На правах рукописи

Белозор Ольга Сергеевна

# РОЛЬ АСТРОГЛИИ В ПАТОГЕНЕЗЕ СПИНОЦЕРЕБЕЛЛЯРНОЙ АТАКСИИ ПЕРВОГО ТИПА

3.3.3. Патологическая физиология

АВТОРЕФЕРАТ диссертации на соискание ученой степени кандидата биологических наук

Красноярск – 2022

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

## Научный руководитель:

кандидат медицинских наук Шуваев Антон Николаевич

# Официальные оппоненты:

Зайцев Алексей Васильевич – доктор биологических наук, главный научный сотрудник Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова Российской академии наук

Семьянов Алексей Васильевич – доктор биологических наук, заместитель директора по научной работе Государственного Научного Центра Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук

# Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научноисследовательский институт нейронаук и медицины»

Защита состоится « 02 » февраля 2023 г. в 14 часов на заседании диссертационного совета 24.1.180.01, созданного на базе ФГБНУ «НИИОПП», по адресу:

125315, г. Москва, ул. Балтийская, д. 8.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБНУ «НИИОПП», а также на сайте http://www.niiopp.ru/

Автореферат разослан « 15 » декабря 2022 г.

Ученый секретарь диссертационного совета доктор биологических наук

Илгу Н.Б. Панкова

#### ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

#### Актуальность темы исследования

Спиноцеребеллярная атаксия 1 типа (СЦА1) является наиболее часто встречающимся типом СЦА. В России СЦА1 распространена неравномерно: хотя общий уровень заболеваемости по данным ВОЗ составляет 1-2 на 100 тыс. населения, в восточной части России данное заболевание встречается намного чаще – до 48 человек на 100 тыс. населения, в первую очередь, за счёт Якутии (Illarioshkin et al., 1996; Platonov et al., 2016).

Заболевание начинается в зрелом возрасте и характеризуется постепенным прогрессированием двигательных и экстрапирамидных расстройств. В первую очередь поражаются клетки Пуркинье (КП) мозжечка, со временем в патологический процесс вовлекаются и другие структуры: подкорковые ядра и продолговатый мозг (Orr, Zoghbi, 2007; Клюшников, Иллариошкин, 2012). Смерть наступает от бульбарных расстройств, чаще от нарушения дыхания, через 10-15 лет после клинической манифестации (Shakkottai, Fogel, 2013). Таким образом, заболевание является и медицинской и социальной проблемой, так как страдает работоспособное население, увеличивается число инвалидов, возрастают расходы на длительную терапию и реабилитацию больных.

Лечение больных СЦА1 остается поддерживающим, симптоматическим, так как не существует известной терапии для задержки или остановки прогрессирования заболевания.

#### Степень разработанности темы исследования

В последнее время увеличилось число исследований, изучающих роль астроцитов и микроглии в моделях нейродегенеративных заболеваний на животных (Vila et al., 2001; Papadimitriou et al., 2010; Guillot-Sestier, Town, 2013; Verkhratsky et al., 2016; Wilton, Stevens, 2020). Несмотря на это, роль астроглиоза в патогенезе нейродегенерации до сих пор не ясна. Некоторые из этих исследований представляют доказательства того, что глия может обладать нейропротективным действием, другие же предполагают, что астроциты и микроглия усугубляют нейродегенерацию.

Изучение клеточно-молекулярных механизмов развития СЦА1, его патоморфологии с использованием человеческих биологических образцов затруднено. Для изучения патогенеза данной патологии используют модели заболевания на животных (Klement et al., 1998; Matilla et al., 1998; Cummings et al., 1999; Cummings et al., 2001; Cvetanovic et al., 2015). Существует не так много исследований о роли астроглии, в частности глии Бергмана (ГБ), в развитии СЦА (Custer et al., 2006; Cvetanovic et al., 2015; Furrer et al., 2011), и для полного понимания её роли в развитии нейродегенерации требуются дальнейшие исследования.

Изучение роли астроглии позволит выявить новые фундаментальные механизмы в патогенезе СЦА1. Это позволило бы применять эффективные стратегии лечения до потери клеток или необратимого нарушения функций нейронов, также результаты исследования выявят потенциальные цели лечения.

#### Цели и задачи работы

Цель настоящей работы заключалась в исследовании роли глии Бергмана в патогенезе СЦА1. В связи с этим были поставлены следующие задачи:

1. Разработать модель ранней стадии астроглиоза с использованием протокола оптогенетики.

2. Изучить морфологию глии Бергмана и клеток Пуркинье при неспецифическом и специфическом астроглиозе, вызванном действием мутантного атаксина 1.

3. Изучить синаптическую передачу и синаптическую пластичность в нейронах коры мозжечка при неспецифическом и специфическом астроглиозе, вызванном действием мутантного атаксина 1, и оценить влияние изменений синаптической пластичности на развитие атаксии.

4. Дополнить схему патогенеза нейродегенерации мозжечка при СЦА1 новыми представлениями о роли и механизмах участия астроглии в повреждении нейронов.

#### Научная новизна

Впервые созданы две векторные модели селективного астроглиоза коры мозжечка со специфическим (экспрессия мутантного атаксина 1) и неспецифическим (экспрессия ChR2) раздражителями. В этих моделях обнаружено негативное влияние активированной ГБ на морфологию и синаптическую передачу КП в виде уменьшения длины и утолщения отростков ГБ, снижения количества КП и уменьшения толщины молекулярного слоя. Впервые было показано негативное влияние обратного захвата нейромедиаторов из синаптической щели, что приводит к удлинению времени восстановления ПВ ВПСТ и нарушению кратковременной и долговременной синаптической пластичности (PPF, DSE и LTD). Все эти механизмы лежат в основе развития эксайтотоксичности, нарушений морфологии и функции КП. Таким образом, получены новые данные о фундаментальных механизмах развития нейродегенерации мозжечка. Также полученные результаты в этом исследовании демонстрируют, что астроглиоз является объединяющим признаком различных нейродегенеративных заболеваний мозжечка, в том числе и СЦА1.

#### Теоретическая значимость работы

Теоретическое значение данной работы состоит в расширении представлений о механизмах развития нейродегенерации в КП мозжечка мышей. Данная работа имеет значение для фундаментальной науки в области исследования роли астроглии и патологических механизмов, которые можно использовать при разработке терапевтического подхода к лечению СЦА1 и других нейродегенеративных заболеваний мозжечка. Это позволило бы применять эффективные стратегии лечения до потери клеток или необратимого нарушения функций нейронов, также результаты исследования выявляют потенциальные цели лечения.

#### Практическая значимость

Разработаны модели ранней стадии астроглиоза с использованием протокола оптогенетики – модель с хронической фотоактивацией ГБ, экспрессирующей ChR2, и модель с экспрессией мутантного атаксина 1 в астроцитах, которые позволяют изучать механизмы патологических процессов на начальных этапах нейродегенерации мозжечка до появления клинических признаков патологии.

Доказано влияние активированных астроцитов на транссинаптическую передачу импульсов при патологическом процессе в мозжечке. Понимание механизмов возникновения патологии позволит применять более эффективные методы лечения, направленные на причину заболевания, тогда как сейчас возможно только симптоматическое лечение.

#### Методология и методы исследования

В работе использовались иммуногистохимическое исследование срезов мозжечка, электрофизиологический метод локальной фиксации потенциала мембраны клеток, тестирование животных с выявлением нарушений функции мозжечка (тест на вращающейся дорожке), методы оптогенетики, стереотаксическое введение веществ в кору мозжечка, генетические методы исследования (ПЦР). Работа проведена на переживающих срезах мозжечка мышей линии CD1 и трангенных мышах линии C57BL/6. Достоверность полученных данных подтверждена методами математической статистики.

#### Положения, выносимые на защиту

1. Избыточная активация глии Бергмана нарушает морфологию глии и отрицательно влияет на морфологию клеток Пуркинье.

2. Избыточная активация глии Бергмана влияет на синаптическую передачу в виде удлинения времени спада ПВ ВПСТ вследствие нарушения обратного захвата нейромедиатора из синаптической щели через снижение экспрессии EAAT1.

3. Избыточная активация глии Бергмана нарушает синаптическую пластичность (PPF, DSE и LTD) в синапсах нейронов коры мозжечка.

4. Центральным механизмом патогенеза при неспецифическом и специфическом астроглиозе мозжечка, вызванном действием мутантного атаксина 1, является эксайтотоксичность.

#### 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. Автором самостоятельно набран материал для исследований, проведено поведенческое исследование животных, иммуногистохимические исследования, моделирование патологии на животных (совместно с к.м.н. Шуваевым А.Н.), ПЦР (совместно с н.с. Хилажевой Е.Д.), электрофизиологические эксперименты и оптогенетическая стимуляция (совместно с к.м.н. Шуваевым А.Н.). 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: Russia-Japan medical symposium, г. Красноярск, 2018 г.; «II Всероссийской научной конференции с международным участием «ОПТОГЕНЕТИКА+ 2020», г. Санкт-Петербург, 2020 г.

По результатам работы опубликовано 8 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 130 страницах машинописного текста, иллюстрирован 36 рисунками и 7 таблицами. Работа состоит из введения, 4 глав (обзор литературы, материалы и методы, результаты, обсуждение результатов), заключения, выводов, списка сокращений, списка литературы. Список литературы включает 195 источников, в том числе 10 отечественных и 185 зарубежных.

#### ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

**В** ведении 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. Также в данной главе охарактеризованы существующие модели СЦА1 на мышах, выявлены их достоинства и недостатки для исследований на этих моделях роли астроцитов в патогенезе, описаны методы оптогенетики, позволяющие решить эти проблемы. Глава проиллюстрирована таблицами и рисунками.

Вторая глава посвящена описанию материалов и методов исследования. Объект исследования: мыши линии CD1 и трансгенные мыши CЦА1 КI линии C57BL/6, обоего пола. 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 № 4 от 15.11.2017 г.).

В исследовании были использованы следующие группы животных:

1. Для создания модели астроглиоза вводили белок S100β в мозжечок мышей. Двенадцатинедельных (P84) мышей WT анестезировали внутрибрюшинной инъекцией раствора хлоралгидрата (400 мг/кг массы тела). Внутрибрюшинно вводили 25% маннитол в дозе 30 мкл/мг массы тела для дегидратации головного мозга. Затем стереотаксически вводили 2,5 µл 50 µM S100β, растворённого в PBS, в кору червя мозжечка (долька VI) с помощью шприца Гамильтона на 10 µл. Через день после введения белка проводился забор материала.

2. Для создания модели селективной активации ГБ после анестезии и введения маннитола мышам P84 вводили в кору червя мозжечка 10 µл AVV GFAP-ChR2-mKate (3,7 ×  $10^7$  EД/мл) с использованием стереотакса, затем стимулировали светом повторными импульсами в течение 4 дней (60-секундные последовательности импульсов (20/20 мс вкл/выкл) синего света с 60-секундными перерывами). Перфорационное отверстие в костях черепа расширяли до 2,5×2,5 мм для лучшего покрытия светом коры мозжечка. Светодиод фиксировали непосредственно над отверстием. Провод от диода к контроллеру был подвешен без натяжения и позволял мышам свободно перемещаться по клетке. Мышам первой контрольной группы также вводили 10 µл AVV GFAP-ChR2-mKate (3,7 ×  $10^7$  EД/мл) в червь мозжечка, но не фотостимулировали. Для исключения токсического влияния AVV данные сравнивали с показателями животных, получивших инъекцию PBS. Через 4 дня после введения оптогенетической конструкции проводился забор материала. Корректность введения конструкций оценивали по флуоресценции mKate методом иммуногистохимии.

3. У мышей следующей опытной группы моделировали нейродегенерацию путём интракортикального введения конструкций, селективно экспрессирующих белок атаксин 1. Трехнедельных (P21) мышей WT CD1 анестезировали и вводили маннитол, как указано выше, и затем вводили 3 µл LVV GFAP-ATXN1[Q85]-Flag (6,8 × 10<sup>9</sup> EД/мл) в червь мозжечка. Мышам 2-й контрольной группы интракортикально в червь мозжечка инъецировали 3 µл LVV GFAP-ATXN1[Q2]-Flag (6,5 × 10<sup>9</sup> EД/мл). Исследования проводили после 9 недель экспрессии LVV в коре мозжечка (p84). Корректность введения конструкций оценивали по меткам анти-Flag методом иммуногистохимии. Для электрофизиологических исследований с целью исследования физиологической функции ГБ в СЦА1 модели проводили котрансфекцию LVV GFAP-ATXN1[Q2]-Flag и AVV GFAP-ChR2-mKate или LVV GFAP-ATXN1[Q85]-Flag и AVV GFAP-ChR2-mKate с последующей однократной кратковременной фотостимуляцией.

4. Последняя опытная группа животных – трансгенная модель СЦА1 КІ. Данные, полученные при исследовании созданных нами моделей, сравнивали с результатами модели максимально приближеннной к течению СЦА1 у больных «СЦА1 КІ» (Wataseetal., 2002), с повсеместной экспрессией белка атаксина 1 с 154 повторами глутамина.

Создание лентивирусных и аденовирусных векторов. Для моделирования нейродегенерации использовались следующие конструкции: AVV GFAP-ChR2-mKate (для экспрессии белка-канала ChR2), LVV GFAP-ATXN1[Q2]-Flag (кодирующий человеческий атаксин 1 с 2 повторами глутамина, ATXN1[Q2]) и LVV GFAP-ATXN1[Q85]-Flag (кодирующий патогенный атаксин 1 с 85 непрерывными глутаминовыми повторами). Для достижения большого уровня экспрессии AVV и LVV векторов в ГБ был использован GFAP-промотор (Liu et al., 2008). Методы конструирования AVV и LVV описаны ранее (Gourine et al., 2010; Hewinson et al., 2013; Figueiredo et al., 2014).

AVV векторы нарабатывались в культурах НЕК 293, которые инкубировали при 37°C и 5% CO<sub>2</sub> в течение 2-3 суток до развития цитопатического эффекта, после чего вирусные частицы высвобождались с помощью сонификации. Дебрис удаляли центрифугированием (3000g x 10 мин). AVV очищали с помощью ультрацентрифугирования («OptimaX», «BeckmannCoulter») в градиенте CsCl. Аликвотированные образцы хранили при -80°C в течение 6 мес.

**Иммуногистохимическое исследование.** Для иммуногистохимии мышей под анестезией транскардиально перфузировали 4% параформальдегидом в 0,1 М фосфатном буфере, проводили забор мозга и постфиксировали 4% параформальдегидом в течение ночи. Червь мозжечка разрезали на сагиттальные срезы по 50  $\mu$ м. Срезы окрашивали по методике для свободно плавающих срезов по стандартному протоколу двойного мечения методом иммуногистохимии. Использовали следующие антитела: кроличьи моноклональные антитела к кальбиндину D-28k (Cloud-Clone Corp., Китай), куриные поликлональные антитела к GFAP (Abcam, Великобритания), кроличьи поликлональные антитела к EAAT1 (Abcam, Великобритания), кроличьи поликлональные анти-Flag (Cloud-Clone Corp., Китай), кроличьи поликлональные антитела против S100 $\beta$  (Abcam, Великобритания), атаксина 1 (Abcam, Великобритания), и Goat anti-Rabbit Alexa Fluor 514 (Life Technologies), Goat anti-Rabbit Alexa Fluor 647 (Life Technologies), u Goat anti-Chicken Alexa Fluor 647 (Life Technologies).

Конфокальная микроскопия и морфометрический анализ. Во всех группах для сравнения использовали VI и VII доли червя мозжечка. Флуоресцентные изображения получали с помощью конфокального микроскопа FV10i (Olympus, Япония). Изображения были записаны в виде Z-стеков с использованием объектива х10 и разрешения 1024×1024. Толщину и количество отростков ГБ измеряли на конфокальных изображениях сагиттальных срезов мозжечка. Количество радиальных отростков ГБ подсчитывали на 100 µм молекулярного слоя (МС). Отростки ГБ анализировали с использованием профилей интенсивности линии длиной 100 µм, проведенной поперек слоя, где каждый глиальный отросток проявлялся в виде пика флуоресценции GFAP/Alexa 647. При этом отсекались сигналы интенсивностью менее 30% от максимальной интенсивности флуоресценции. Приблизительную длину дендритов КП оценивали по общей толщине MC, визуализируемого с помощью окрашивания анти-кальбиндин/Alexa 488.

Анализ Шолля клеток ГБ. Количественный морфологический анализ проводили в трехмерном (3D) режиме. Используя конфокальный лазерный сканирующий микроскоп, меченую анти-GFAP ГБ сканировали в Z-стеках (80–150 последовательных фокальных плоскостей с интервалами 0,25 µм). Был использован метод концентрических окружностей Шолля с использованием программного обеспечения ImageJ (набор вложенных концентрических сфер центрируется на теле клетки, а сферы увеличиваются в размерах на радиус 10 µм). Результаты анализа показали длину отростков и количество пересечений на каждые 10 µм.

Электрофизиология. Для приготовления живых срезов мыши были глубоко анестезировали внутрибрюшинной инъекцией хлоралгидрата (400 мг/кг массы тела), декапетированы, вскрыта черепная коробка и забран головной мозг, с последующим охлаждением в ледяном растворе Рингера (234 мМ сахарозы, 2.5 мМ КС1, 1.25 мМ NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 мМ MgSO<sub>4</sub>, 0.5 мМ CaCl<sub>2</sub>, 26 мМ NaHCO<sub>3</sub>, 11 мМ D-глюкозы), в течение 1 мин, с аэрацией смесью газов 95% O<sub>2</sub> и 5% CO<sub>2</sub>. Затем был выделен червь мозжечка и использовался для приготовления парасагиттальных срезов с помощью вибротома. Срезы толщиной 250  $\mu$ M инкубировались не менее 1 часа при комнатной температуре во внеклеточном растворе (125 мМ NaCl, 2.5 мМ КС1, 1.25 мМ NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 мМ MgCl<sub>2</sub>, 2 мМ CaCl<sub>2</sub>, 26 мМ NaHCO<sub>3</sub>, 10 мМ D-глюкозы и 0.1 мМ пикротоксина), который перфузировался 95%O<sub>2</sub> и 5% CO<sub>2</sub>.

Для записи использовались стеклянные электроды, заполненные внеклеточным раствором и внутриклеточным раствором (65 мМ К-глюконат, 65 мМ Cs-methanesulfonate, 10

мМ KCl, 1 мМ MgCl<sub>2</sub>, 4мМ Na<sub>2</sub>ATP, 1 мМ NaGTP, 20 мМ HEPES, 0,4 мМ EGTA и 5 мМ сахарозы (pH 7,3)). Электроды имели сопротивление от 2 до 4 МОм.

Стимуляцию и регистрацию осуществляли с помощью программного обеспечения «Pachmaster» («HEKA») и усилителя «pClamp10» («Molecular Devices»). Полученные записи анализировали в программе Clampfit 10.5 (AxonInstruments). Регистрировались такие электрофизиологические характеристики клеток, как возбуждающие постсинаптические токи ПВ (ПВ ВПСТ), усиление парных импульсов (РРF), ёмкость и сопротивление мембраны. оценивали Пассивные электрические свойства КП с помошью импульсов гиперполяризующего напряжения (от -70 до -80 мВ, длительностью 200 мс). Быстрая ёмкостная составляющая автоматически компенсировалась. Потенциал мембраны КП были фиксирован на -70 мΒ для регистрации АМРА-опосредованных возбуждающих постсинаптических токов после активации параллельных волокон (ПВ ВПСТ). Селективную стимуляцию ПВ подтверждали РРГ ПВ ВПСТ (с интервалом в 50 мс).

Для записи астроцит-опосредованных эффектов на PPF ВПСТ записывали каждые 3 с. После записи стабильного уровня PPF в течение 3 мин для стимуляции ГБ<sup>ChR2</sup>,был применён паттерн вспышек голубого света (20/20 мс света в течение 60 с). Последующая регистрация PPF производилась в течение 4 мин. В экспериментах на срезах, содержащих ГБ<sup>ChR2</sup>, перед записью патч-клэмпа мы сначала подтверждали наличие флуоресценции mKate в этой области.

Для исследования индуцированного деполяризацией подавления возбуждения (DSE) каждые 3 с регистрировали ПВ ВПСТ. После мониторинга ПВ ВПСТ в течение 1 мин КП раздражали одиночным деполяризующим импульсом (5 с от -70 до 0 мВ). Такое раздражение стимулирует открытие потенциалзависимых Ca<sup>2+</sup>-каналов (VGCC) и высвобождение эндоканнабиноидов, которые пресинаптически уменьшают высвобождение глутамата и подавляют ПВ ВПСТ. Амплитуды последующих ПВ ВПСТ нормализовали к среднему значению 12 ответов, вызванных до индукции DSE.

Для исследования длительного синаптического подавления (LTD) каждые 10 с регистрировали ПВ ВПСТ. После записи контрольных значений ПВ ВПСТ в течение 10 мин, КП раздражали 30 одиночными импульсами с частотой 1 Гц вместе с 200 мс деполяризацией (от -70 до 0 мВ), что вызывает повышение внутриклеточной концентрации кальция и ведёт к эндоцитозу АМРА-рецепторов, и продолжали запись в течение 30 мин. Усреднённые амплитуды последующих ПВ ВПСТ за 5 минут нормализовали к среднему значению контрольных ответов, вызванных до индукции.

Генотипирование. Для исследований использовали гетерозиготных по мутантному гену трансгенных мышей СЦА1 КІ. Генотипировали однопомётных мышей от гетерозиготных самцов и здоровых самок. Генотипирование проводили методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (RT-PCR) на основе ДНК из кончиков хвостов трёхнедельных мышей (P21). ДНК очищали с использованием набора для выделения ДНК «ДНК-Экстран» («Синтол») в соответствии с инструкциями производителя. Для проведения RT-PCR в стандартную реакционную смесь ПЦР-микс» («Синтол») добавлялись праймеры и выделенная ДНК. Используемые прямой и обратный праймеры имели следующие последовательности: 5'-GTG AGT TTG GGT CTG GCA TC-3'и 5'-CCA AAA GTT AGG ATC ACA GCC C-3', соответственно. В качестве внутреннего стандарта использовали GAPDH. Протокол термоциклирования состоял из начальной денатурации при 95°C в течение 5 мин, за которой следовали 45 циклов при 95°C в течение 15 с и 60°C в течение 1 мин.

**Тестирование поведения животных.** Для проверки координации использовали тест на вращающейся дорожке (rotarod). Беговая дорожка состояла из металлического стержня (3 см в диаметре), разделённого четырьмя большими круглыми пластинами (20 см в диаметре). Стержень ускорялся от 0 до 40 оборотов в минуту, а затем оставался на максимальной скорости, общее время теста – 5 минут. Каждую мышь тестировали в течение пяти дней по четыре испытания каждый день с 30 минутным отдыхом между испытаниями, и мы записывали время, которое мыши проводили на стержне, полученные данные за четыре

попытки усреднялись. Тестирование мышей СЦА1 КІ проводили один раз в неделю в течение трёх недель. Каждый день тренировки животному давалось четыре попытки, данные усреднялись за один день тренировки.

Статистические методы и обработка данных. Для статистической обработки и представления данных использовали Excel (Microsoft). В экспериментах было использовано не менее 3 животных в каждой группе, до 15 независимых измерений на группу. Если данные в выборке отвечали нормальному распределению (оценка по критерию Колмогорова-Смирнова), то статистический анализ различий между группами проводили с помощью непарного или парного t-теста Стьюдента. При распределении отличном от нормального использовали U-критерий Манна-Уитни. При сравнении нескольких групп использовали ANOVA. Во всех случаях различия принимали значимыми при р  $\leq 0,05$ . Результаты представлены в виде M  $\pm$  SD, где M – среднее значение, SD – стандартная ошибка среднего, либо в виде Me (Q1;Q3) где Me –медиана, Q1 и Q3 – нижний и верхний квартили.

Мы оценивали дендритную и соматическую ёмкости путем оптимизации двухчленного экспоненциального ряда кривой зависимости тока от скачка напряжения, чтобы найти постоянные времени  $\tau_i$ . Здесь  $R_{ss} = 4$  МОм – 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.

 $V_{IIIar} = 10 \text{ MB}$  (Major et al., 1993):

$$I_{clamp}(t) = V_{step} \left( \frac{1}{R_{ss}} - A_d \tau_d e^{-t/\tau_d} - A_s \tau_s e^{-t/\tau_s} \right).$$

DSE анализировали с использованием уравнения двойной экспоненциальной формы сигнала

$$DSE = 100 + A \left( e^{\frac{-t}{\tau_1}} - e^{\frac{-t}{\tau_2}} \right) \left\{ A = \frac{100a\tau_1\tau_2}{\tau_1 - \tau_2} \right\}$$
(1)

Эта кривая удобна для предсказания изменений проводимости в синапсах (Sterratt et all., 2011). Она содержит параметры, как для распада, так и для восстановления ВПСТ отдельно во время протокола DSE. 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 «т1» и «т2» – периоды полураспада для ВПСТ, чтобы достичь минимума и восстановиться до начальных 100%, соответственно. Для получения 95% доверительных интервалов для параметров A, т1 и т2 использовался метод параметрической начальной загрузки. Этот анализ был выполнен с использованием пакета Python 3.

**Третья глава** диссертационной работы посвящена описанию полученных результатов. Глава иллюстрирована таблицами и рисунками.

**Четвертая глава** диссертации посвящена анализу и обсуждению полученных результатов с привлечением сведений по изучаемой теме, представленных в современной научной литературе.

#### РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

#### Изменение морфологии активированной ГБ и морфологии КП

Астроглиоз – это общий признак травмы головного мозга, аутоиммунных заболеваний и различных нейродегенеративных заболеваний, включая СЦА1. При этом меняется морфология и функция астроцитов, что влияет на состояние всех контактирующих с ними клеток и приводит к комплексным нейропатологическим нарушениям. При астроглиозе наблюдается избыточное выделение кальций-связывающего белка S100β реактивными астроцитами (Vig et al., 2006). Ранее было показано, что поглощение КП большого количества S100β, приводит к изменению морфологии и дегенерации КП в модели трансгенных мышей

СЦА1 (Watase et al., 2002; Vig et al., 2006; Vig et al., 2011). Мы попытались имитировать некоторые особенности СЦА1 с помощью инъекций S100β.

С помощью иммуногистохимии было обнаружено, что область накопления S100β распространяется значительно дальше фактического места инъекции и охватывает 2-3 доли мозжечка. Чтобы избежать ложноположительных результатов при измерении морфологии ГБ и КП, мы во всех экспериментах использовали доли VI и VII, в которых обнаруживался S100β, но на которые инъекция напрямую не влияла.

Избыточное количество S100 $\beta$  изменило морфологию ГБ: уменьшение числа клеток ГБ и их отростков сопровождалось утолщением отростков и прорастанием новых отростков в проксимальных областях. Среднее поперечное сечение отростков ГБ у мышей, которым инъецировали S100 $\beta$ , увеличилось до 3,6±0,1  $\mu$ м (364 отростка из 17 областей у 5 мышей) по сравнению с 2,8±0,1  $\mu$ м (358 отростков из 11 областей у 5 мышей) у мышей, которым инъецировали PBS, p<0,001. Количество отростков на 100  $\mu$ м продольной длины молекулярного слоя у животных, которым вводили S100 $\beta$ , было значительно меньше по сравнению с животными, которым вводили PBS (21,4±2,0 против 32,6±3,3, p=0,013). Плотность отростков ГБ также была снижена в местах введения S100 $\beta$ . Количество анти-S100 $\beta$ -меченых клеточных тел на 100  $\mu$ м продольной длины слоя КП у животных, которым вводили S100 $\beta$ , было снижено по сравнению с контрольной группой (9,1±0,4 против 10,9±0,5, p=0,007). Анализ по Шоллю выявил увеличение плотности проксимальных отростков в ГБ после введения S100 $\beta$ , астроциты имели 3,3±0,3 отростка, тогда как в областях, инъецированных PBS, было 1,8±0,2 отростков (p<0,001) (Belozor et al., 2019).

Было обнаружено, что инъекции S100 $\beta$  уменьшали толщину MC до 120,0±5,8 µм (12 областей от 3 мышей) по сравнению с 150,7±6,3 µм (14 областей от 3 мышей) у мышей, которым вводили PBS (p=0,002). Так как толщина MC коррелирует с длиной дендритного дерева КП, её уменьшение говорит о дегенерации нейронов. Это подтвердилось и в электрофизиологическом эксперименте – ёмкость мембраны сомы и дендритов КП также значительно изменилась. Ёмкости дендритов КП у мышей, которым вводили S100 $\beta$ , составляли 359,4±37,5 пФ (n= 33 клетки от 8 мышей) и 513,5±27,1 пФ (n = 52 клетки от 10 мышей) в группе мышей, инъецированных PBS (p=0,002). Ёмкость сомы КП у мышей, которым вводили S100 $\beta$ , составляла 34,6±4,4 пФ (те же клетки) и 61,7±5,6 пФ в контрольной группе (те же клетки) (p<0,001) (Belozor et al., 2019). Таким образом, избыточное количество S100 $\beta$  приводит к нейродегенерации КП, что может быть обусловлено влиянием реактивных астроцитов либо быть следствием захвата этого белка КП.

Чтобы чётко обозначить влияние реактивных астроцитов на КП, была создана модель селективной активации ГБ с неспецифическим раздражителем астроцитов (хроническая фотоактивация с использованием ChR2). Для создания модели мышам вводили в кору червя мозжечка AVV GFAP-ChR2-mKate. Через 4 дня флуоресценция mKate была выражена в мозжечковых дольках V-VII. mKate-положительное окрашивание (отростки ГБ) было колокализовано с окрашиванием анти-GFAP в MC, что подтверждает селективную экспрессию оптогенетической конструкции в ГБ. У животных, которым вводили PBS, количество, толщина и длина отростков ГБ не различались независимо от того, использовалась ли фотостимуляция или нет (таблица 1). Экспрессия ChR2 без фотостимуляции также не влияла на морфологию ГБ. Напротив, хроническая четырёхдневная ГБ<sup>ChR2</sup> фотостимуляция у мышей значительно увеличивала видимое количество иммунопозитивных отростков ГБ и их толщину (таблица 1), при этом длина отростков уменьшалась. Эти данные свидетельствуют о том, что хроническая специфическая оптогенетическая стимуляция ГБ приводит к характерным для астроглиоза изменениям.

После введения оптогенетической конструкции мышей стимулировали светом повторными импульсами в течение четырёх дней. Эффект хронической фотостимуляции отражает метаболический стресс клеток ГБ, вызванный мощной продолжительной стимуляцией. Активация ChR2 приводит к поступлению в цитоплазму натрия (рисунок 1). Из-

за сравнительно медленной кинетики натриевые токи, опосредованные ChR2, намного длиннее по сравнению с обычным потенциалом действия. Для восстановления ионного баланса клетки, в данном случае ГБ, вынуждены расходовать большие количества АТФ для питания Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-АТФазы и других ионных насосов. Кроме того, теоретически возможны другие эффекты, такие как изменения осмотического давления. Это должно вызвать необходимость в большом количестве энергии в клетке и, вероятно, со временем вызвать признаки атрофии, нарушение строения мембраны, цитоскелета и уменьшения размера клеток, что и было продемонстрировано (таблица 1).

Группа	Количество отростков ГБ	Длина отростков ГБ	Толщина отростков ГБ	
+PBS (свет-) (n=14/5)	14,7±0,6	199,4±4,6	1,6±0,0	
+PBS (cBet+) $(n = 12/3)$	13,0±0,6	190,0±2,9 <sup>→</sup>	1,6±0,0	
+GFAP-ChR2-mKate (cBer-) (n=16/7)	13,9±0,4	186,0±8,1	1,6±0,1	
+GFAP-ChR2-mKate (cBer+) (n=15/7)	18,4±0,5	150,8±3,6-	1,8±0,1-	

Таблица 1 – Морфология ГБ в модели селективного астроглиоза

В таблице представлены средние значения количества, длины и толщины отростков ГБ. Количество отростков считалось на 100µм длины слоя КП. \*\*\*, ††,⊀⊀ отмечено p<0,05. (Shuvaev et al., 2021)



Рисунок 1 – Нарушение функции ГБ в модели ГБ<sup>ChR2</sup>. Накопление в цитоплазме астроцитов Na<sup>+</sup> замедляет работу транспортёров ЕААТ, что приводит к накоплению нейромедиатора в синаптической щели и развитии эксайтотоксичности.

Кроме того, оптогенетическая сверхактивация и реактивность ГБ приводят к дегенерации КП. Четырёхдневная хроническая фотостимуляция ГБ<sup>ChR2</sup>, приводит к снижению антикальбиндиновой иммунореактивности КП. Наиболее очевидным признаком нейродегенерации КП была атрофия их дендритов, о чем свидетельствует уменьшение толщины МС (таблица 2). Количество КП также уменьшилась (таблица 2). Размер мембраны КП также уменьшился, о чем свидетельствует уменьшение ёмкости мембраны КП (таблица 3). Эти изменения напоминают первую модель – введение S100β в кору мозжечка также приводило к появлению реактивной ГБ, усилению ветвления и толщины отростков ГБ и дегенерации КП.

Таблица 2 – Морфология КП мышей,	инъецированных	PBS, AVV	GFAP-ChR2-mKate	с или
без хроническойфотостимуляции				

Группа	Толщина МС	Количество КП		
+PBS (свет-) (n=14/5)	170,2±5,8	8,4±0,5		
+PBS (cbet+)	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 (cBet+) (n=15/7)	139,3±5,0-	6,4±0,3-		

В таблице приведены средние значения меченых анти-кальбиндином КП, толщины МС. Количество КП считалось на 100µм длины слоя КП. \*\*\*отмечено p<0,001, ††,⊀≮ отмечено p<0,01. (Shuvaev et al., 2021)

Таблица 3 – Пассивные электрофизиологические свойства КП и свойства ПВ ВПСТ в мышах, инъецированных PBS, AVV GFAP-ChR2-mKate с или без хроническойфотостимуляции

Группа	Ёмкость (pF)	Ra (MΩ)	Rm (MΩ)	Амплитуда PF EPSC (pA)	Плотность PF EPSC (pA/pF)	PPF	Время нарастания (ms)	Время спада (т)
+PBS (свет-) (n=14/5)	766,2±49,1	13,7±1,1	193,0± 30,8	279,2± 39,1	0,4±0,1	1,5±0 ,1	2,5±0,3	17,0±2,2
+GFAP-ChR2- mKate(свет-) (n=24/9)	728,8±27,6	13,8±0,9	241,8± 58,4	359,3± 48,8	0,5±0,1	1,5±0 ,1	2,1±0,2	17,0±1,0
+GFAP-ChR2- mKate (свет+) (n=15/7)	526,2±27,8	13,8±0,7	260,5± 36,1	258,3± 29,0	0,5±0,1	1,6±0 ,1	2,6±0,2	19,3±1,3

\*\*\*отмечено p<0,001, ††отмечено p<0,01. (Shuvaev et al., 2021)

Также была создана модель селективного астроглиоза посредством специфического (экспрессия мутантного атаксина 1) раздражителя астроцитов коры мозжечка, чтобы исследовать прямое влияние реактивной ГБ на нейродегенерацию при СЦА1. В ГБ, экспрессирующей мутантный атаксин 1, был усилен анти-GFAP сигнал, что говорит о реактивации ГБ. По сравнению с данными от предыдущих моделей, мутантный атаксин 1 оказывал умеренное негативное влияние на морфологию ГБ после 9 недель экспрессии (таблица 4). Тем не менее, как показали дальнейшие эксперименты, экспрессия мутантного атаксина в ГБ влияет на функцию ГБ и оказывает влияние на соседние КП.

Группа	Количество отростков ГБ	Длина отростков ГБ	Толщина отростков ГБ
+PBS (n=14/3)	14,3±0,5	244,0±4,6	1,7±0,0
+GFAP-ATXN1[Q2]-Flag (n=15/3)	14,7±0,7	253,8±7,0	1,6±0,0
+GFAP-ATXN1[Q85]-Flag (n=15/3)	15,1±0,6	241,4±6,5	2,0±0,1 _

Таблица 4 – Морфология ГБ в модели астроглиоза вызванного экспрессией атаксина 1

В таблице представлены средние значения количества отростков на 100 µм, длины и толщины отростков ГБ. \*\*\*, †††, отмечено p<0,05. (Shuvaev et al., 2021)

#### Влияние реактивной глии на синаптическую передачу КП

Дендритное дерево каждой КП имеет тысячи синаптических соединений с параллельными волокнами и 1-2 синапса с лазающими волокнами (Llinás, Sugimori, 1992). Следовательно, нарушение морфологии дендритов может привести к изменению синаптической передачи КП. Кроме того, одной из функций астроцитов является обратный захват нейромедиаторов из синаптической щели, следовательно, астроглиоз также может оказывать влияние на синаптическую передачу. Для того чтобы проверить влияние активированной ГБ мы регистрировали такие электрофизиологические характеристики клеток, как ПВ ВПСТ, PPF, DSE, LTD.

В модели неселективного астроглиоза, вызванного введением белка S100 $\beta$  наблюдалось изменение кинетики ПВ ВПСТ – увеличивалось время нарастания и уменьшалось время спада ВПСТ. Время нарастания ПВ ВПСТ у мышей, которым вводили S100 $\beta$ , было увеличено до 2,7±0,1 мс (n = 35/8) по сравнению с 2,3±0,1 мс (n = 36/9) у мышей, которым вводили PBS (p=0,028). Время спада ПВ ВПСТ у мышей, которым вводили PBS, составляло 21,6±1,5 мс (n = 37/9), а у мышей, которым вводили S100 $\beta$ , оно уменьшалось до 17,1±1,5 мс (n = 30/8) (p=0,04) (Belozor et al., 2019). Время нарастания и спада связано с количеством глутамата в синаптической щели. Наблюдаемые изменения в модели астроглиоза могут указывать на влияние S100 $\beta$  на захват глутамата астроцитами или на секрецию глутамата пресинапсом, например, через изменение секреции эндоканнабиноидов.

Для того чтобы проверить как изменяется функция астроцитов мы использовали флуороцитрат (FC) – ингибитор метаболизма астроцитов. Применение FC приводило к сильному угнетению возбуждающей передачи ПВ-КП, независимо от того, подвергалась ли ткань воздействию S100 $\beta$  или нет. Время нарастания ПВ ВПСТ у мышей, которым вводили PBS и S100 $\beta$ , увеличивалось после добавления FC. В группе PBS оно увеличилось с 2,3±0,2 мс до 2,7±0,2 мс (n = 12 клеток от 4 мышей, p=0,003), а в группе S100 $\beta$  оно увеличилось с 2,4±0,2 мс до 3,5±0,6 мс (n = 10 клеток от 3 мышей, p=0,003) (Belozor et al., 2019). Использование FC показало, что увеличение времени нарастания, вероятно, связано с нарушением цикла глутамат-глутамин в астроцитах, и, как следствие, уменьшением количества глутамата в синаптической щели. Хотя избыточное количество S100 $\beta$  не оказывает влияния на амплитуду ВПСТ, подобное изменение времени нарастания говорит, что введение S100 $\beta$  приводит к нарушению функции астроцитов.

В модели селективного астроглиоза через четыре дня фотостимуляции ГБ<sup>ChR2</sup> основные свойства синаптической передачи между ПВ и КП были относительно сохранены (таблица 3). Очевидно, что снижение ёмкости мембраны клетки, вызванное коллапсом ее дендритного дерева, влияет на регистрируемую ВПСТ. Чтобы обойти различия в размерах КП между группами, сравнивали т ВПСТ между КП с примерно сопоставимой ёмкостью мембраны, оцененной по «т пассивному». Этот анализ выявил пролонгацию т ПВ ВПСТ у животных, экспрессирующих ChR2, после хронической фотостимуляции (19,3±1,3 мс (n = 12/7) после хронической стимуляции ГБ<sup>ChR2</sup> и 15,5±0,9 мс (n = 16/9) без фотостимуляции, p=0,03). У

мышей, экспрессирующих GFAP-ATXN1[Q85]-Flag, также размер КП был уменьшен, а т ВПСТ с поправкой на размер клеток увеличился до  $23,3\pm2,7$  мс (n = 21/9) по сравнению с  $16,7\pm1,0$  мс (n = 13/8) у мышей, экспрессирующих ATXN1[Q2], p=0,04. Интересно, что селективная экспрессия мутантного атаксина у СЦА1 КІ животных приводила к аналогичному результату: т-спада ПВ ВПСТ увеличилось у СЦА1 КІ мышей, экспрессирующих ATXN1[Q154], до  $19,1\pm1,3$  мс (n = 12/9) по сравнению с  $14,7\pm0,8$ мс (n = 13/7) у мышей дикого типа, p=0,04 (Shuvaev et al., 2021). Удлинение т ПВ ВПСТ предполагает более длительное присутствие глутамата в синаптической щели и более длительное связывание с постсинаптическими рецепторами.

Большинство всех поглощений глутамата в синапсах ПВ-КП является результатом транспортеров возбуждающих аминокислот, расположенных на мембранах ГБ. Чтобы подтвердить, что удлинение  $\tau$  ВПСТ является следствием сниженной активности ЕААТ1, отвечающих за обратный захват глутамата ГБ, мы использовали их ингибитор – ТВОА. Также использовали низкую концентрацию уабаина, который должен предпочтительно воздействовать на транспортёры ГБ посредством нарушения градиента Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>, необходимого для усиления поглощения глутамата ЕААТ1 (Illarionova et al., 2014). Как и ожидалось, как ТВОА, так и низкая концентрация уабаина вызывали удлинение  $\tau$  ВПСТ, что аналогично результатам, полученным при хроническойфотостимуляции ГБ и при экспрессии мутантного атаксина 1.

При исследовании мышей, которым вводили PBS и S100 $\beta$ , мы обнаружили, что добавление TBOA значительно увеличивало т ПВ ВПСТ. У мышей, которым вводили PBS, т ПВ ВПСТ изменилось с 30,0±4,4 до 39,2±6,3 мс (n = 14 клеток от 5 мышей, p=0,039).У мышей, которым вводили S100 $\beta$ , увеличение было еще более значительным, с 19,2±2,7 мс до 34,6±7,1 мс (n = 12 клеток от 4 мышей, p=0,031) (Belozor et al., 2019). Применение TBOA не оказывало существенного влияния на амплитуду ПВ ВПСТ и время нарастания в мозжечке мышей, которым вводили PBS и S100 $\beta$ . Эти результаты демонстрируют, что избыточное внеклеточное накопление белка S100 $\beta$  не влияет на пресинаптическое высвобождение глутамата, однако, этот белок влияет на ускорение времени спада, что, скорее всего, отражает изменения в обратном захвате глутамата ГБ.

Было выявлено, что в мозжечке доминирует экспрессия EAAT1. Наблюдалось снижение экспрессии EAAT1 на всем протяжении отростков ГБ как в модели селективного астроглиоза после хронической фотостимуляции ГБ<sup>ChR2</sup> (рисунок 2А), так и в модели с селективной экспрессией ATXN1[Q85] (рисунок 2Б).



Рисунок 2 – Изменение экспрессии EAAT1. А – Сравнение количества анти-EAAT1 положительных пятен на разных участках длины отростков ГБ у мышей, инъецированных PBS, AVV GFAP-mKate-ChR2 без и с хронической фотостимуляцией. Б – Сравнение количества анти-EAAT1 положительных пятен на разных участках длины отростков ГБ у

мышей, экспрессирующих ATXN1[Q2] и ATXN1[Q85]. \*,†p < 0,05; \*\*, ††, ≯≯ p<0,01; \*\*\*, †††, ≯≯≯ p < 0,001. (Shuvaev et al., 2021)

Эти результаты показывают, что снижение количества EAAT1 является отличительной чертой поражения мозжечка в наших моделях астроцит-опосредованной нейродегенерации СЦА1.

# Нарушение синаптической пластичности в ПВ-ПК синапсах, окружённых реактивной ГБ и двигательные расстройства

Было показано, что при PPF изменение амплитуды второго ответа в паре связано также с пролонгированием времени восстановления ВПСТ (Zinebi et al., 2001). Время восстановления ВПСТ отражает период пребывания нейромедиатора в синаптической щели и, следовательно, зависит от нормального функционирования астроцитов.

Наши данные свидетельствуют о том, что S100β не влияет на пресинаптическое высвобождение глутамата, поскольку он существенно не изменял амплитуду ПВ ВПСТ и отношение PPF. Но при добавлении ТВОА у мышей, которым вводили S100β, наблюдалось небольшое снижение PPF, что подтверждает зависимость PPF от обратного захвата глутамата астроцитами.

В моделях селективного астроглиоза реактивная ГБ способствует изменению PPF (рисунок 4). В группе животных с ГБ<sup>ChR2</sup> без хронической фотостимуляции к 5-й минуте PPF значимо увеличивался и составлял 104,0±1,1% (p=0,002). У животных после четырёхдневной хронической фотостимуляции острая активация ГБ<sup>ChR2</sup> вызвала противоположный эффект – значительное понижение PPF к 5-й минуте (97,5±1,1%, p=0,04). К 5-й минуте этот коэффициент PPF значимо отличался по сравнению с мышами без хронической фотостимуляции (p=0,0013). Острое одноминутное раздражение светом у животных, экспрессирующих ATXN1[Q2]/ChR2, приводило к увеличению PPF относительно контрольного уровня до стимуляции с максимальным эффектом на 2-й минуте (104,7±1,4%, p=0,006; рисунок 4B). Острая фотостимуляция срезов, экспрессирующих ATXN1[Q85]/ChR2, вызывала уменьшение PPF с максимальным эффектом на 3-й минуте (95,3±2,0%, p=0,029) (Шуваев и др., 2021).

Во время активации нормальной ГБ происходит повышение обратного захвата нейромедиатора и усиление глутамат-глутаминового цикла, что приводит, в конечном итоге, к увеличению уровня глутамата в синаптических везикулах на пресинапсе и нарастанию со временем PPF (рисунок 3А). Реактивная глия теряет способность захватывать глутамат из синаптической щели и имеет противоположный эффект – со временем происходит уменьшение PPF (рисунки 3Б, 4В). Данный феномен связан, наиболее вероятно, с нарушенным градиентом Na<sup>+</sup> и неспособностью быстро удалить Na<sup>+</sup> и Ca<sup>2+</sup>, поступающие в цитозоль ГБ через ChR2 во время острой фотостимуляции.

Аналогичные изменения РРГ наблюдались и в трансгенной модели СЦА1.

Влияние S100β на кратковременную синаптическую пластичность оценивали с помощью DSE. При DSE сильная деполяризация приводит к Ca<sup>2+</sup>-зависимому высвобождению эндоканнабиноидов из КП, которые ретроградно активируют CB1-рецепторы на окончаниях ПВ. Активация CB1 ингибирует везикулярное высвобождение глутамата (Marsicano et al., 2003).

В модели неселективного астроглиоза DSE наблюдалось снижение амплитуды ПВ ВПСТ до 67–69% от контроля (рисунок 5), различий между двумя группами, которым вводили S100β и PBS не было.



Рисунок 3 – Изменение PPF в моделях астроглиоза. А – Графики флуктуации PPF у животных, инъецированных PBS до (слева) и после (в центре) острой фотостимуляции. Справа усреднённый график нормированных амплитуд в точке 2. Б – Графики флуктуации PPF у животных, инъецированных AVV GFAP-ChR2-mKate в ответ на острую фотостимуляцию без (слева) и после (в центре) хронической фотостимуляции. Справа усреднённый график нормированных амплитуд в точке 2. В – Графики флуктуации PPF мышей, экспрессирующих в ГБ ATXN1[Q2]/ChR2 (слева) и ATXN1[Q85]/ChR2 (в центре) в ответ на острую фотостимуляцию. Справа – усредненный график нормированных амплитуд в точке 2\* р < 0,05; \*\* р < 0,001; \*\*\* р < 0,001. (Шуваев и др.,2021)



Рисунок 4 – Влияние S100β на DSE в синапсах ПВ-КП. А – Средняя временная диаграмма нормированных амплитуд ПВ ВПСТ до и после деполяризации. Пунктирные и черные линии указывают на модель, подходящую для групп, которым вводили PBS и S100β, соответственно. Б – Сравнение амплитуд ПВ ВПСТ через 50 с после деполяризации. \* p< 0,05. (Belozor et al., 2019)

16

Таким образом, S100 $\beta$  не влиял на фазу индукции DSE, но восстановление после первоначальной депрессии происходило намного быстрее у мышей, инъецированных S100 $\beta$ . Через пятьдесят секунд после деполяризации амплитуда вернулась к 93,6±2,8% от контроля у мышей с S100 $\beta$  по сравнению с 83,9±2,7% у мышей, которым вводили PBS (p=0,03). У животных, которым вводили PBS, амплитуда ВПСТ полностью восстанавливалась до контрольного уровня примерно через 100 с после деполяризации, но в группе, инъецированной S100 $\beta$ , это занимало всего 60–70 с. Предсказанная скорость восстановления с помощью подгонки двойной кривой (показана сплошной и пунктирной линиями на рисунке 4A) привела к значительно более короткому периоду полувосстановления в группе S100 $\beta$  по сравнению с PBS.



Рисунок 5 – Влияние экспрессии мутантного атаксина 1 на DSE в синапсах ПВ-КП. Временная диаграмма усреднённых амплитуд ПВ ВПСТ до и после деполяризации. А – в модели селективного астроглиоза, вызванного экспрессией ATXN1[Q85]. Б – в трансгенной модели СЦА1 КІ. Амплитуды ПВ ВПСТ нормировали к значениям до деполяризации. \* p<0,05; \*\* p<0,01; \*\*\* p<0,001. (Shuvaev et al., 2022)

Более быстрое восстановление после DSE может быть результатом действия S100 $\beta$ , как хелатора Ca<sup>2+</sup>, так как свободный Ca<sup>2+</sup> сильно влияет на процесс высвобождения эндоканнабиноидов. Ещё одним возможным объяснением быстрого восстановления BПСТ является увеличение внеклеточной концентрации глутамата. Астроциты экспрессируют рецепторы CB1, которые активируются эндоканнабиноидами, выделяемыми нейронами, что приводит к увеличению Ca<sup>2+</sup> в них, что стимулирует высвобождение глутамата (Kano et al., 2009). Таким образом, при взаимодействии с пресинаптическими рецепторами CB1 эндоканнабиноиды вызывают синаптическую депрессию в стимулируемом нейроне, а при взаимодействии с рецепторами CB1 в астроцитах они косвенно приводят к синаптической потенциации (Navarrete, Araque, 2008; Rasooli-Nejad et al., 2014). Было показано ранее, что активированные астроциты выделяют во внеклеточное пространство большое количество белка S100 $\beta$ , который захватывается окружающими нейронами (Vig et al., 2006). Являясь хелатором Ca<sup>2+</sup>, S100 $\beta$  может оказывать решающее действие на самоподдерживающееся выделение Ca<sup>2+</sup>из депо, значительно укорачивая этот процесс.

Как было описано раньше, применение FC приводило к сильному угнетению возбуждающей передачи ПВ-КП, как у мышей, которым вводили PBS, так и у мышей, которым вводили S100 $\beta$ . FC уменьшил скорость восстановления амплитуды после DSE у мышей, инъецированных PBS: через 50 с после деполяризации он вернулся к 67,5±5,4% от контроля по сравнению с необработанными срезами, где он восстановился до 83,9±2,7%, p=0,025. Но практически не влиял на DSE у мышей, которым вводили S100 $\beta$  (восстановление амплитуды до 81,4±7,6% от контрольной, по сравнению с 93,6±2,8% в группе без добавления FC, p=0,181)

(Belozor et al., 2019). Вероятно, что с помощью FC мы выключили энергетические процессы, которые поддерживают Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATФазу и, тем самым, заблокировали функцию ГБ абсорбировать внеклеточный K<sup>+</sup> во время возбуждения нейрона. Повышенная концентрация внеклеточного K<sup>+</sup> является мощным стимулятором потенциал зависимых натриевых каналов, что и обусловливает более глубокую деполяризацию нейрона и более выраженное DSE. Скомпромитированная S100β реактивная ГБ, изначально имела нарушенное DSE. Это и нивелировало эффекты от добавления FC.

Аналогичные изменения в DSE были обнаружены и в модели с селективной экспрессией мутантного атаксина 1 в астроцитах и в трансгенной модели, что свидетельствует об общих механизмах. У мышей, экспрессирующих ATXN1[Q85], протокол DSE снижал амплитуду до  $66,7\pm7,3\%$  (n = 8 клеток от 4 мышей), что было меньше по сравнению с результатами от мышей, экспрессирующих ATXN1[Q2] ( $42,2\pm5,9\%$ , n = 7 клеток от 3 мышей), р = 0,044 (рисунок 5А). У трансгенных СЦА1 КІ мышей протокол DSE также снижал амплитуду значительно меньше (до  $84,6\pm4,2\%$ , n = 10 клеток от 3 мышей) по сравнению с диким типом ( $43,3\pm5,8\%$ , n = 10 клеток от 3 мышей), р<0,001) (рисунок 5Б).

В отличие от кратковременной пластичности, долговременная пластичность связана с транслокацией постсинаптических рецепторов. В головном мозге мозжечок является одной из структур, где LTD является формой нейропластичности. ПВ-КП LTD может играть решающую роль в моторном обучении, регулируя заключительную стадию мозжечковокортикальной интеграции. У контрольных мышей протокол LTD приводил к снижению амплитуды на  $62,4\pm4,2\%$  (группа с PBS) и  $53,14\pm10,3\%$  (ATXN1[Q2]),тогда как в модели селективного астроглиоза с экспрессией мутантного атаксина 1 наблюдалось снижение только до  $88,4\pm6,6\%$ , p<0,05. Аналогичные результаты наблюдались и у трансгенных СЦА1 KI мышей. Через 30 минут после раздражения у трансгенных мышей амплитуда снижалась до  $88,8\pm15,3\%$  от контрольной (6 клеток от 4 мышей), тогда как у дикого типа снижалась до  $63,7\pm10,6\%$  (7 клеток от 3 мышей), p=0,008 (Shuvaev et al., 2022).

Наблюдаемые в моделях изменения долговременной синаптической пластичности могут быть причиной возникновения атаксий. При оценке координации движений с помощью теста на вращающейся дорожке было выявлено нарушение движений у мышей, экспрессирующих ATXN1[Q85], сопоставимое с нарушениями двигательной активности в модели СЦА1КІ. На второй день у мышей, экспрессирующих ATXN1[Q85], время составляло 129,9±12,4 с (11 мышей) и у мышей, экспрессирующих ATXN1[Q2] – 176,6 ± 9,1 с (13 мышей), р=0,007). Аналогичные результаты наблюдались и в модели СЦА1 КІ, однако были более выраженными. На второй день у мышей СЦА1 КІ время составляло 79,6±4,8 с (11 мышей) и у дикого типа – 231,1±10,6 с (11 мышей), р<0,001 (Shuvaev et al., 2022).

Таким образом, в результате активации ГБ специфическими или неспецифическими раздражителями происходит нарушение градиента Na<sup>+</sup> в астроцитах, необходимого для работы ЕААТ. Из-за этого нарушается способность астроцитов к обратному захвату глутамата из синаптической щели, что обусловливает нарушение синаптической передачи и пластичности и способствует развитию эксайтотоксичности. Избыточная активация глутаматных рецепторов приводит к увеличению концентрации Ca<sup>2+</sup> и запуску апоптоза. В результате нарушение пластичности и потеря нейронов приводят к нарушению двигательной функции (рисунок б).



Рисунок 6 – Дополненная схема патогенеза СЦА1.

#### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Чтобы исследовать влияние активированных астроцитов на нейродегенерацию при СЦА1 мы использовали несколько моделей мышей: от общей модели нейродегенерации до более специфичных моделей заболевания СЦА1.

Астроглиоз в СЦА1 тесно коррелирует с началом и тяжестью заболевания и развивается до начала клинических проявлений. В наших моделях, повышенный уровень внеклеточного S100β, хроническая активация ГБ<sup>ChR2</sup> или экспрессия мутантного ATXN1[Q85] приводит к нарушению морфологии глии и нейронов и ведёт к изменению синаптической передачи. Эти результаты сопоставимы с данными, полученными от трансгенных моделей СЦА1. Эти модели позволяют изучить механизмы развития нейродегенерации на ранних стадиях заболевания.

Во всех случаях мы наблюдаем нарушение захвата глутамата из-за снижения экспрессии EAAT1, в результате чего нейромедиатор накапливается в синптической щели и может вытекать из неё, что приводит к развитию эксайтотоксичности и дегенерации КП. Перегрузка Na<sup>+</sup> и снижение активности Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATФазы в ГБ являются важными этапами нарушения обратного захвата глутамата, так как транспортёры возбуждающих аминокислот, используют градиент Na<sup>+</sup> для транспорта глутамата. Увеличение внутриклеточного Na<sup>+</sup> за счет повторного открытия ChR2 или избыточного S100 $\beta$  приводит к перегрузке цитозоля Na<sup>+</sup> и замедлению обратного захвата. Уменьшение синапсов КП, нарушение её морфологии и Ca<sup>2+</sup> сигнализации в клетке в наших моделях приводило к подавлению синаптической пластичности (PPF, DSE и LTD). Этим можно объяснить нарушение координации и двигательной активности наших модельных животных, так как LTD является молекулярной основой запоминания и формирования новых двигательных навыков.

Связь астроцитоза и нарушение поведения СЦА1 модельных животных в этой работе была показана впервые. Эти данные позволяют проводить дальнейшие исследования молекулярных механизмов нейродегенерации на разработанных моделях. Учитывая, что астроглиоз является объединяющим признаком различных нейродегенеративных заболеваний мозжечка, наши результаты подчеркивают необходимость разработки новых методов лечения, которые могли бы помочь справиться с эксайтотоксичностью, возможно, сосредоточив внимание на поглощении астроцитами глутамата.

#### выводы

1. Разработаны модели ранней стадии астроглиоза с использованием протоколов оптогенетики со специфическим раздражителем (экспрессией мутантного атаксина 1) и неспецифическим раздражителем (хроническая фотоактивация ГБ, экспрессирующей ChR2).

2. Избыточное количество белка S100 $\beta$ , хроническая фотоактивация ГБ<sup>ChR2</sup>, селективная экспрессия атаксина 1 в ГБ приводят к развитию астроглиоза. При астроглиозе число клеток ГБ и их отростков уменьшается, но происходит утолщение их отростков и появление новых в проксимальных отделах. Избыточная активация ГБ приводит к дегенерации КП: уменьшается количество КП, наблюдается атрофия дендритов КП, что приводит к уменьшению толщины МС. Инъекции S100 $\beta$  уменьшали толщину МС до 120,0±5,8 µм по сравнению с 150,7±6,3 µм у мышей, которым вводили PBS (p=0,002). Также уменьшение МС наблюдалось у животных после четырёхдневной фотостимуляции ГБ<sup>ChR2</sup> по сравнению с нестимулированной группой (p=0,005).

Об изменении размеров КП также свидетельствует уменьшение ёмкости мембраны КП. Ёмкости дендритов КП у мышей, которым вводили S100β, составляли 359,4±37,5 пФ, и 513,5±27,1 пФ в группе мышей, инъецированных PBS. Ёмкость сомы КП у мышей, которым вводили S100β, составляла 34,6±4,4 пФ, и 61,7±5,6 пФ в группе, получавшей PBS (p<0,001). После хронической фотоактивации ГБ<sup>ChR2</sup> ёмкость мембраны КП снизилась с 728,8±27,6 пФ до 526,2±27,8 пФ, p< 0,001.

3. Избыточная активация ГБ, независимо от специфичности раздражителя, влияет на синаптическую передачу в виде удлинения  $\tau$  ПВ ВПСТ вследствие нарушения обратного захвата нейромедиатора астроцитами из синаптической щели через снижение количества ЕААТ1.  $\tau$  ПВ ВПСТ у мышей после хронической стимуляции ГБ<sup>ChR2</sup> значительно длиннее (19,3±1,3 мс и 15,5±0,9 мс без фотостимуляции, p=0,03). Увеличение  $\tau$  ВПСТ наблюдалось и у мышей, экспрессирующих ATXN1[Q85], до 23,3±2,7 мс по сравнению с 16,7±1,0 мс у мышей, экспрессирующих ATXN1[Q2], p=0,04. Такие же результаты были и у СЦА1 КІ мышей, экспрессирующих ATXN1[Q154] (19,1±1,3 мс по сравнению с 14,7±0,8 мс у мышей дикого типа, p=0,04).

Нарушение функции астроцитов, уменьшение синапсов КП, нарушение морфологии и  $Ca^{2+}$  сигнализации в КП приводит к подавлению синаптической пластичности PPF, DSE и LTD в синапсах нейронов коры мозжечка, что приводит к нарушению двигательной активности. У животных после четырёхдневной хронической фотостимуляции острая активация  $\Gamma B^{ChR2}$  вызвала значительное понижение PPF к 5-й минуте (97,5±1,1%, p=0,04). Аналогично острая фотостимуляция срезов, экспрессирующих ATXN1[Q85]/ChR2, вызывала уменьшение PPF с максимальным эффектом на 3-й минуте (95,3±2,0%, p=0,029).

У мышей, экспрессирующих ATXN1[Q85] протокол DSE снижал амплитуду до  $66,7\pm7,3\%$ , что было меньше по сравнению с результатами от мышей, экспрессирующих ATXN1[Q2] ( $42,3\pm5,9\%$ ), p=0,044. У трансгенных СЦА1 КІ мышей протокол DSE также снижал амплитуду значительно меньше (до  $84,6\pm4,2\%$ ) по сравнению с диким типом ( $43,3\pm5,8\%$ , p<0,05).

Также экспрессия мутантного атаксина влияла и на LTD: у мышей, экспрессирующих ATXN1[Q85], через 30 минут амплитуда снижалась только до  $80,1\pm4,8$  %, тогда как у мышей, экспрессирующих ATXN1[Q2] снижалась до  $56,2\pm5,4$  %, p<0,05. Аналогичные результаты наблюдались и у трансгенных СЦА1 КІ мышей: амплитуда снижалась до  $88,8\pm15,3$ % от контрольной, у дикого типа снижалась –  $63,7\pm10,6$  %, p<0,05.

Мыши, экспрессирующие ATXN1 [Q85], демонстрировали нарушение двигательной активности: время до падения с вращающейся дорожки по сравнению с контрольной группой у них было ниже (129,9±12,4 с и 176,6±9,1 с соответственно, p<0,05). Аналогичные результаты наблюдались и в модели СЦА1 КІ, однако были более выраженными.

4. В патогенезе СЦА1 существенную роль играют астроциты, что позволяет использовать гиперактивацию ГБ в качестве методического приёма для создания новых моделей заболевания на экспериментальных животных.

#### Практические рекомендации

1. Максимально приближенная к течению заболевания трансгенная модель СЦА1 КI с неселективной экспрессией мутантного атаксина 1 не позволяет исследовать все звенья патогенеза и требует дополнительных более селективных моделей, связанных, к примеру, с воздействием на астроциты.

2. Оптогенетические протоколы стимуляции клеток астроглиальной природы в мозжечке могут быть рекомендованы в качестве базовой стратегии моделирования нейродегенеративного заболевания.

3. Модели животных, созданные с помощью AVV и LVV являются экспериментальными моделями для изучения механизмов нарушения нейродегенерации, вызванных дисфункцией астроцитов.

4. Изменение морфологии и функции астроцитов, наблюдаемое при СЦА1, является общим патогенетическим механизмом развития и для других нейродегенеративных заболеваний. Данный факт позволяет использовать полученные в исследованиях результаты для тестирования универсальной терапии нейродегенеративных заболеваний.

### СПИСОК НАУЧНЫХ РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

#### Публикации в рецензируемых научных изданиях

1. Extracellular S100b Disrupts Bergman Glia Morphology and Synaptic Transmission in Cerebellar Purkinje Cells / **O.S. Belozor**, D.A. Yakovleva, I.V. Potapenko [et al.] // Brain Sciences. – 2019. – Vol.9, №4. – P.80-98. (Scopus)

2. Population genetics of spinocerebellar ataxias caused by polyglutamine expansions / Shuvaev A.N., **Belozor O.S.**, Smolnikova M.V. [et al.] // Вавиловский журнал генетики и селекции = Vavilov Journal of Genetics and Breeding = Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektsii. – 2019. – Vol.23, №4. – P.473-481. (Scopus)

3. Влияние реактивной глии Бергмана на кратковременную синаптическую пластичность в моделях мозжечковой нейродегенерации, вызванной хронической активацией ChR2 и экспрессией мутантного атаксина-1 / Шуваев А.Н., Белозор О.С., Можей О.И.[идр.] // Анналы клинической и экспериментальной неврологии = Annals of Clinical and Experimental Neurology. – 2021. – Т.15, №1. – С.51-58. (ВАК)

4. Chronic optogenetic stimulation of Bergmann 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. [et al.] // Neurobiology of Disease. – 2021. – Vol.154, №105340. – P.1. (Scopus, WoS)

5. Антагонисты NMDA-рецепторов как потенциальные средства для лечения нейродегенеративных заболеваний мозжечка / Белозор О.С. Шуваев А.Н., Фрицлер Я.В. [и др.]

// Анналы клинической и экспериментальной неврологии = Annals of Clinical and Experimental Neurology. – 2021. – Т.16, №2. (**ВАК**)

6. Indirect Negative Effect of Mutant Ataxin 1 on Short- and Long-term Synaptic plasticity in Mouse knock-in Model of Spinocerebellar Ataxia type 1. Shuvaev A.N., Belozor O.S., Mozhei O. [et al.] // Cells. -2022. - T. 11, No 14. - C. 2247. (Scopus, WoS)

#### Публикации в иных изданиях

1. Роль кальция в формировании синаптической пластичности клеток Пуркинье мозжечка / Белозор О.С., Польников А.М., Потапенко И.В. [и др.] // Международный молодежный медицинский конгресс 2017. – Санкт-Петербург, Международный молодежный медицинский конгресс 2017. – 2017.

2. Роль NMDA рецепторов в развитии нейродегенерации мозжечка, вызванной хронической фотостимуляцией ChR2 в глии Бергмана / Белозор О.С., Шуваев А.Н. // Сборник трудов конференции "ОПТОГЕНЕТИКА+ 2020". – Санкт-Петербург, BBM. – 2020. – С.13-15.

#### СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АМРА-рецептор – рецептор α-амино-3-гидрокси-5-метил-4-изоксазолпропионовой кислоты CB1- каннабиноидные рецепторы

ChR2 – каналородопсин-2

DSE – вызванное деполяризацией подавление возбуждения

ЕААТ – транспортёр возбуждающих аминокислот

GFAP – глиальный фибриллярный кислый белок

LTD – долговременная депрессия

mKate – дальне-красный флуоресцентный белок

PPF – усиление парных импульсов

RT-PCR – полимеразная цепная реакция в реальном времени

ВПСТ – возбуждающие постсинаптические токи

ГБ – глия Бергмана

КП – клетки Пуркинье

МС – молекулярный слой

ПВ – параллельное волокно

СЦА1 – спиноцеребеллярная атаксия первого типа

ТВОА – трео-бета-бензилоксиаспартат