динамика изменения амплитуд ПВ ВПСТ до и после 5 секундной деполяризации показывает сохранение DSE в КП PolyQ трансгенных животных. Справа показан график усреднённых амплитуд ПВ ВПСТ сразу после деполяризации (временная точка 2) нормированных к уровню до стимуляции (временная точка 1). Во вкладках над графиками А и Б показаны последние ПВ ВПСТ до стимуляции (1) и первая ПВ ВПСТ после стимуляции (2). Количество (n) исследованных КП и животных (КП/животные) указано на графиках в скобках. Звёздочки показывают статистически значимые отличия в сравнении с соответствующей контрольной группой, полученные с помощью непарного критерия Стьюдента, ** $p < 0.01$

Для описания возрастной зависимости функциональных нарушений mGluR сигнализации в синапсах ПВ-КП СЦА1 модельных B05 мышей, мы исследовали SSE в 3, 5 и 12 недель жизни. У животных дикого типа SSE не отличалось. Такие же показатели были достигнуты при исследовании СЦА1 B05 трансгенных животных в возрасте 3 недель (Рисунок 4, чёрные и голубые линии, $n = 10$). В более зрелом возрасте (5 и 12 недель) СЦА1 B05 трансгенные мыши показали прогрессирующее нарушение SSE (нормированные амплитуды первых ВПСТ после ПВ стимуляции: в возрасте 5 недель, $47.2 \pm 12.6\%$, $n=10$; 12 недель, $83.2 \pm 11.1\%$, $n = 10$; $p < 0.001$; возрастной эффект, $p < 0.05$; взаимодействие, $p < 0.005$) со значительным сокращением продолжительности депрессии ВПСТ (Рисунок 4А, Б).

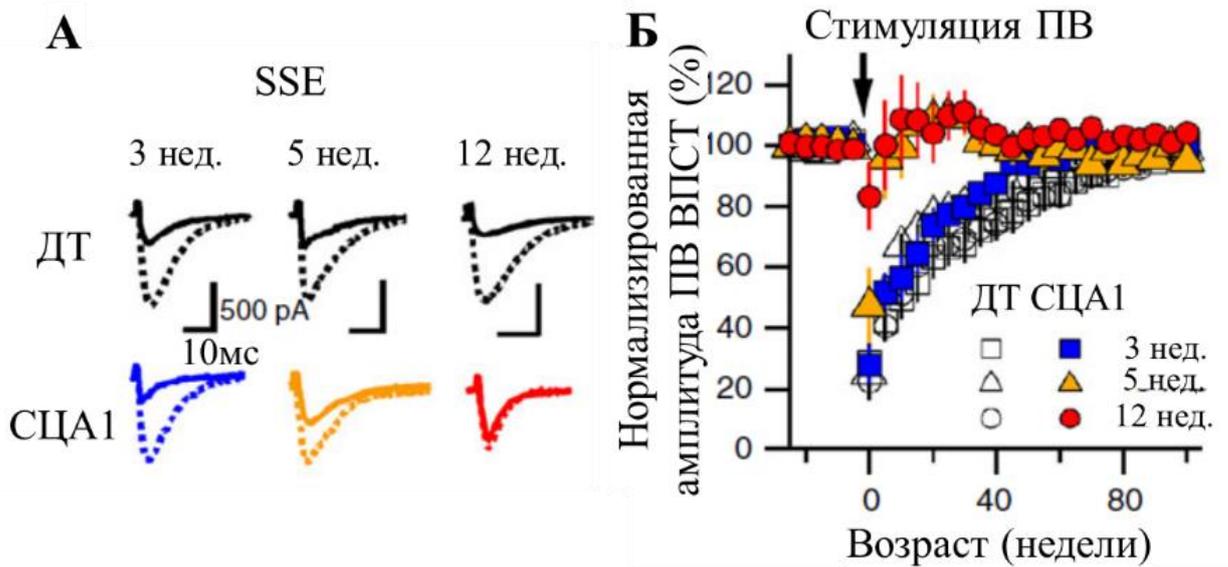


Рисунок 4. Прогрессирующее mGluR1-опосредованное нарушение синаптической пластичности в ПВ-ВПСТ синапсах у СЦА1 В05 трансгенных мышей. (А) быстрые ПВ ВПСТ до (пунктирные линии) и после (непрерывные линии) индукции SSE – 1я ВПСТ после стимула. (Б) Изменение нормированных к контролю амплитуд ПВ ВПСТ во времени после индукции (показано стрелкой) синаптической пластичности.

Долговременная депрессия (LTD) в синапсах ПВ-КП является одной из форм синаптической пластичности мозжечка. Этот тип LTD требует постсинаптической передачи сигналов mGluR1 в КП. Мы рассмотрели его на трёх наших моделях. После 30 мин индукции LTD нормализованные амплитуды ПВ ВПСТ снижались в КП СЦА1 KI животных с $67,3 \pm 4,2\%$ ($n = 7$ от 3 мышей) до $88,9 \pm 6,2\%$ ($n = 6$ от 3 мышей, $p = 0,013$; Рисунок 5).

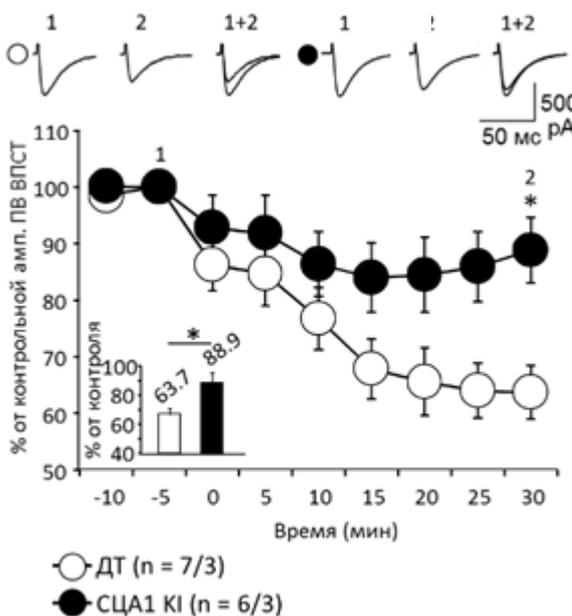


Рисунок 5. Нарушение LTD в синапсах ПВ-КП в модели СЦА1 KI. Средняя временная диаграмма амплитуд ПВ ВПСТ до и после индукции LTD. Амплитуды ПВ-ВПСТ нормировали к значениям до индукции LTD. Количество (n) исследованных КП и животных (КП/животные) указано на графике. Репрезентативные кривые ПВ ВПСТ показаны над диаграммой. Временные точки: до (1) и через 30 мин после (2) индукции LTD. Усреднённые амплитуды ПВ ВПСТ через 30 мин после индукции LTD показаны на вставках. Звездочка указывает на статистически значимое различие по сравнению с соответствующими контролями (t-критерий Стьюдента; * $p < 0,05$).

Спустя 8 недель после инъекции LVV MSCV-ATXN1[Q76]-GFP в кору мозжечка, LTD также было нарушено по сравнению с контрольной группой ($p < 0.005$ и $p < 0.005$, соответственно) (Рисунок 6).

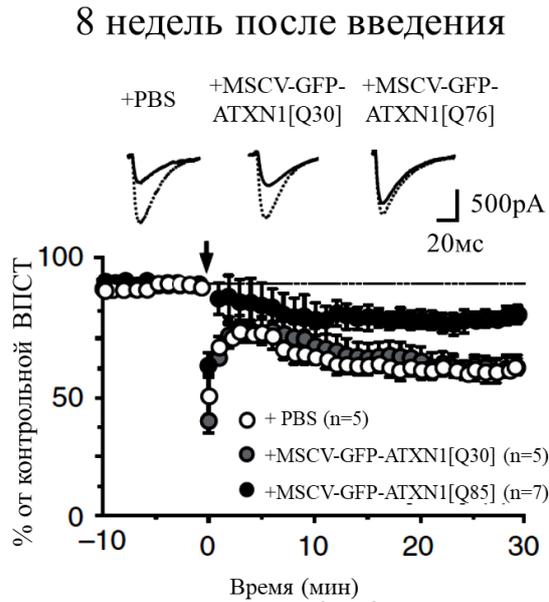


Рисунок 6. Нарушение mGluR-опосредованных процессов – LTD в ВП-КП синапсах мышей экспрессирующих трансгенный патологический атаксин 1. (А) Репрезентативные кривые AMPA опосредованных быстрых ПВ ВПСТ до и после mGluR-опосредованной индукции LTD (ВПСТ спустя 30 минут после инициации) у животных через 8 недели после введения LVV MSCV-ATXN1[Q30]-GFP или LVV MSCV-ATXN1[Q76]-GFP. (Б) Усреднённые данные быстрых амплитуд ПВ ВПСТ, нормированных к изолинии до и после инициации LTD во время 0 (показано стрелками)

LTD у СЦА1 В05 трансгенных мышей в возрасте 3 недель (нормированные амплитуды ПВ ВПСТ после 30 мин после индукции: $71.1 \pm 7.5\%$, $n = 5$ КП от 5 мышей). Данный уровень LTD был замечен у мышей дикого типа (в возрасте 3 недель, $67.7 \pm 3.6\%$, $n = 5$ КП от 5 мышей; 5 недель, $65.9 \pm 2.8\%$, $n = 5$ КП от 5 мышей; 12 недель, $69.4 \pm 6.8\%$, $n = 5$ КП от 5 мышей) (Рисунок 7). В противовес этому, в возрасте 5- и 12-недель СЦА1 В05 трансгенные мыши показывали нарушение LTD (Рисунок 7; нормированные амплитуды ПВ ВПСТ после 30 мин после индукции: в возрасте 5 недель, $96.7 \pm 3.0\%$, $n = 5$ КП от 5 мышей; 12 недель, $97.7 \pm 4.0\%$, $n = 8$ КП от 7 мышей; эффект генотипа, $p < 0.0001$; возрастной эффект, $p < 0.05$; взаимодействие, $p < 0.05$).

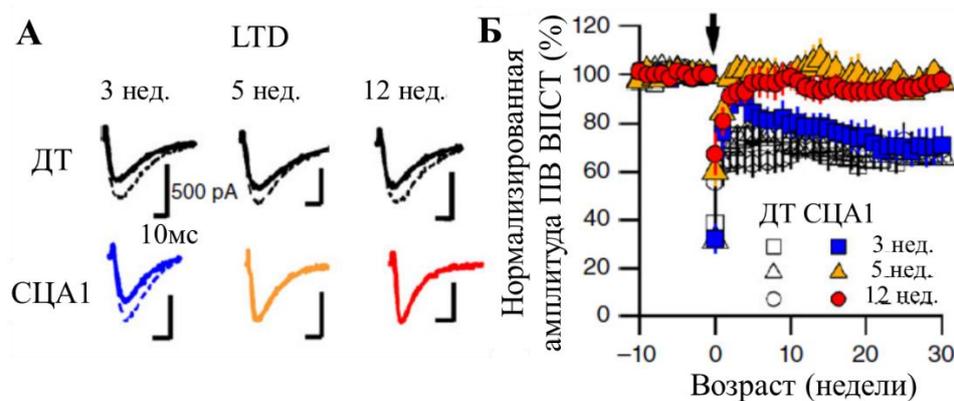


Рисунок 7. Прогрессирующее mGluR1-опосредованное нарушение LTD в ПВ-КП синапсах у СЦА1 В05 трансгенных мышей. Верхняя и средняя часть, кривые быстрых ПВ ВПСТ до (пунктирные линии) и после (непрерывные линии) индукции LTD; ВПСТ 30 мин после стимуляции). Нижние графики показывают изменение нормированных к контролю амплитуд ПВ ВПСТ во времени после индукции (показано стрелкой) LTD.

Нижние графики показывают изменение нормированных к контролю амплитуд ПВ ВПСТ во времени после индукции (показано стрелкой) LTD.

Вместе эти результаты показывают, что СЦА1 модельные мыши в продвинутой стадии заболевания имеют нарушение mGluR пути передачи сигналов, что вызывает уменьшение амплитуд медленных ВПСТ и подавление SSE и LTD в ПВ-КП синапсах.

Влияние ГБ на патогенез СЦА1. Нейродегенеративные заболевания, такие как спиноцереbellарные атаксии, вызывают патологическую трансформацию ГБ, проявляющуюся нарушением поглощения глутамата из ПВ-КП синапсов, что приводит к перераздражению NMDA рецепторов, избыточному входу Ca^{2+} и запускает апоптоз и гибель КП. EAAT1 (Slc1A3) и EAAT2 (Slc1A2) являются основными переносчиками глутамата в глии. В мозжечке доминирует EAAT1 (Lee et al., 2014), что подтверждается и нашими результатами (Рисунок 8).

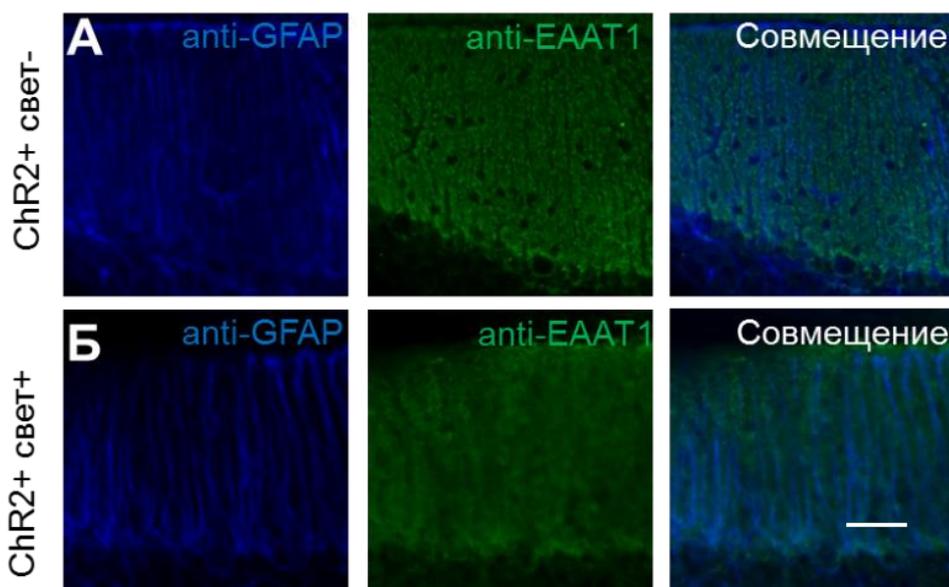


Рисунок 8. Хроническая фотостимуляция ГБChR2 приводит к уменьшению экспрессии EAAT1. А-Б. Конфокальные изображения отростков ГБChR2, меченых анти-GFAP (голубой) и анти-EAAT1 (зелёный). 4-х дневная фотостимуляция уменьшает интенсивность анти-EAAT1 свечения. Мерная шкала – 50 μ m. Иммунореактивность EAAT1 была резко снижена в ГБ через 4 дня после фотостимуляции. Количество EAAT1-иммунопозитивных элементов снижено на всем протяжении отростков ГБ. В дистальной части МС этот показатель снижался с $31,8 \pm 2,3$ до $16,5 \pm 1,8$ на $25 \mu m^2$ (Рисунок 9). Таким образом, длительная фотостимуляция ГБ^{ChR2}, приводит к снижению экспрессии EAAT1.

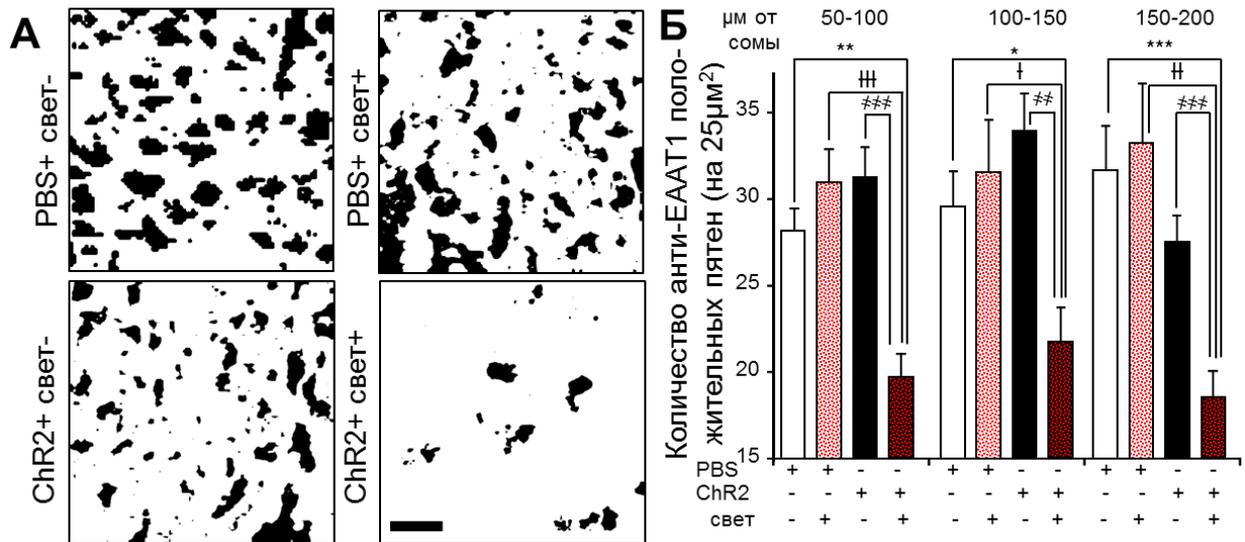


Рисунок 9. Хроническая фотостимуляция ГБ^{Chr2} приводит к количественному уменьшению экспрессии EAAT1. А. Контрастированные пятна анти-EAAT1-меченых зон. Изображения содержат обработанные программой ImageJ анти-EAAT1 флуоресцентные сигналы. Б. Усреднённые графики показывают количество анти-EAAT1 положительных пятен на 25μm² МС. * p <0.05; ** p <0.01; *** p <0.001; † p <0.05; †† p <0.01; ††† p <0.001; # p <0.01; ## p <0.001; ### p <0.001.

Иммунореактивность EAAT1 была снижена в ГБ, трансдуцированной ATXN1 [Q85] по сравнению с трансдуцированными ATXN1 [Q2] животными (Рисунок 10).

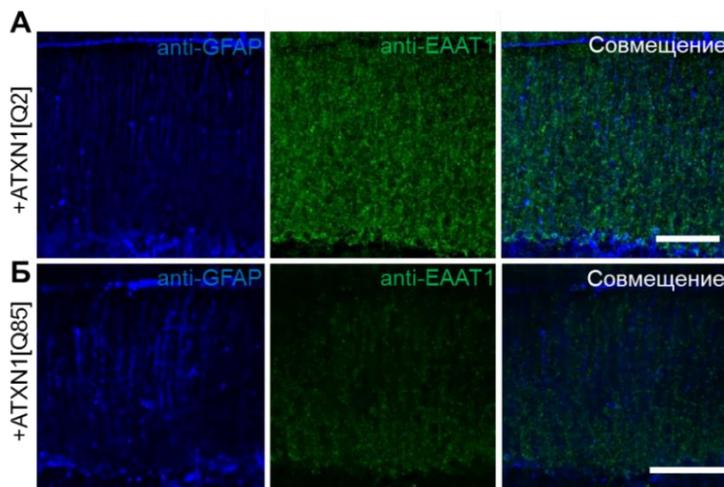


Рисунок 10. ATXN1[Q85] в ГБ приводит к качественному подавлению экспрессии EAAT1. А. Конфокальные изображения отростков ГБ^{ATXN1[Q2]} и Б. ГБ^{ATXN1[Q85]}, помеченных антителами к GFAP (синий) и к EAAT1 (зеленый). Мерная шкала 100 μm.

У данных животных общее количество анти-EAAT1-позитивных пятен уменьшилось на всём протяжении МС, более всего в дистальной его части с 26,5±1,0 до 17,3±1,1 на 25μm², p = 0,0008 (Рисунок 11 А и В).

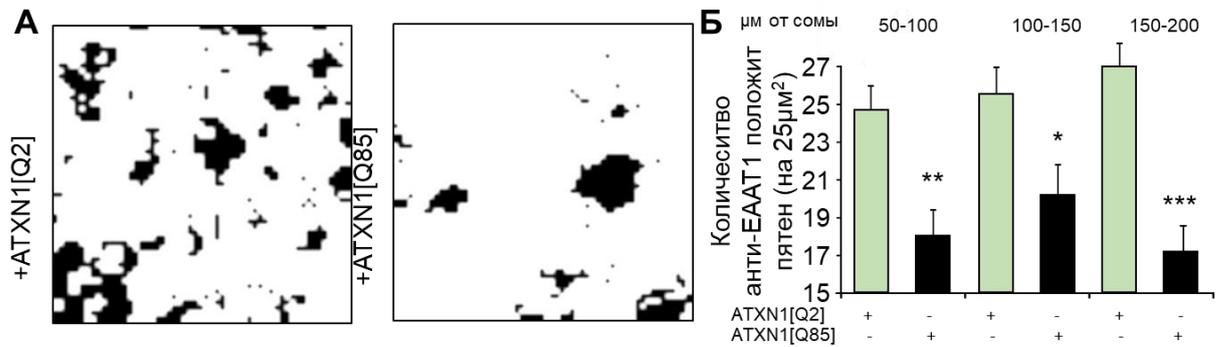


Рисунок 11. Экспрессия ATNX1[Q85] в ГБ приводит к подавлению экспрессии EAAT1. А. Контрастированные пятна анти-EAAT1-меченых зон. Изображения содержат обработанные программой ImageJ анти-EAAT1 флуоресцентные сигналы. Б. Усреднённые графики показывают количество анти-EAAT1 положительных пятен на 25μm² МС. * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001.

Эти результаты демонстрируют, что снижение экспрессии EAAT1 являются отличительными чертами дегенерации мозжечка в моделях СЦА1, вызванной воздействиями, специально направленными на ГБ, включая экспрессию ATXN[Q85] и оптогенетическую гиперактивацию ГБ.

Мы исследовали морфологию КП с помощью ИГХ и их электрофизиологические свойства с помощью пэтч-клэмп. Чтобы оценить длину апикальных дендритов КП, их визуализировали с помощью окрашивания анти-кальбиндином. Толщину молекулярного слоя (МС) измеряли, как описано ранее (Belozor et al., 2019). МС был значительно тоньше у животных после 4 суточной фотостимуляции ГБ по сравнению с нестимулированной группой p = 0,005 (Таблица 2). Количество КП также было снижено, p = 0,007 (Таблица 2). Никаких различий не было обнаружено в морфологии КП у мышей, получавших PBS со световой стимуляцией или без нее (Таблица 2).

Таблица 2. Морфология КП.

Группы	Толщина МС	Количество КП
+PBS (свет-) (n=14/5)	170,2±5,8	8,4±0,5
+PBS (свет+)	176,9±4,1	9,3±0,4
+GFAP-ChR2-mKate (свет-) (n=16/7)	165,4±6,9	8,4±0,5
+GFAP-ChR2-mKate (свет+) (n=15/7)	139,3±5,0	6,4±0,3

Significance markers: *** p < 0,001; ††† p < 0,001; †† p < 0,01; † p < 0,05; # p < 0,05; ## p < 0,01; ### p < 0,001.

Среднее число КП, меченых кальбиндином, и длина их дендритов (толщина МС) представлены в таблице. Количество КП подсчитывали на 100 μm продольной линии в СКП. ***p < 0,001; †††p < 0,001; †† p < 0,01; † p < 0,05; # p < 0,05; ## p < 0,01; ### p < 0,001.

Ёмкость клетки является косвенным показателем площади поверхности клеточной мембраны. Как и ожидалось, после хронической фотоактивации ёмкость КП у фотостимулированных животных снизилась с $728,8 \pm 27,6$ pF ($n = 24/9$) до $526,2 \pm 27,8$ pF ($n = 15/7$), $p = 0,00002$. (Таблица 3).

Таблица 3. Основные пассивные электрофизиологические свойства и быстрые ПВ ВПСТ в КП у мышей, которым вводили PBS и AVV GFAP-ChR2-mKate с хронической фотостимуляцией или без нее.

Группы	Ёмкость (pF)	Ra (MΩ)	Rm (MΩ)
+PBS (свет-) (n=14/5)	766,2±49,1	13,7±1,1	193,0±30,8
+GFAP-ChR2-mKate (свет-) (n=24/9)	728,8±27,6***	13,8±0,9	241,8±58,4
+GFAP-ChR2-mKate (свет+) (n=15/7)	526,2±27,8†††	13,8±0,7	260,5±36,1

ПВ ВПСТ анализировали в отношении их кинетики (время нарастания 10%-90% и постоянная времени спада) и амплитуд. Парное импульсное усиление (PPF) анализировали по ответам, вызываемым двумя стимулами с межстимульным интервалом 50 мс. Соотношения PPF измеряли как вторую амплитуду ВПСТ, нормализованную к первой. Двухфакторный дисперсионный анализ указывает на достоверное влияние фотостимуляции только на ёмкость. n – число клеток/количество животных, *** $p < 0,001$; ††† $p < 0,001$.

Для понимания схожих патоморфологических изменений в КП мы провели окрашивание кальбиндином срезов мозжечка двух моделей животных – векторной с селективной экспрессией мутантного атаксина 1 в ГБ и СЦА1 KI модели (Рисунок 12А и Б). Опосредованная LVV экспрессия атаксин 1[Q85] избирательно в ГБ уменьшала толщину молекулярного слоя (МС) с $178,4 \pm 3,2$ мкм ($n = 23$ от 4 животных) до $161,7 \pm 2,2$ мкм ($n = 23$ от 4 животных, $p = 0,0001$; Рисунок 12В) за счет коллапса дендритов КП. У мышей СЦА1 KI толщина МС уменьшилась со $174,8 \pm 4,5$ мкм ($n=11$ от 3 животных) до $144,0 \pm 2,2$ мкм ($n=14$ от 3 животных) соответственно, $p=2,1 \times 10^{-5}$ (Рисунок 12Д). Эти морфологические изменения соответствовали падению ёмкости мембраны, выявленному при измерении ёмкости мембраны КП (C_m) в срезах мозжечка с помощью пэтч-клэмп, которая была значительно снижена как у мышей LVV, так и у мышей СЦА1 KI ($p = 0,002$ и $p = 0,0012$, соответственно, Рисунок 12Г и Е).

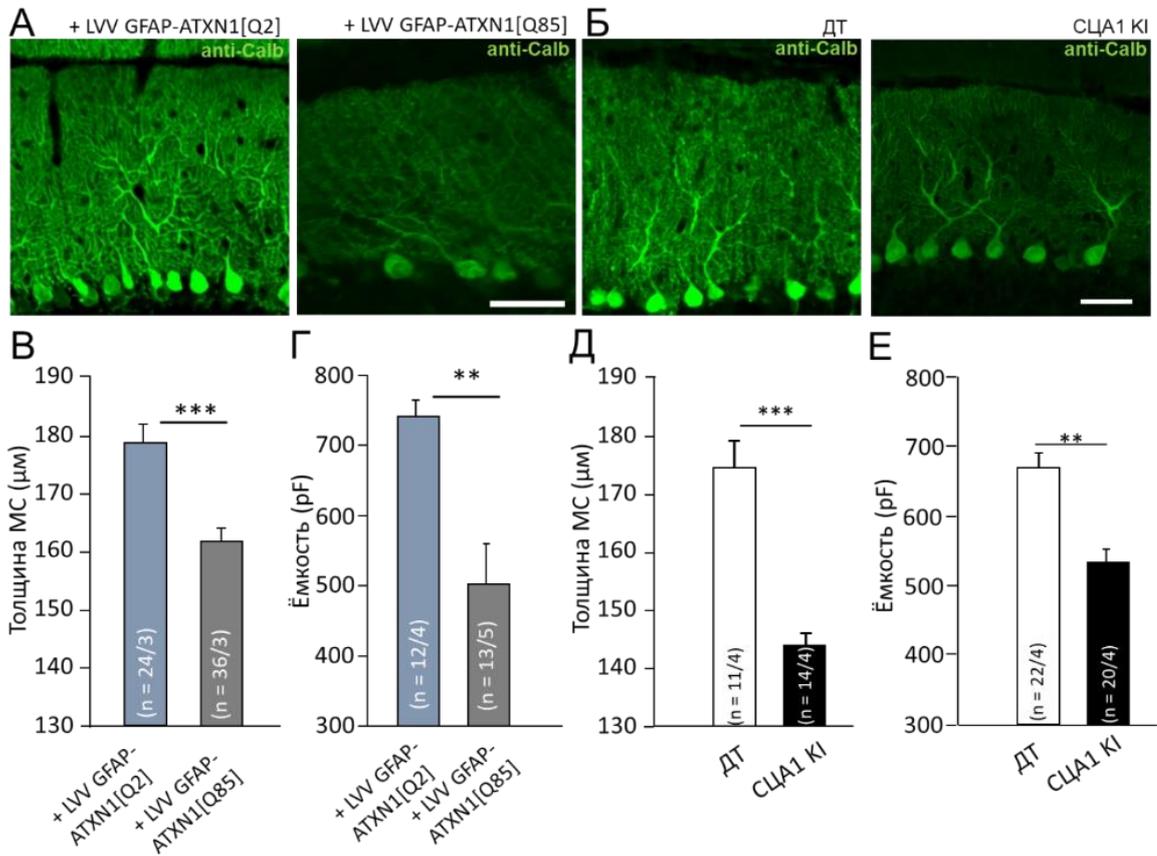


Рисунок 12. Мутантный атаксин 1 вызывает изменения в морфологии КП у модельных СЦА1 мышей. (А-Б) Конфокальные изображения коры мозжечка, меченные анти-Кальбиндином (анти-Calb) (маркер КП), показывают коллапс молекулярного слоя (МС) у мышей, которые избирательно экспрессируют атаксин 1 [Q85] в ГБ (А) и СЦА1 К1 (Б). Мерная шкала 50 µm. Средняя (В) длина МС и (Г) емкость КП снижены у мышей, которые избирательно экспрессируют атаксин 1 [Q85] в ГБ и у СЦА1 К1 мышей (Д и Е). В скобках указано количество (n) исследованных срезов или КП и животных (срезы/животные) или (КП/животные). Звездочки указывают на статистически значимое различие по сравнению с соответствующими контролями (критерий Стьюдента; ** p < 0,01; *** p < 0,001).

Долговременная депрессия (LTD) в синапсах ПВ-КП является также была нарушена у животных с селективным поражением астроглии. После 30 мин индукции LTD нормализованные амплитуды ПВ ВПСТ снижались в КП животных, трансдуцированных LVV GFAP-ATXN1[Q85]-Flag, с $56,2 \pm 5,4\%$ (n = 5 из 3 животных) до $80,1 \pm 4,8\%$ (n = 5 от 3 животных, p = 0,026, Рисунок 13).

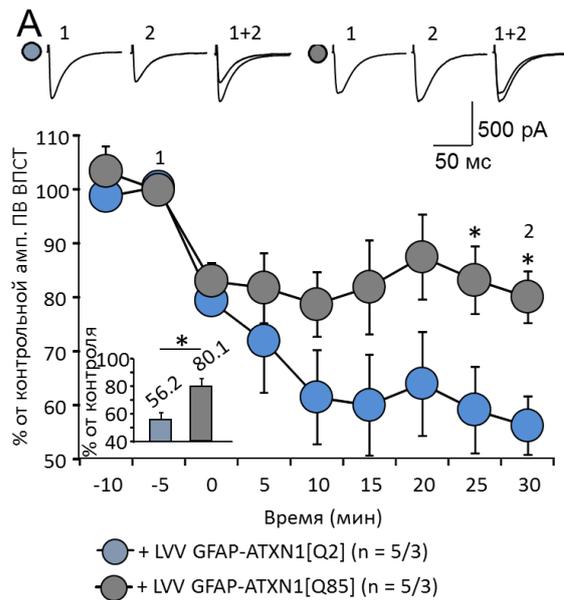


Рисунок 13. Нарушение LTD в синапсах ПВ-КП в модели селективного астроглиоза. Показана средняя временная диаграмма амплитуд ПВ ВПСТ до и после индукции LTD у мышей, которые избирательно экспрессируют атаксин 1 [Q85] в ГБ. Амплитуды ПВ-ВПСТ нормировали к значениям до индукции LTD. Количество (n) исследованных КП и животных (КП/животные) указано на графике. Репрезентативные кривые ПВ ВПСТ показаны над диаграммой. Временные точки: до (1) и через 30 мин после (2) индукции LTD. Усреднённые амплитуды ПВ ВПСТ через 30 мин после

индукции LTD показаны на вставках. В обеих моделях LTD был уменьшен. Звездочка указывает на статистически значимое различие по сравнению с соответствующими контролями (t-критерий Стьюдента; * $p < 0,05$).

Таргетная доставка генов. Вирусные векторы являются наиболее исследованными и перспективными частицами для генной терапии болезней головного мозга. Lentiviral и аденовирусные векторы (LVV и AAV) обладают длительной экспрессией и могут нести относительно длинную генетическую последовательность. Учитывая этот факт, мы использовали генотерапию для усиления деградации и клиренса патологического полиглутаминового мутантного белка. Для этого был создан AAV MSCV-GFP-P2A-CRAG экспрессирующий CRAG (collapsin response mediator protein-associated molecule associated guanosine triphosphatase), молекулу, которая усиливает деградацию белков через убиквитин протеасомный путь (Qin et al., 2006). В этой конструкции был использован AAV 9 типа, который проникает через ГЭБ. Это позволило вводить данную конструкцию в вену новорожденным мышатам и доставлять её в головной мозг. Мы использовали универсальную модель полиглутаминовых атаксий и трансгенную СЦА1 модель для коррекции общих нарушений mGluR1 сигнализации.

AAV9-опосредованная экспрессия CRAG в КП PolyQ трансгенных мышей значительно увеличивала их ёмкость в 1,5-раза со $174,2 \pm 12,6$ pF (n = 27 КП от 4 мышей) до $262,1 \pm 16,0$ pF (n = 28 КП от 4 мышей) ($p < 0.01$). В неэкспрессирующих областях тех же животных данный показатель составил $155,7 \pm 9,5$ pF (n = 7 клеток от 3 мышей) ($\dagger \dagger p < 0.01$) (Рисунок 14А). В действительности иммуноокрашивание биоцитином КП через фиксирующую пипетку выявило значительное их увеличение и усиление ветвления дендритов в области, экспрессирующей CRAG по сравнению с неэкспрессирующей областью (Рисунок 14Б).

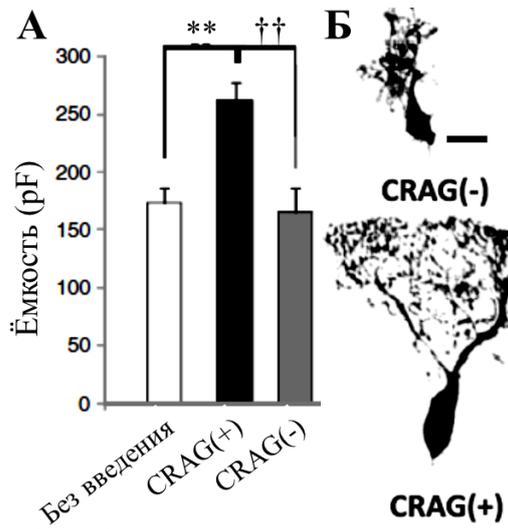


Рисунок 14. Усиление ветвления дендритов у CRAG-экспрессирующих КП PolyQ трансгенных мышей. А График показывает усреднённые показатели ёмкости мембраны КП от мышей без введения генетической конструкции, и после введения AAV MSCV-GFP-P2A-CRAG в зонах, экспрессирующих (CRAG (+)) и не экспрессирующих CRAG (CRAG(-)). Мерная шкала, 20 μ m. Звёздочки и кресты показывают статистически значимые отличия, выявленные с помощью однофакторного дисперсионного анализа после апостериорного теста Тьюки, ** $p < 0.01$, †† $p < 0.01$

КП PolyQ трансгенных животных, экспрессирующих CRAG, показывали восстановление SSE в ПВ синапсах (Рисунок 15). Амплитуды ПВ ВПСТ в КП, не экспрессирующих CRAG, повышались до $102,1 \pm 12,7\%$ ($n = 10$ клеток от 3 животных) от контрольного уровня через 5с после тетанус-стимуляции, что указывает на выраженное повреждение mGluR сигнального пути, вызываемого SSE. Амплитуды ПВ ВПСТ в КП, экспрессирующих CRAG, уменьшались до $36,9 \pm 8,3\%$, ($n = 5$ клеток от 3 животных) ($p < 0.05$) от контрольного уровня через 5с после тетанус стимуляции (Рисунок 15), что показывает восстановление SSE. Однако наблюдалось более быстрое восстановление (примерно за 20с) в сравнении с КП дикого типа (примерно за 60с) (Рисунок 15).

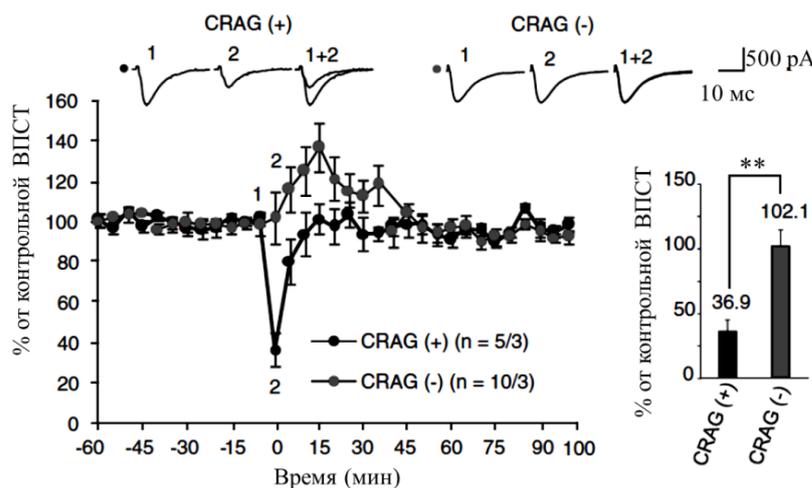


Рисунок 15. Уменьшение количества мутантного полиглутаминового белка в КП PolyQ трансгенных мышей восстанавливает GluR-опосредованную SSE в ПВ-КП синапсах. ПВ ВПСТ записывались от КП экспрессирующих (CRAG (+)) и не экспрессирующих CRAG (CRAG (-)). Динамика изменения амплитуд ПВ ВПСТ до и

после тетанус-стимуляции (слева) и процент уменьшения данной амплитуды сразу после тетанус-стимуляции в сравнении с контрольным уровнем (справа). Во вкладке показаны репрезентативные кривые последней ПВ ВПСТ контроля до стимуляции (1) и первая ПВ ВПСТ после стимуляции (2). Количество (n) исследованных КП и животных (КП/животные) показано на графиках. Звёздочки показывают статистически значимые отличия в сравнении с контрольной группой CRAG-экспрессирующих животных, выявленные с помощью критерия Стьюдента для двух независимых выборок, ** $p < 0.01$

Мы исследовали влияние CRAG на восстановление mGluR сигнального пути у СЦА1 B05 трансгенных животных. Внутривенное введение AAV MSCV-GFP-P2A-CRAG имело тот же паттерн распределения, что и в мозжечке PolyQ трансгенных мышей. Для сравнения были исследованы CRAG экспрессирующие (CRAG(+)) и CRAG неэкспрессирующие (CRAG(-)) области мозжечка. Нарушения SSE у СЦА1 B05 CRAG(-) трансгенных мышей были менее выражены, чем у PolyQ модельных животных. После тетанус стимуляции амплитуда ПВ ВПСТ снижалась до $72,4 \pm 12,9\%$ относительно контрольных значений и быстро возвращалась до престимуляционных значений уже к 20 секунде записи SSE. В это время данный параметр составлял $98,8 \pm 9,3\%$ относительно контрольных значений. КП экспрессирующие CRAG, показывали восстановление SSE и в этот временной промежуток амплитуда ПВ ВПСТ составляла $71,9 \pm 8,2\%$ относительно контрольных значений ($p < 0,05$) (Рисунок 16).

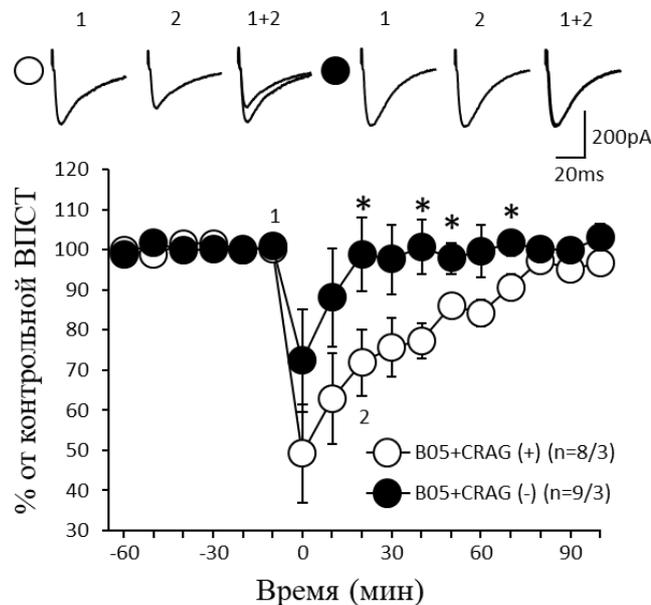


Рисунок 16. Уменьшение количества мутантного атаксина 1 в КП трансгенных СЦА1 B05 мышей восстанавливает GluR-опосредованную SSE в ПВ-КП синапсах. ПВ ВПСТ записывались от КП экспрессирующих (CRAG (+)) и не экспрессирующих CRAG (CRAG (-)). Динамика изменения амплитуд ПВ ВПСТ до и после тетанус-стимуляции. Во вкладке А и Б показаны репрезентативные кривые последней ПВ ВПСТ контрольная до стимуляции (1) и ПВ ВПСТ через полминуты после стимуляции (2). Количество (n) исследованных КП и животных (КП/животные) показано на графиках. Звёздочки показывают статистически значимые отличия в сравнении с контрольной группой CRAG-экспрессирующих животных, выявленные с помощью критерия Стьюдента для двух независимых выборок, * $p < 0,05$

Эти результаты показывают, что CRAG является универсальной молекулой для полиглутаминовых заболеваний и может успешно восстановить морфологию КП и mGluR-опосредованную кратковременную синаптическую пластичность.

Терапия стволовыми клетками

Мезенхимальные стволовые клетки (МСК) используются в экспериментах на моделях нейродегенерации в силу их высокой потенциальной пользы в лечении данных состояний. МСК – это мультипотентные клетки предшественники, которые дифференцируются в мезенхимальную линию клеток, такие как остеобласты, адипоциты и хондроциты (Mazzini et al., 2010). Мы выбрали интратекальное введение, так как этот путь минимально повреждает нервную ткань и может быть легко использован для введения больным. МСК были мечены GFP с помощью LVV MSCV-GFP. Мы предположили, что введение МСК СЦА1 В05 трансгенным мышам может частично восстановить у них морфологию КП. Мозжечок СЦА1 В05 трансгенных мышей имеет неправильное расположение тел КП, что приводит к нарушению СКП. Примечательно то, что после введения MCS наблюдалось восстановление СКП и толщины МС (Рисунок 17 А и Б). Толщина МС косвенно показывает длину дендритов КП. В действительности, после инъекции биоцитина в тело КП для визуализации его структуры, большинство дендритов КП у СЦА1 В05 трансгенных животных были короче и менее разветвлены, чем у животных ДТ (Рисунок 17В). Эти наблюдения были подтверждены количественным анализом областей, занятых отдельной КП (Рисунок 17Г). КП от животных дикого типа имели площадь $180,4 \pm 12 \mu\text{m}^2$ (n = 11 клеток), тогда как КП СЦА1 В05 трансгенных животных имели площадь $43,2 \pm 7 \mu\text{m}^2$ (n = 9 клеток, p < 0.001). После введения МСК, у СЦА1 В05 трансгенных животных наблюдалось значительное восстановление площади дендритов до $105,6 \pm 11$, (n = 13 клеток), p < 0.001 (Рисунок 17Г). Более детальный морфологический анализ выявил уменьшение количества шипиков дендритов КП у СЦА1 В05 трансгенных животных. На 10 μm длины дендрита у данных животных составило 27.2 ± 0.5 против 36.1 ± 0.6 у животных дикого типа, p < 0.001 (n = 35 областей). После введения МСКs наблюдалось значительное увеличение количества шипиков у СЦА1 В05 трансгенных мышей до 32.1 ± 0.9 , p < 0.001; Рисунок 17Д и Е).

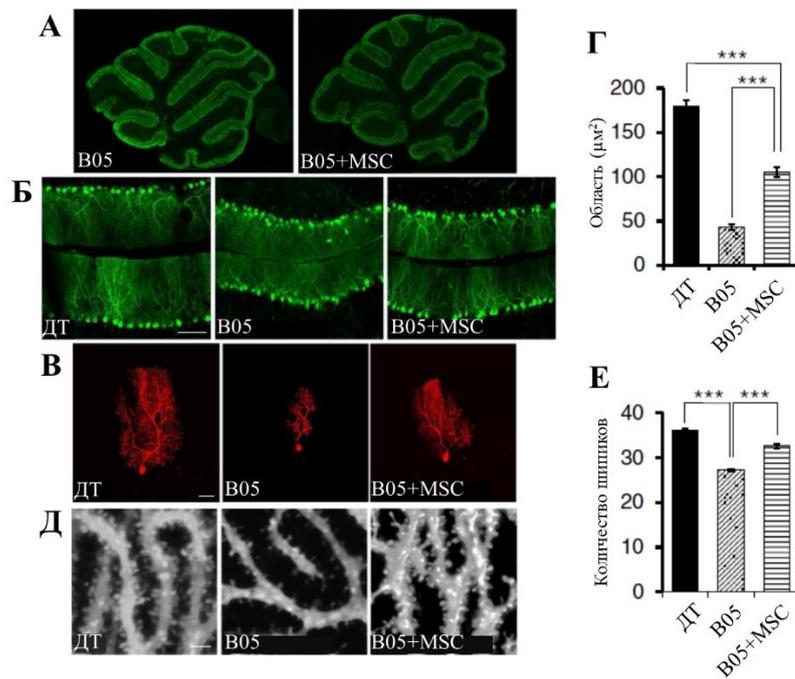


Рисунок 17. Инtrateкальное введение МСК улучшает морфологию мозжечка у СЦА1 В05 трансгенных мышей. Малое (А) и большое (Б) разрешение конфокальных изображений после окраски анти-кальбиндином, от мышей ДТ и СЦА1 В05 трансгенных мышей без введения и после введения МСК. Морфология индивидуальных КП ДТ СЦА1 В05 трансгенных мышей без введения и после введения МСК (В, Г). В Репрезентативные изображения биоцитин-меченых КП. Г Усреднённая общая область дендритов КП. Д Микрофотографии шипиков дендритов отдельных КП. Е Среднее общее количество шипиков дендритов на 10 $\mu\text{м}$ их длины. Звёздочки показывают статистически значимые различия, выявленные с помощью однофакторного дисперсионного анализа, после коррекции апостериорного теста Тьюки, $***p < 0.001$. Мерные шкалы 100 $\mu\text{м}$ (Б), 50 $\mu\text{м}$ (В) и 2 $\mu\text{м}$ (Д)

Мы предположили, что положительный эффект от введения МСКs может быть связан с увеличением mGluR1 зависимого молекулярного пути в КП СЦА1 В05 трансгенных животных. Для этого мы исследовали mGluR-опосредованную кратковременную пластичность SSE. В КП животных дикого типа стимуляция ПВ уменьшала амплитуду ПВ ВПСТ на треть до 32.5 ± 8.8 % от контрольных значений с постепенным восстановлением в течении 55-60 сек. В КП СЦА1 трансгенных В05 животных SSE было значительно нарушено, и амплитуда ПВ ВПСТ после стимуляции уменьшалась лишь до 74.3 ± 10.6 % от контрольных значений с последующим её увеличением в течение 50 сек, $p < 0.01$. Однако в КП СЦА1 В05 трансгенных животных после введения МСК наблюдалось частичное восстановление SSE. После стимуляции амплитуда ПВ ВПСТ уменьшалась до $69.1 \pm 8.8\%$ относительно контрольных значений с последующим медленным восстановлением в течение 60 сек, $p < 0.01$ (Рисунок 18А и Б).

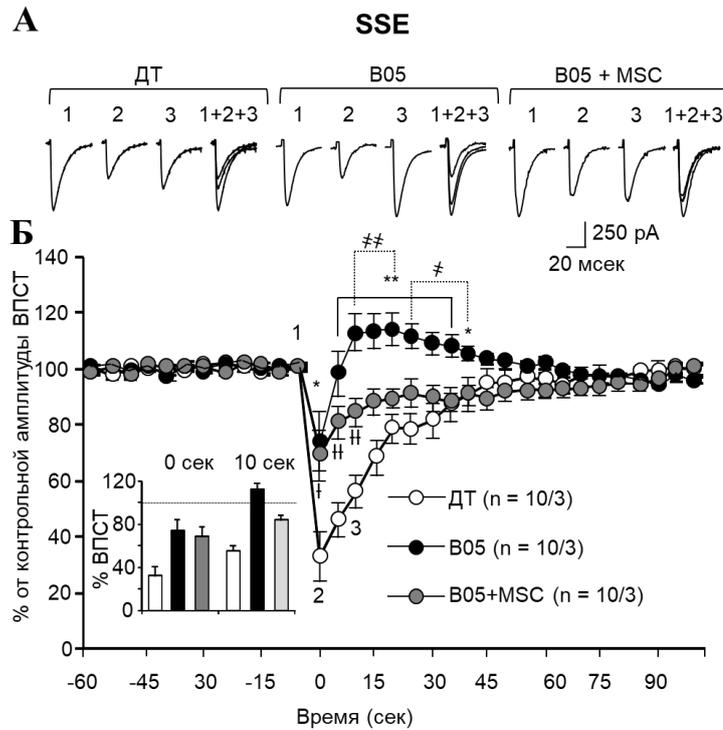


Рисунок 18. Частичное восстановление SSE у СЦА1 В05 трансгенных животных после введения МСК. ПВ ВПСТ записывались каждые 5 сек. (А) Репрезентативные кривые ПВ ВПСТ до стимуляции ПВ (временная точка 1), сразу (временная точка 2) и через 10 сек после стимуляции (временная точка 3) в КП животных дикого типа (ДТ), СЦА1 В05 трансгенных животных без введения и после введения МСК. (Б) Динамика изменения амплитуд ПВ ВПСТ до и после стимуляции ПВ. Во вкладке показаны усреднённые амплитуды ПВ ВПСТ сразу (0 сек) и через 10 сек после стимуляции ПВ, нормированные к достимуляционным значениям. Количество клеток и животных показано в скобках (КП/животные). Звёздочки и кресты показывают статистически значимые различия, выявленных с помощью однофакторного дисперсионного анализа, после коррекции апостериорного теста Тьюки, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, † $p < 0.05$, †† $p < 0.01$, ‡ $p < 0.05$, ‡‡ $p < 0.05$.

Все вышеописанные положительные эффекты от введения МСК приводили к улучшению двигательных навыков у СЦА1 В05 трансгенных мышей, выявленных с помощью вращающейся дорожки. В режиме ускорения данные животные улучшали свои навыки с 11 до 20 недели жизни (Рисунок 19) и отличались от СЦА1 В05 трансгенных мышей без введения МСК. Животные находились на дорожке в течение $208,1 \pm 10,1$ сек, как и животные дикого типа, тогда как последние, только, $120,4 \pm 10,4$ с, $p < 0.01$ (Рисунок 19).

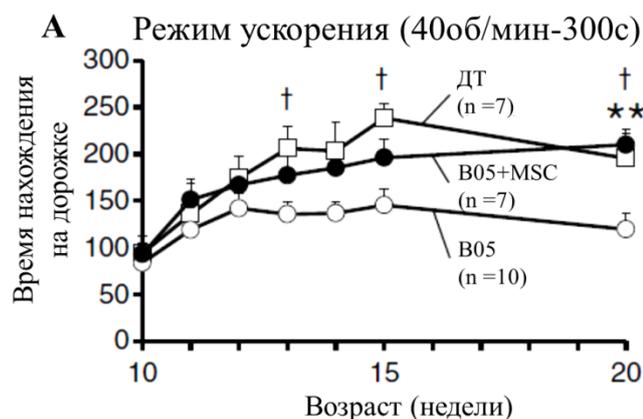


Рисунок 19. Введение МСК улучшает двигательные навыки у СЦА1 В05 трансгенных мышей с помощью вращающейся дорожки. Мыши тренировались в режиме ускорения (4–40 об/мин) (А) и режиме постоянной скорости (20 об/мин) (Б) в возрасте 10, 11, 12, 13, 14, 15 и 20 недель (т.е. через 5, 6, 7, 8, 9, 10 и 15 недель после введения МСК). Количество клеток и животных показано в скобках (КП/животные). Звёздочки и кресты показывают статистически значимые различия, выявленных с помощью однофакторного дисперсионного анализа, после коррекции апостериорного теста Тьюки; * $p < 0.05$ и ** $p < 0.01$ † $p < 0.05$.

Таким образом можно заключить, что мы наблюдали положительный эффект от введения мезенхимальных стволовых клеток непосредственно в мозжечок модельным СЦА1 животным заключается в восстановлении mGluR- пути передачи сигналов в виде восстановления СВ1-опосредованной кратковременной синаптической пластичности. У данных животных значительно уменьшалась атаксия.

Фармакотерапия. На сегодняшний момент быстрое введение в клиническую практику таких сложных методов лечения, как генотерапия и терапия стволовыми клетками, невозможно в силу вышеописанных побочных эффектов. Выбором является терапия фармакологическими препаратами, которые уже существуют в практике для лечения других неврологических состояний. Мы исследовали влияние двух фармакологических препаратов, используемых в повседневной неврологической практике, на фенотип СЦА1 модельных животных.

Баклофен. Использование модуляторного эффекта баклофена, как агониста ГАМК_В рецепторов, на mGluR1 было описано ранее (Tabata et al., 2006), однако никогда не проверялось в отношении патогенеза СЦА1. Мы предположили, что увеличение mGluR сигнализации в мозжечке посредством баклофена может значительно улучшить двигательную координацию у таких модельных животных. Для понимания механизмов улучшения двигательной функции при применении баклофена и связи его с усилением mGluR1 сигнализации у СЦА1 В05 трансгенных мышей, мы проанализировали медленные ВПСТ, SSE и LTD у данных животных. На 7 день после введения баклофена, СЦА1 В05 трансгенные мыши показывали увеличение амплитуд медленных ВПСТ. После введения PBS амплитуда составила 78.4 ± 19.0 pA ($n = 11$, 5 мышей), после введения баклофена

218.8 ± 50.6 pA ($n = 10$, 5 мышей), $P < 0.05$. Данный эффект исчезал через 21 день после введения (Рисунок 20).

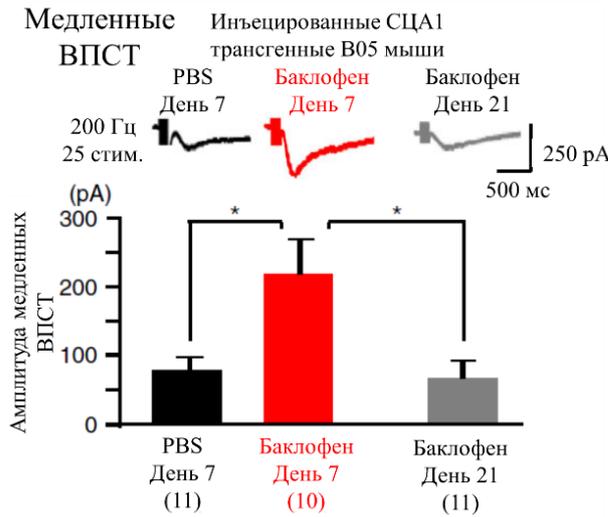


Рисунок 20. Баклофен увеличивает амплитуду медленных ВПСТ в КП СЦА1 В05 трансгенных мышей. Показан график усреднённых амплитуд, полученных от животных на 7 день после введения PBS, а также на 7 и 21 дни после введения (5 nM) баклофена. Различия выявлены с помощью однофакторного дисперсионного анализа, $*p < 0.05$. В верхней части показаны репрезентативные кривые медленных ВПСТ. Каждая группа выделена соответствующим цветом.

Изменения были более выраженные при регистрации SSE. Нормированная амплитуда ПВ ВПСТ через 5 сек после индукции SSE, в контрольной группе составила $96.6 \pm 7.2\%$ ($n = 10$, 5 мышей), после введения баклофена $66.9 \pm 8.0\%$ ($n = 10$, 5 мышей), $P < 0.05$. Данный эффект исчезал через 21 день после введения (Рисунок 21).

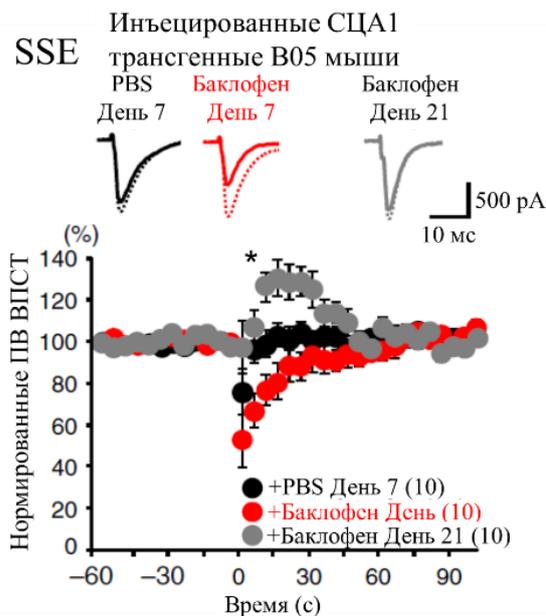


Рисунок 21.

Баклофен усиливает SSE в КП СЦА1 В05 трансгенных мышей. Показан график динамики нормированных амплитуд ПВ ВПСТ, полученных от животных на 7 день после введения PBS и (5 nM) баклофена. Различия выявлены с помощью однофакторного дисперсионного анализа, $*p < 0.05$. В верхней части показаны репрезентативные кривые ПВ ВПСТ. Каждая группа выделена соответствующим цветом.

Также наблюдалось значительное восстановление LTD. Нормированная амплитуда ПВ ВПСТ через 30 мин после индукции LTD у животных после введения PBS составила $103.0 \pm 4.0\%$ ($n = 10$, 5 мышей), после введения баклофена $71.6 \pm 6.2\%$ ($n = 10$, 5 мышей), $P = 0.005$ (Рисунок 22).

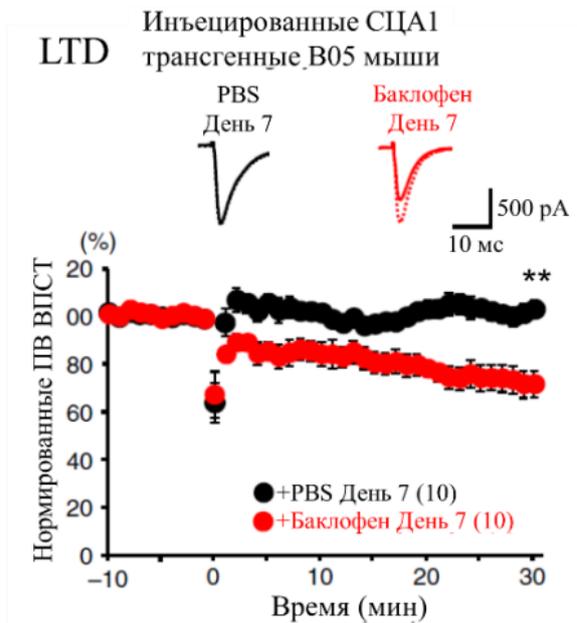


Рисунок 22.

Баклофен усиливает LTD в КП СЦА1 В05 трансгенных мышей. Показан график динамики нормированных амплитуд ПВ ВПСТ, полученных от животных на 7 день после введения PBS и (5 нМ) баклофена. Различия выявлены с помощью t-теста, $*p < 0.05$. В верхней части показаны репрезентативные кривые ПВ ВПСТ. Каждая группа выделена соответствующим цветом.

Однократная инъекция 5 нМ баклофена значительно улучшала двигательную активность в дни 0, 1 и 7 после введения. На 7 день тренировок нахождение на вращающейся дорожке у таких животных увеличилось с $124,8 \pm 7,4$ с ($n = 27$) до $143,1 \pm 4,8$ с ($n = 28$). Эффект исчезал через 2 и 3 недели после инъекции. (Рисунок 23).

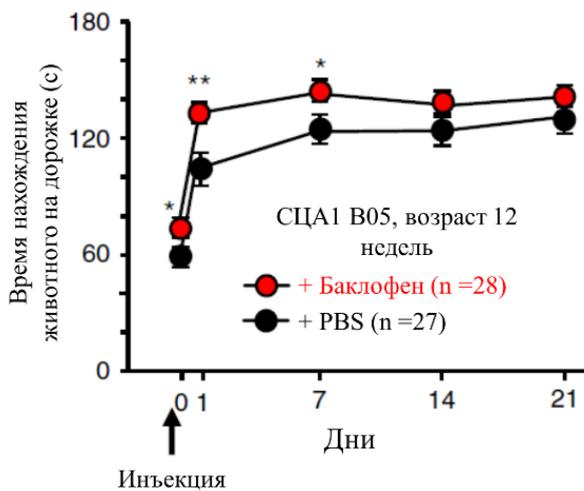


Рисунок 23.

Баклофен улучшает двигательную активность СЦА1 В05 трансгенных мышей. Двигательную активность проверяли с помощью ускоряющего теста на вращающейся дорожке. Баклофен (5 нМ) или PBS вводили в мозжечок 12-недельных мышей СЦА1 В05 трансгенных мышей за 3 ч до теста в день 0 (инъекция). А Размер выборки на 14 и 21 день составил 28 и 27 мышей, соответственно.

Интересен тот факт, что через 21 день после введения эффект исчезал. Вместе эти данные показывают, что баклофен может улучшить двигательную активность у СЦА1 трансгенных мышей, а также восстановить mGluR сигнализацию в ПВ-КП синапсах. Поэтому баклофен может быть полезным фармакологическим средством для улучшения двигательной активности у больных СЦА1. Таким образом мы показали, что баклофен оказывает положительный эффект на синаптическую передачу и пластичность в синапсах клеток Пуркинье у СЦА1 модельных животных. Однократное пероральное введение баклофена уменьшает атаксические проявления у СЦА1 мышей в течение 7 дней.

Мемантин. Мемантин — низкоаффинный потенциалзависимый неконкурентный антагонист NMDA-рецепторов, одобренный для применения при болезни Альцгеймера (Robinson et al., 2006). Блокируя NMDA рецепторы, он предотвращает излишнее поступление катионов внутрь нейронов и развитие эксайтотоксичности. Поэтому потенциально мемантин может быть пригоден для лечения полиглутаминовых СЦА, в том числе и СЦА1. Мы использовали ранее описанную модель астроглиоза и нейродегенерации мозжечка. Через 4 дня после фотостимуляции экспрессия анти-GFAP (астроцитарный маркер) сильно увеличивалось, в то время как экспрессия анти-Кальбиндина (маркер КП) значительно снижалось по сравнению с животными, которых не подвергали фотостимуляции (Рисунок 100А и Б). Мемантин (~90 мг/кг/день) сильно снижал накопление окрашивания/экспрессии анти-GFAP (Рисунок 24В).

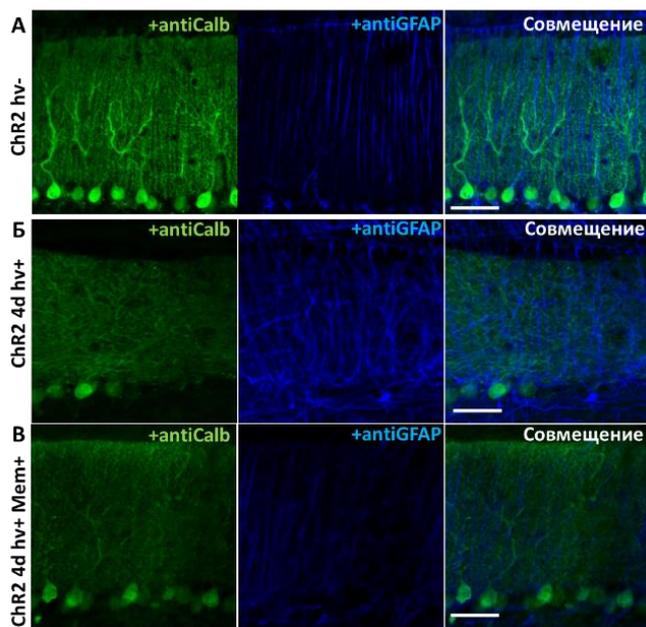


Рисунок 24. Мемантин предотвращает изменения морфологии клеток мозжечка, вызванные хронической фотостимуляцией БГ^{Chr2}. Конфокальные изображения коры мозжечка, меченные антителами к кальбиндину (маркер КП) и антителами к GFAP (маркер ГБ). А. Животные без фотостимуляции (hv-). Б. Животные с хронической фотостимуляцией, не получавшие лечения (hv+). В. Животные с хронической фотостимуляцией (hv+), получавшие мемантин (Mem+). Лечение мемантином предотвращало потерю КП и снижало экспрессию GFAP. Мерная шкала 50 μ m.

Используя метод фиксации потенциала, мы исследовали ёмкость КП, которая напрямую связана с их размером. Средняя ёмкость КП у мышей без фотостимуляции составила $725,1 \pm 39,5$ pF ($n = 8$ клеток от 3 мышей), а фотостимуляция уменьшила её до $494,2 \pm 63,2$ pF ($n = 10$ клеток от 3 мышей; $p = 0,007$; Таблица 4). Мемантин значительно предотвращал уменьшение ёмкости КП ($682,2 \pm 24,5$ pF, 7 клеток от 3 мышей, $p = 0,0038$ по сравнению с животными без стимуляции; Таблица 4). Эти данные свидетельствуют о том, что мемантин в значительной степени предотвращает патологические изменения в коре мозжечка, вызванные хронической специфической оптогенетической стимуляцией ГБ.

Таблица 4. Влияние мемантина на основные пассивные электрофизиологические свойства в КП у мышей, которым вводили AVV GFAP-ChR2-mKate после хронической фотостимуляции.

Группа	Ёмкость (pF)	Ra (MΩ)	Rm (MΩ)
+GFAP-ChR2-mKate (hv-) (n=8/3)	725,1±39,5	12,4±0,6	186,3±28,2
+GFAP-ChR2-mKate (+ 4d hv) (n=10/3)	494,2±63,2	13,8±1,4	211,5±34,5
+GFAP-ChR2-mKate (+ 4d hv) + Mem (n=7/3)	682,2±24,5**	14,3±0,9	173,4±33,6

Ra – сопротивление доступа, Rm – сопротивление мембраны. Количество (n) исследованных КП и животных (КП/животные) указано в таблице, *p <0,05; **p <0,001; † p <0,001.

Также через 4 дня фотостимуляции иммунореактивность EAAT1 снижалась в ГБ, что частично предотвращалось применением мемантина (Рисунок 25А). Площадь EAAT1-позитивных элементов уменьшилась с 66,8±5,3% (8 зон от 3-х мышей) до 21,3±3,0% (9 зон от 3-х мышей) (p=0,001). Мемантин частично восстанавливал площадь EAAT1-положительных элементов до 56,1±5,4 (6 зон от 3 мышей) (Рисунок 25Б), эти значения не отличались от таковых у нестимулированных мышей (p=0,29).

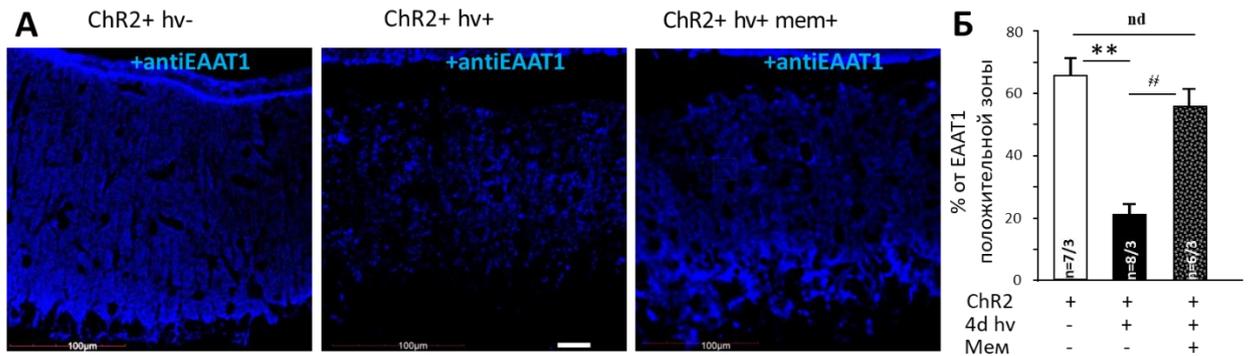


Рисунок 25. Экспрессия EAAT1 в реактивной ГБ^{ChR2+} и влияние мемантина на эту экспрессию. А – конфокальные изображения отростков ГБ^{ChR2+} без (ChR2+ hv-) и через 4 дня фотостимуляции (ChR2+ hv+) в сочетании с пероральным введением мемантина (ChR2+ hv+ mem+). Окраска на анти-EAAT1 отмечена синим цветом. Мерная шкала 20 мкм. (Б) Усредненный график зоны EAAT1-положительных элементов по отношению к общей площади. ** p <0,01; # p <0,01.

Таким образом, мемантин положительно влияет не только на нейроны, но и на все составляющие трёхкомпонентного синапса. В значительной степени он предотвращает изменения экспрессии EAAT1 в реактивной ГБ. В частности, мы обнаружили более широкое представление сайтов поглощения глутамата в отростках ГБ у мышей, получавших мемантин. Это способствует предотвращению

эксайтотоксичности и уменьшению нейродегенеративного процесса в коре мозжечка. В ходе нашей работы мы дополнили патогенез СЦА1 и определили важные молекулы-мишени для проведения патогенетической терапии данного состояния. Данными патогенетическими точками являются: «перегрузка» убиквитин-протеасомной системы, недоразвитие и инволюция КП, уменьшение экспрессии mGluR1 на КП и нарушение функции CB1 рецепторов на пресинапсе (ПВ). Также важной патогенетической точкой является перераздражение NMDA рецепторов ГБ и КП с последующим нарушением ионного градиента и замедлением обратного захвата глутамата через EAAT1 (Рисунок 26).

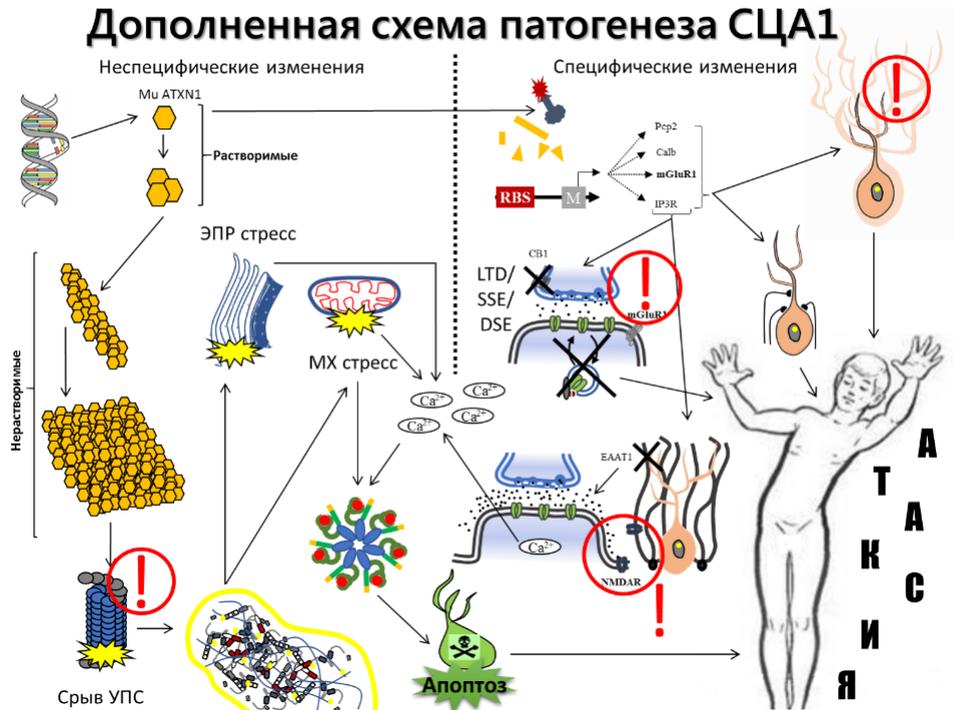


Рисунок 26. Дополненная схема патогенеза СЦА1. Центральными звеньями в данном процессе выступают нарушение mGluR1 сигнализации и развитие эксайтотоксичности. Молекулы-мишени обведены на рисунке красным кружком с восклицательным знаком.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Центральным направлением исследования в диссертационной работе было выявить общие звенья патогенеза при полиглутаминовых СЦА, а также повлиять на них с помощью различных терапевтических подходов. Так мы показали, что имеет место нарушение mGluR сигнализации в КП, которое обуславливает нарушение кратковременной и долговременной синаптической пластичности во всех исследуемых моделях нейродегенерации мозжечка. Вторым центральным аспектом патогенеза является эксайтотоксичность, которая тесно связана с функцией ГБ. Использование нами вирусных векторов не дало однозначного положительного влияния. Сами по себе вектора оказывают лёгкое негативное влияние на морфологию дендритов КП. Более того, экзогенная экспрессия mGluR с помощью векторов оказало резкое негативное влияние на поведение животных и морфологию КП. Однако элиминация агрегатов мутантных белков с помощью аденовирусной экспрессии CRAG значительно улучшала атаксический фенотип и

может рассматриваться как потенциальная терапия полиглутаминовых СЦА. Второй терапевтический подход – введение МСК также показал хорошие результаты в виде улучшения координации движений и восстановления функции и морфологии КП.

Третий подход – использование фармакологических средств, которые используются уже в неврологической практике. Эти фармакологические агенты также влияют на ключевые аспекты патогенеза полиглутаминовых СЦА, но ранее не исследовались. Одним из таких препаратов является агонист ГАМК_В рецепторов, баклофен, который потенцирует mGluR1 рецепторы на постсинаптических окончаниях КП и восстанавливает синаптическую пластичность в этих клетках. Малая доза вводимого вещества позволила избежать миорелаксирующего эффекта. После однократного введения баклофена наблюдалось значительное улучшение координационной функции у модельных B05 СЦА1 мышей. Мы вводили данное средство *per os*, что очень удобно, если лечение будет применяться у больных полиглутаминовыми СЦА.

Наиболее значимые результаты мы получили в ходе применения антагониста NMDA рецепторов, которые тесно связаны с развитием эксайтотоксичности. Мемантин вводился также «*per os*», но не однократно, а в течение 9 недель, но приводило к восстановлению морфологии клеток коры мозжечка, синаптической пластичности и утраченных моторных функций. Мы исследовали эффекты мемантина не только на СЦА1 модели, но и на оптогенетической модели нейродегенерации мозжечка, при которой поражение ГБ и КП происходит неспецифическим образом. Поэтому терапия мемантином может быть рекомендована для клинических исследований и последующего внедрения при различных СЦА.

Итогом данной работы является 4 подхода к лечению некурабельных полиглутаминовых СЦА. Данные доклинические исследования позволяют транслировать их на следующую стадию – клинических исследований и получить с высокой степенью вероятности, результаты в виде значительного повышения качества и увеличения продолжительности жизни больных с как полиглутаминовыми СЦА, в том числе и СЦА1.

Выводы

1. Разработаны: модель отсроченной лентивирусной экспрессии мутантного атаксина 1 селективно в клетках Пуркинье, модели астроглиоза со специфическим раздражителем: экспрессией мутантного атаксина 1 и с использованием протоколов оптогенетики – модель с неспецифическим раздражителем (хроническая фотоактивация глии Бергмана, экспрессирующей каналородопсин 2 типа).
2. Молекулярной основой уменьшения размеров клеток Пуркинье во время формирования мозжечка является подавление экспрессии и нарушение функции мутантными белками ядерного рецептора регуляции транскрипции RoR α , как это было показано в полиглутаминовой модели и при конкурентном замещении субстратов RoR α при векторной экспрессии экзогенного mGluR1 в модели спиноцеребеллярной атаксии 1 типа. Данные изменения наблюдаются у животных, где мутантные белки экспрессируются в клетках Пуркинье, начиная

с внутриутробного развития (трансгенные модели). Нарушение mGluR1-опосредованных процессов, таких как кратко- и долговременная синаптическая пластичности, протекает параллельно с уменьшением дендритов клеток Пуркинье. Отсроченная экспрессия мутантного атаксина 1 после созревания мозжечка (векторная модель) не приводит к уменьшению размеров клеток Пуркинье, но вызывает схожие нарушения mGluR-опосредованной синаптической пластичности, доказывая специфические эффекты RoRa именно на mGluR1-опосредованный путь передачи сигналов. Схожие изменения в исследуемых моделях указывают на нарушение mGluR1-опосредованного пути передачи сигналов как общее звено патогенеза при полиглутаминовых спиноцереbellарных атаксиях.

3. Астроглиоз вызывает уменьшение уровня транспортёра глутамата EAAT1 в астроцитах коры мозжечка животных с оптогенетической моделью нейродегенерации и с селективной экспрессией мутантного атаксина 1 в глии Бергмана. Это приводит к более долгому присутствию глутамата в синаптической щели и развитию эксайтотоксичности, что регистрируется в виде увеличения времени спада возбуждающих постсинаптических токов в синапсах клеток Пуркинье с параллельными волокнами в описанных двух моделях астроглиоза. Эксайтотоксичность вызывает нейродегенеративные изменения в виде уменьшения размеров клеток Пуркинье с последующей их гибелью. Схожие изменения в двух описанных моделях указывают на эксайтотоксичность как общее звено патогенеза в нейродегенеративных заболеваниях мозжечка, в том числе и полиглутаминовых спиноцереbellарных атаксиях.
4. Экспрессия в клетках Пуркинье сигнальной ГТФазы CRAG достигается после внутривенного введения соответствующего аденоассоциированного вирусного рекомбинантного гена новорожденным мышатам с полиглутаминовой моделью (до формирования ГЭБ). Эффект связан с увеличением длины, ветвления дендритов, а также ёмкости клеток Пуркинье. Восстановление кратковременной mGluR-зависимой синаптической пластичности происходило до уровня амплитуд контрольных животных, не экспрессирующих мутантный белок. Восстановление синаптической пластичности отмечалась как у животных с полиглутаминовой моделью, так и с моделью с селективной экспрессией мутантного атаксина 1 в клетках Пуркинье.
5. Введение мезенхимальных стволовых клеток трансгенным модельным полиглутаминовым животным является целесообразным, так как приводит к появлению данных клеток в коре мозжечка через 3 дня после инъекции. Появление стволовых клеток в мозжечке вызывает частичное восстановление морфологии клеток Пуркинье в виде увеличения площади дендритов, а также улучшает mGluR1-опосредованную синаптическую пластичность в виде замедления восстановления нормированной амплитуды возбуждающих постсинаптических токов. На фоне выявленного уменьшения патогенетических изменений наблюдается улучшение координации движений в виде увеличения времени нахождения на вращающейся дорожке при обучении модельных животных.
6. Однократная инъекция низких доз баклофена в кору мозжечка трансгенных животных с селективной экспрессией мутантного атаксина 1 в клетках

Пуркинье уменьшает клеточные патогенетические изменения, посредством активации комплекс-образующих с mGluR1 рецепторов ГАМКв и усиления mGluR1-опосредованного пути передачи сигналов. Данный эффект показан в виде увеличения амплитуды медленных mGluR1-зависимых возбуждающих постсинаптических токов и улучшения кратко- и долговременной синаптической пластичности. Это положительно влияет на координацию данных животных. Эффект от однократного введения наблюдается в течение 1 недели.

7. Длительное пероральное введение мемантина животным с оптогенетической неспецифической моделью астроглиоза мозжечка, являющаяся наиболее общей моделью для всех полиглутаминовых атаксий, значительно снижает эксайтотоксичность за счёт восстановления экспрессии EAAT1 в глии Бергмана. Это приводит к уменьшению времени нахождения нейромедиатора в синаптической щели в виде частичного восстановления времени спада возбуждающих постсинаптических токов. Данное состояние оказывает положительное влияние на морфологию клеток Пуркинье и глии Бергмана в виде увеличения их отростков и уменьшения их толщины. Побочными эффектами, в виде появления тревожности при хроническом потреблении мемантина, можно пренебречь, в силу выраженного его положительного влияния на структуры коры мозжечка в модели оптогенетической нейродегенерации.

Практические рекомендации

Не все используемые в работе подходы к лечению полиглутаминовых СЦА могут быть использованы в клинических исследованиях и неврологической практике, однако важным достижением выполненной работы является создание научной основы для проведения в будущем клинических испытаний. Созданные нами модели отсроченной экспрессии мутантного атаксина 1 и модели селективного и неселективного астроглиоза мозжечка могут использоваться для поиска новых механизмов развития атаксии и эффективных препаратов для ее коррекции.

Высокой степенью готовности к клиническим испытаниям обладают фармакологические препараты. Используемые нами баклофен и мемантин уже применяются для лечения других неврологических расстройств и не нуждаются в дополнительных исследованиях на цитотоксичность и переносимость. Низкие дозы баклофена, которые мы использовали в работе (5nM), не оказывают миорелаксирующего действия, свойственного этому препарату и не оказывает негативного влияния на координацию модельных СЦА1 животных. Отталкиваясь от рабочей концентрации баклофена в тканях мозжечка СЦА1 модельных мышей, возможен подбор дозы препарата пациентам с полиглутаминовыми СЦА, при которой будут фиксироваться улучшения координации. Поэтому баклофен можно рекомендовать для клинических исследований. Он может улучшить качество жизни таких больных.

Рекомендации в отношении мемантина неоднозначны и требуют пояснений. Мы выявили усиление тревоги у животных, принимавших мемантин. Это негативно повлияло на их координацию. В связи с этим, в клинических исследованиях

мемантина у больных полиглутаминовыми СЦА может наблюдаться ухудшение координации (баллов по шкале SARA). В таком случае, использование анксиолитиков может уменьшить тревожность и улучшить координацию. В защиту данного препарата нужно сказать, что мемантин значительно уменьшает явления нейродегенерации и восстанавливает синаптическую пластичность в клетках Пуркинье СЦА1 модельных животных. В связи с этим, возможные клинические исследования должны быть направлены на замедление скорости утраты функций мозжечка и ствола мозга, что напрямую связано с увеличением продолжительности жизни у таких больных.

СПИСОК НАУЧНЫХ РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Публикации в рецензируемых научных изданиях

1. Mutant Ataxin-3 with an Abnormally Expanded Polyglutamine Chain Disrupts Dendritic Development and Metabotropic Glutamate Receptor Signaling in Mouse Cerebellar Purkinje Cells. / Konno, A., Shuvaev, A. N., Miyake, N., Miyake, K., Iizuka, A., Matsuura, S., Huda, F., Nakamura, K., Yanagi, S., Shimada, T., & Hirai, H. // *Cerebellum*. 2014, 13(1), 29–41. <https://doi.org/10.1007/s12311-013-0516-5> (**Scopus**)
2. Mesenchymal Stem Cells Ameliorate Cerebellar Pathology in a Mouse Model of Spinocerebellar Ataxia Type 1. / Matsuura, S., **Shuvaev, A. N.**, Iizuka, A., Nakamura, K., & Hirai, H. // *Cerebellum*. 2014, 13(3), 323–330. <https://doi.org/10.1007/s12311-013-0536-1> (**Scopus**)
3. Progressive impairment of cerebellar mGluR signalling and its therapeutic potential for cerebellar ataxia in spinocerebellar ataxia type 1 model mice. / **Shuvaev A.N.**, Hosoi N., Sato Y., Yanagihara D., Hirai H // *J. Physiol.* doi: 10.1113/JP272950. - 2016. - P.1-78. (**Scopus**)
4. Chronic optogenetic stimulation of Bergman glia leads to dysfunction of EAAT1 and Purkinje cell death, mimicking the events caused by expression of pathogenic ataxin-1. / **Shuvaev A.N.**, Belozor O.S., Mozhei O., Yakovleva D.A., Potapenko I.V., Shuvaev A.N., Smolnikova M.V., Salmin V.V., Salmina A.B., Hirai H., Teschemacher A.G., Kasparov S. // *Neurobiology of Disease*. 2021. - Vol. 154. P. 105340. doi: 10.1016/j.nbd.2021.105340 (**Scopus**)
5. Protective Effect of Memantine on Bergmann Glia and Purkinje Cells Morphology in Optogenetic Model of Neurodegeneration in Mice. / **Shuvaev A.N.**; Belozor O.S.; Mozhei O.I.; Khilazheva E.D.; Shuvaev A.N.; Fritsler Y.V.; Kasparov, S. // *Int. J. Mol. Sci.* 2021, 22, 7822. <https://doi.org/10.3390/ijms22157822> (**Scopus**)
6. Indirect Negative Effect of Mutant Ataxin-1 on Short- and Long-Term Synaptic Plasticity in Mouse Models of Spinocerebellar Ataxia Type 1. / **Shuvaev A.N.**, Belozor O.S., Mozhei I.O., Shuvaev A.N., Fritsler Y.V., Khilazheva E.D., Mosyagina A.I., Hirai H., Teschemacher A.G., Kasparov S. // *Cells*. - 2022. - Vol.11, №2247. - P.1-14. (**Scopus**)
7. Current advances in cell electrophysiology: applications for the analysis of intercellular communications within the neurovascular unit / **Shuvaev A.N.**, Salmin V.V., Kuvacheva N.V., Pozhilenkova E.A., Morgun A.V., Lopatina O.L., Salmina A.B., Illarionov S.N. // *Reviews in the Neurosciences*. 2016, 27(4), P. - 365-76 doi 10.1515/revneuro-2015-0047. (**Scopus**)

8. Excitation/inhibition imbalance and impaired neurogenesis in neurodevelopmental and neurodegenerative disorders. / Lopatina O.L., Malinovskaya N.A., Komleva Y.K., Gorina Y.V., **Shuvaev A.N.**, Olovyannikova, R.Y., Belozor, O.S., Belova, O.A., Higashida H. and Salmina A.B. // *Reviews in the Neurosciences*, vol. 30, no. 8, 2019, pp. 807-820. <https://doi.org/10.1515/revneuro-2019-0014> (**Scopus**)
9. Extracellular S100 β Disrupts Bergman Glia Morphology and Synaptic Transmission in Cerebellar Purkinje Cells. / Belozor OS, Yakovleva DA, Potapenko IV, Shuvaev AN, Smolnikova MV, Vasilev A, Pozhilenkova EA, **Shuvaev AN.** // *Brain Sciences*. - 2019. - 9(4):80. <https://doi.org/10.3390/brainsci9040080> (**Scopus**)
10. Memantine Disrupts Motor Coordination through Anxiety-like Behavior in CD1 Mice / **Shuvaev A.N.**, Belozor O.S., Mozhei O.I., Mileiko A.G., Mosina L.D., Laletina I.V., Mikhailov I.G., Fritslet Y.V., Shuvaev A.N., Teschemacher A.G., Kasparov S. // *Brain Sciences*. - 2022. - Vol.12, №4. - P.1-11. (**Scopus**)
11. Современные тенденции в развитии метода локальной фиксации потенциала: новые возможности для нейрофармакологии и нейробиологии. / **Шуваев А.Н.**, Салмин В.В., Кувачева Н.В., Пожиленкова Е.А., Салмина А.Б. // *Анналы клинической и экспериментальной неврологии*. 2015, 4. - С.54-57. (**Scopus**)
12. Experience of mGluR1 gene therapy in transgenic models of SCA1 mice. / **Shuvaev A.N.**, Hirai H. // *Современные технологии в медицине = Sovremennye Tehnologii v Medicine=Modern Technologies in Medicine*. 2016. 8(4). - P.141-154. (**Scopus**)
13. Population genetics of spinocerebellar ataxias caused by polyglutamine expansions. / **Shuvaev A.N.**, Belozor O.S., Smolnikova M.V., Yakovleva D.A., Shuvaev A.N., Kazantseva O.M., Pozhilenkova E.A., Mozhei O.I., Kasparov S. // *Vavilov journal of genetic and selection*. // 2019. - Vol. 23(4). P. 473-481. doi: 10.18699/VJ19.516 (**Scopus**)
14. Модификация моделей динамики кальция в астроцитах рианодиновым путём высвобождения. / Фрицлер Я.В., Барцев С.И., Белозор О.С., **Шуваев А.Н.**, Шуваев А.Н. // *Математическая биология и биоинформатика*. 2021. 16(1). С. 86–100. doi: 10.17537/2021.16.86 (**ВАК**)
15. Влияние реактивной глии Бергмана на кратковременную синаптическую пластичность в моделях мозжечковой нейродегенерации, вызванной хронической активацией ChR2 и экспрессией мутантного атаксина1. / **Шуваев А.Н.**, Белозор О.С., Можей О.И., Яковлева Д.А., Шуваев А.Н., Смольникова М.В., Пожиленкова Е.А., Каспаров С., Салмин В.В., Салмина А.Б. // *Анналы клинической и экспериментальной неврологии*. 2021. - Том 15(1). С. 51–58. <https://doi.org/10.25692/ACEN.2021.1.6> (**ВАК**)
16. Антагонисты NMDA-рецепторов как потенциальные средства для лечения нейродегенеративных заболеваний мозжечка. / Белозор О.С., Шуваев А.Н., Фрицлер Я.В., **Шуваев А.Н.** // *Анналы клинической и экспериментальной неврологии = Annals of Clinical and Experimental Neurology*. 2022. 16(2). - С.58-69. (**ВАК**)
17. Мутантный атаксин-1 с патологически удлинённой полиглутаминовой цепочкой нарушает морфологию и эндоканнабиноид-опосредованную синаптическую пластичность в клетках пуркинье СЦА1 модельных мышей. / Белозор О.С., Шуваев А.Н., Фрицлер Я.В., **Шуваев А.Н.** // *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2022, 66(4). С.13-19. (**ВАК**)

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

СЦА – спинocerebellярная атаксия
GFP – зелёный флуоресцентный белок
ЛВ – лазающие волокна
ПВ – параллельные волокна
LTD – долговременная депрессия
mGluR1 – метаботропный глутаматный рецептор 1-го типа
Р – постнатальный день
ЭПР – эндоплазматический ретикулум
ФЛСβ – фосфолипаза Сβ
AMPA-рецептор – рецептор α-амино-3-гидрокси-5-метил-4-изоксазолпропионової кислоты
NMDA-рецептор – рецептор N-метил-D-аспартат
ChR2 – каналородопсин-2
GFAP – глиальный фибриллярный кислый белок
mKate – дальне-красный флуоресцентный белок
ТВОА – трео-бета-бензилоксияспартат
ВПСТ – возбуждающие постсинаптические токи
ГС – гранулярный слой
ИГХ – иммуногистохимия
КП – клетки Пуркинье
МС – молекулярный слой
СКП – слой клеток Пуркинье
PPF – усиление парных импульсов
ЕААТ – транспортёр возбуждающих аминокислот
Ca²⁺ - ионы кальция
RT-ПЦР – полимеразная цепная реакция в реальном времени
ГБ – глия Бергмана
УПС – убиквитин-протеасомная система