

Генетическая модель болезни двигательного нейрона у мышей линии B6SJL-Tg: новые данные о динамике двигательных нарушений и иммуногистохимических проявлений нейродегенеративного процесса

А.В. Ставровская¹, Д.Н. Воронков¹, Э.А. Артёмова², Б.В. Белугин², М.М. Шмаров², Н.Г. Ямщикова¹,
А.С. Гущина¹, А.С. Ольшанский¹, Б.С. Народицкий², С.Н. Иллариошкин¹

¹ФГБНУ «Научный центр неврологии»; Россия, 125367 Москва, Волоколамское шоссе, 80;

²ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России; Россия, 123098 Москва, ул. Гамалеи, 18

Контакты: Ставровская Алла Вадимовна, alla_stav@mail.ru

Введение. За последние несколько десятилетий изучение мутаций, связанных с болезнью двигательного нейрона, привело к разработке ряда трансгенных моделей этого заболевания на животных. Одной из известных причин семейной формы болезни двигательного нейрона являются мутации в гене, кодирующем Cu / Zn-супероксиддисмутазу 1 (SOD1). Линия мышей B6SJL-Tg (SOD1*G93A) экспрессирует мутантную форму данного гена и может рассматриваться как анимальная модель болезни двигательного нейрона.

Цель исследования — оценить двигательные функции, динамику выживаемости и морфологические изменения в спинном мозге трансгенных мышей B6SJL-Tg (SOD1*G93A).

Материалы и методы. В исследование было взято 31 животное с указанной мутацией, которым начиная с возраста 22 нед, раз в 2 нед проводили двигательные тесты «открытое поле» и «сужающаяся дорожка». Морфологические изменения в спинном мозге оценивали на промежуточных (26–35 нед) и поздних стадиях (40–45 нед). Иммуногистохимически выявляли нейрональные белки NeuN и PGP9.5, глиофибрилярный белок, циклонуклеотидфосфатазу (маркер олигодендроглии) и маркерный белок микроглии IBA1, для выявления митохондрий использовали антитела MTC02 к белку наружной мембраны.

Результаты. Двигательные нарушения появлялись в возрасте 24–26 нед и неуклонно прогрессировали, наблюдался восходящий парез задних, затем передних конечностей, что сопровождалось общей гипотрофией животных. Отмечена большая вариабельность в сроках появления симптомов и продолжительности жизни самцов по сравнению с самками. Нейродегенеративный процесс с поражением двигательных нейронов сопровождался активацией микро- и астроглии. Обнаружено резкое снижение иммунореактивности к митохондриальному маркеру MTC02.

Заключение. Полученные результаты демонстрируют особенности развития у мышей B6SJL-Tg (SOD1*G93A) комплекса двигательных и патоморфологических изменений, характерных для болезни двигательного нейрона. Уточнение тонкой динамики нейродегенеративного процесса у модельных животных имеет значение для мониторинга течения болезни при проведении доклинических испытаний новых лекарственных препаратов и методов генной терапии.

Ключевые слова: болезнь двигательного нейрона, ген SOD1, трансгенная модель, двигательные нарушения, иммуногистохимия, выживаемость

Для цитирования: Ставровская А.В., Воронков Д.Н., Артёмова Э.А. и др. Генетическая модель болезни двигательного нейрона у мышей линии B6SJL-Tg: новые данные о динамике двигательных нарушений и иммуногистохимических проявлений нейродегенеративного процесса. *Нервно-мышечные болезни* 2020;10(3):63–73.

DOI: 10.17650/2222-8721-2020-10-3-63-73



Genetic model of motor neuron disease in B6SJL-Tg mice: new data on the dynamics of motor symptoms and immunohistochemical manifestations of the neurodegenerative process

A. V. Stavrovskaya¹, D. N. Voronkov¹, E. A. Artyomova², B. V. Belugin², M. M. Shmarov², N. G. Yamshchikova¹, A. S. Gushchina¹,
A. S. Olshansky¹, B. S. Naroditskiy², S. N. Illarioshkin¹

¹Research Center of Neurology; 80 Volokolamskoye sh., Moscow 125367, Russia;

²N. F. Gamaleya National Research Center for epidemiology and microbiology, the Ministry of Health of Russia;
18 Gamaleya St., Moscow 123098, Russia

Introduction. Over the past several decades, the study of mutations associated with motor neuron disease has led to the development of a number of transgenic animal models of motor neuron disease. One of the causes of the familial form of this disorder is mutations

in the gene encoding Cu/Zn superoxide dismutase 1. The B6SJL-Tg (SOD1*G93A) mouse strain expresses a mutant form of human superoxide dismutase 1.

Aim of study. To assess motor functions, dynamics of survival, and morphological changes in the spinal cord of transgenic B6SJL-Tg (SOD1*G93A) mice.

Material and methods. In total, 31 animals have been studied. Starting from the age of 22 weeks, once every two weeks, the “open field” and “beam walking” motor tests were performed. The morphological changes in the spinal cord were evaluated at intermediate (26–35 weeks) and late stages (40–45 weeks). Neuronal proteins NeuN and PGP9.5, gliofibrillar protein, cyclonucleotide phosphatase (a marker of oligodendroglia) and a marker protein of microglia IBA1 were detected by immunohistochemistry; antibodies MTC02 to the outer membrane protein were used to detect mitochondria.

Results. Motor problems appeared at the age of 24–26 weeks and steadily progressed; one could see consistent paresis of the hindlimbs, then the forelimbs, which was accompanied by general hypotrophy of the animals. There was a greater variability in the timing of symptom onset and life expectancy in males compared to females. The neurodegenerative process with damage to motor neurons was accompanied by the activation of micro- and astroglia. A sharp decrease in immunoreactivity to the mitochondrial marker MTC02 was found.

Conclusion. The obtained results demonstrate new details of the development of a complex of motor and pathomorphological changes characteristic of motor neuron disease in B6SJL-Tg (SOD1*G93A) mice. Clarification of the fine dynamics of the neurodegenerative process in these animals is of great importance for monitoring the course of the disease during preclinical trials of new drugs and methods of gene therapy.

Key words: motor neuron disease, SOD1 gene, transgenic model, motor manifestations, immunohistochemistry, survival

For citation: Stavrovskaya A.V., Voronkov D.N., Artyomova E.A. et al. Genetic model of motor neuron disease in B6SJL-Tg mice: new data on the dynamics of motor symptoms and immunohistochemical manifestations of the neurodegenerative process. *Nervno-myshechnye bolezni = Neuromuscular Diseases* 2020;10(2):63–73. (In Russ.)

Введение

Болезнь двигательного нейрона (БДН) — объединяющий термин для группы тяжелых прогрессирующих нейродегенеративных болезней, сопровождающихся поражением клеток передних рогов спинного мозга и двигательных ядер черепных нервов ствола мозга, нередко в сочетании с вовлечением верхнего мотонейрона и других систем (например, комбинация БДН с лобно-височной деменцией). Самой распространенной и изученной формой БДН является боковой амиотрофический склероз (БАС). В этой группе выделяют также первичный боковой склероз, разные синдромы изолированного вовлечения нижнего мотонейрона различной локализации (синдром свисающих рук и др.), генетически обусловленные варианты спинальных мышечных атрофий [1]. В патогенез БАС и других форм БДН вовлечены многие клеточные процессы: нарушения метаболизма РНК, агрегация белков, дисфункция митохондрий, нарушение везикулярного движения и аксонального транспорта, окислительный стресс, эксайтотоксичность, нейротрофический дефицит и активация микроглии [2, 3].

До 95 % случаев БДН носят спорадический характер, семейные случаи составляют 5–10 % [4–6]. Одной из известных генетических причин заболевания являются мутации в гене, кодирующем фермент Cu/Zn-супероксиддисмутазу 1 (SOD1), которые найдены примерно в 20 % семей с БДН, однако роль этого гена в патогенезе спорадических случаев заболевания точно не определена [7]. Помимо генетических факторов, при БАС и других вариантах БДН имеет значение и комбинация определенных неблагоприятных средовых воздействий. К факторам риска относят мужской

пол и возраст старше 50 лет, контакт с пестицидами, тяжелыми и редкоземельными металлами, растворителями и пластмассами, а также тяжелую физическую нагрузку, травмы и др. [8, 9]. Среднее время от появления первых симптомов до постановки клинического диагноза составляет от 9 до 13 мес [10].

Сложность диагностики, особенно на ранней стадии болезни, отсутствие эффективных методов лечения и наметившаяся к настоящему времени тенденция к росту заболеваемости и омоложению возраста пациентов с БДН формируют серьезную медико-социальную проблему [11].

Все вышеперечисленное требует от исследователей продолжения разностороннего изучения этиологии и патогенеза, направленного на поиск новых путей терапии БДН. При этом большое значение приобретает создание и грамотное применение адекватных анимальных экспериментальных моделей, что позволяет разрабатывать и тестировать новые методы диагностики и патогенетической терапии данного заболевания.

Сегодня имеется большой выбор трансгенных моделей БДН [12]. Чаще других в исследованиях используются модели с мутацией в гене *SOD1*, а также и FUS-ассоциированные модели [13, 14].

Для разработки и подбора эффективной терапии БДН необходимо расширение представлений о развитии неврологической симптоматики и морфологических коррелятах клинических проявлений БАС у животных с мутацией *mSOD1*.

Цель исследования — провести комплексное изучение патологических изменений, развивающихся во времени у трансгенных мышей линии B6SJL-Tg (SOD1*G93A).

Задача — оценить двигательные функции и морфологические изменения в спинном мозге трансгенных мышей линии B6SJL-Tg (SOD1*G93A) на разных сроках развития патологии, а также динамику выживаемости мышей с данной моделью БДН.

Материалы и методы

В исследование взяты мыши линии B6SJL-Tg (SOD1*G93A), полученные из ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России в возрасте 5–7 нед ($n = 31$, из них 13 самок, 19 самцов). Генотипирование мышей проводили с помощью полимеразной цепной реакции по методике Jackson Laboratories, с праймерами для детекции трансгена (5'-CATCAGCCCTAATCC ATC TGA-3', 5'-CGCGACTAACAATCAAAGTGA-3') и внутреннего положительного контроля (5'-CTAGGCCAC AGAATTGAAAGATCT-3', 5'-GTAGGTGGAAATCT AGCATCATCC-3'). Животные содержались в виварии института при свободном доступе к пище, воде и 12-часовом чередовании суточной освещенности. Содержание животных и проведение экспериментов осуществляли в соответствии с международными правилами Guide for the Care and Use Of Laboratory Animals и соблюдением биоэтических норм [15].

Двигательные тесты

Тестирование поведения начали по достижении экспериментальными мышами возраста 22 нед и проводили с периодичностью 1 раз в 2 нед, взвешивали мышей 1 раз в неделю, число погибших животных отслеживали ежедневно.

Для оценки степени полученных двигательных и неврологических нарушений проводили тесты «открытое поле» и «сужающаяся дорожка».

Установка «открытое поле» представляла собой квадратный короб размером 40 × 40 см и высотой 20 см. Мышь помещали в центр и в течение 3 мин регистрировали двигательную активность с помощью системы видеонаблюдения за животными Any-maze (Stoelting, США).

Установка для изучения двигательных и неврологических нарушений «сужающаяся дорожка» («Открытая наука», Россия) представляла собой 2 планки, наложенные друг на друга, длиной 100 см. Ширина верхней планки — от 2 до 0,5 см, высота — 1 см, ширина нижней планки — от 4 до 2,5 см. На узком конце дорожки располагался короб (укрытие) со съемной крышкой и отверстием в передней панели, через которое животное могло проникнуть внутрь. Вся конструкция приподнята над полом на высоту 70 см. Экспериментальное животное должно пройти по верхней планке от начала дорожки до укрытия. Подсчитывалось число соскальзываний передними и задними конечностями при проходе по всей длине верхней планки и их процент от общего количества шагов.

Морфологическое исследование

Для морфологического исследования были взяты образцы спинного мозга мышей из каждой экспериментальной группы. На поздней и терминальной стадии патологического процесса в период 40–45 нед было взято для количественной оценки изменений 5 животных из группы G93A. Кроме этого, было взято 3 животных на промежуточных стадиях в период 26–35 нед. В контрольную группу было взято 4 животных линии BALB/C того же возраста. Мышей декапитировали, извлекали позвоночник и под бинокулярным микроскопом выделяли спинной мозг. Выделенные люмбальные и торакальные отделы спинного мозга фиксировали в 4 % формалине. После фиксации образцы пропитывали 30 % сахарозой, помещали в среду О.С.Т., затем на криостате Sakura TissueTek готовили срезы толщиной 12 мкм. Отбирали серийные срезы на уровне L3–L5. Для иммуногистохимического исследования использовали антитела к нейрональным белкам NeuN (ядерный нейрональный антиген) и PGP9.5 (карбоксил-концевая убиквитин гидролаза 1); к глиальным белкам GFAP (астроцитарный глиофибрилярный белок), CNP (циклонуклеотидфосфатаза — маркер олигодендроглии) и IBA1 (аллотрансплантатный воспалительный фактор-1, маркер микроглии). Для тепловой демаскировки антигенов срезы нагревали в пароварке в течение 15 мин, в Трис-ЭДТА буфере (Antigen retrieval solution, pH = 9,0, Nordic Biosite). Затем срезы инкубировали с первичными антителами. Связывание антител выявляли иммунофлуоресцентным методом, для чего применяли соответствующие вторичные антитела козы и осла, меченные флуорохромами CF488 и CF555 (Sigma). Для выявления митохондрий использовали мышинные моноклональные антитела к белку наружной мембраны MTC02 (Thermo Fisher) и полимерную пероксидазную систему детекции UltraVision (Thermo Fisher), хромоген — 3,3-диаминобензидин. Реакцию проводили в соответствии с рекомендациями производителя антител. Помимо этого, на свежемороженых срезах образцов *m. tibialis anterior* от 2 животных G93A и 2 животных BALB/C классическим гистохимическим методом по образованию формазана выявляли активность сукцинатдегидрогеназы (СДГ) [16].

Препараты исследовали и документировали под микроскопом Nikon Eclipse Ni-U. Для подсчета числа клеток и оценки интенсивности иммунофлуоресценции в вентральных рогах спинного мозга использовали программу NIS Elements. Оценку проводили не менее чем на 12 срезах с уровня L3–L5 на правой стороне спинного мозга от каждого животного, полученные данные усредняли.

Статистическая обработка данных

Результаты обрабатывали в программе Statistica 12.0, используя однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) с последующими внутригрупповыми

апостериорными сравнениями по критерию Фишера для неравных групп, а также критерий Манна–Уитни. Результаты представлены в виде среднего и стандартной ошибки ($M \pm SEM$) с указанием достоверности различий между сравниваемыми группами по изучаемым показателям. Статистически значимыми считали различия при $p < 0,05$.

Результаты

Наблюдение за экспериментальными мышами длилось около 50 нед. За этот период возраста 25 нед достигли все мыши в группе, но затем число живых животных неуклонно уменьшается и лишь 1 особь пережила срок 49 нед (рис. 1а).

На сроках 26–28 нед жизни появлялись парезы задних лап, сначала правой, затем левой, а к 33–34 нед – парезы передних лап в той же последовательности. Также у экспериментальных животных отмечалось снижение массы тела (рис. 1б). Для более наглядного отражения развивающихся у мышей нарушений на большинстве графиков представлены данные, полученные на 24, 28 и 32-й неделях жизни.

При тестировании мышей с моделью БАС в «открытом поле» выявлены снижение двигательной ак-

тивности в виде уменьшения пройденной дистанции, снижения скорости передвижения и значительное увеличение времени замирания (рис. 2).

В тесте «сужающаяся дорожка» статистически значимо различалось число соскальзываний задних конечностей по сравнению с передними во всех сессиях (рис. 3а). К 32-й неделе число соскальзываний задних конечностей увеличилось настолько, что появились значимые различия этого показателя относительно предыдущих тестирований, что расценено как прогрессирование болезни. Еще отчетливее это видно из рис. 3б, где представлено количество соскальзываний обеими левыми конечностями и обеими правыми конечностями изучаемых мышей.

Динамика двигательных нарушений и изменения общего состояния животных позволяют выделить несколько стадий развития патологического процесса. Так, I стадия (24–25 нед) характеризуется появлением шаткой, неуверенной походки при выполнении теста «сужающаяся дорожка» и увеличением времени замирания на дорожке, при этом у мышей сохраняется высокий уровень двигательной активности в «открытом поле», не изменяется масса тела по сравнению с предыдущими тестированиями, при внешнем осмотре нет

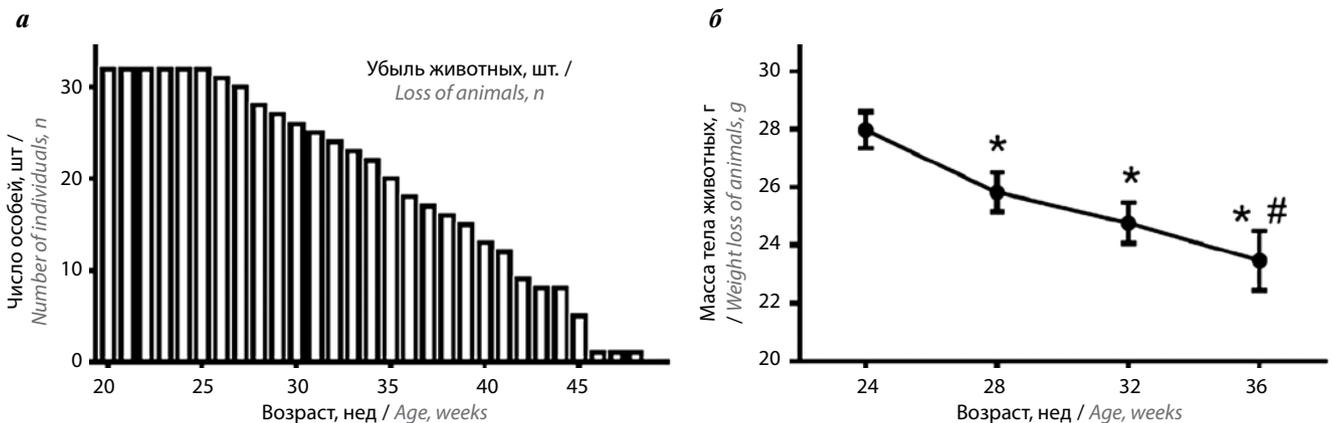


Рис. 1. Результаты исследования: а – динамика выживаемости, по оси ординат – число особей, по оси абсцисс – возраст; б – убыль веса животных, по оси ординат – масса тела, по оси абсцисс – возраст

Fig. 1. Research results: а – survival dynamics, ordinate – number of individuals, abscissa – age; б – weight loss of animals, ordinate – weight, abscissa – age

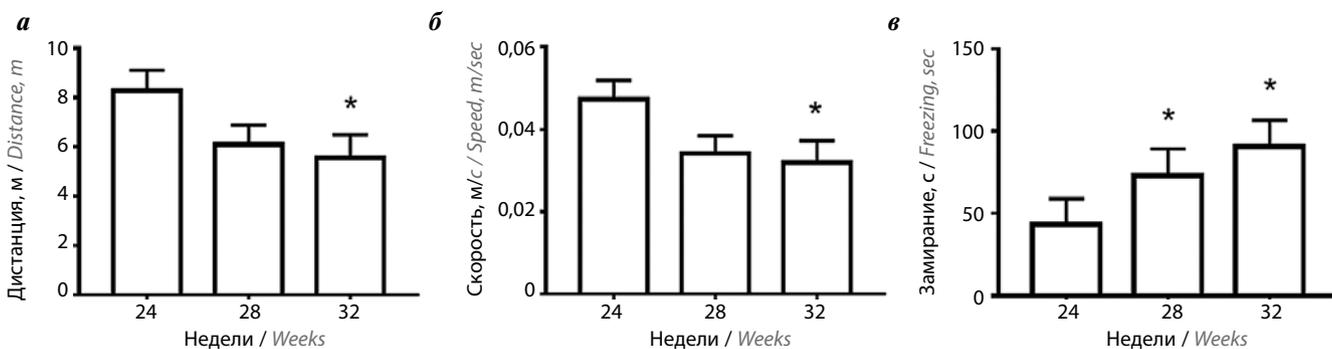


Рис. 2. Двигательная активность в «открытом поле»: а – пройденное расстояние; б – скорость; в – длительность замирания.

*Значимые отличия от 24 нед

Fig. 2. Locomotor activity in the “open field”: а – distance traveled; б – speed; в – freezing duration. *Significant differences from 24 weeks

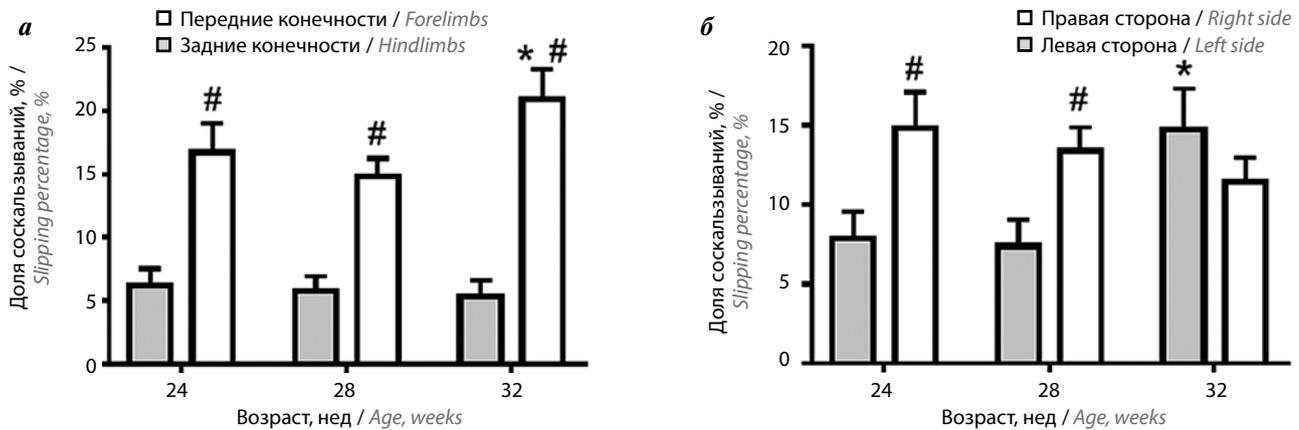


Рис. 3. Показатели в тесте «сужающаяся дорожка»: а – доля соскальзываний передних и задних конечностей относительно общего числа шагов по планке; б – доля соскальзываний правых и левых конечностей при прохождении планки.

*Значимые отличия с 24 нед; # – значимые отличия от доли соскальзываний слева

Fig. 3. Results of the “walking beam” test: а – the slippage proportion of the forelimbs and hindlimbs relative to the total number of steps on the bar; б – the slippage proportion of the right and left limbs when passing along the bar.

*Significant differences from 24 weeks; # – significant differences from the proportion of slippage on the left side

признаков болезни (вынужденной позы, взъерошенного шерстного покрова, порфириновых выделений). На II стадии (26–28 нед) развиваются парезы задних конечностей (рис. 4), в большинстве случаев сначала правой, изменение осанки животного («горбатость» или «сокращение длины туловища» как следствие ригидности мышц), снижение массы тела, поредение шерстного покрова. Однако животные могли выполнить оба двигательных теста, хотя и с меньшей скоростью передвижения и большим временем замирания, чем в предыдущих сессиях. На III стадии (33–36 нед) к перечисленным нарушениям присоединяются поочередно развивающиеся парезы передних конечностей, продолжается снижение массы тела, нарастает облысение, наблюдаются трофические изменения кожи. На этой стадии проведение двигательных тестов не имело смысла, хотя способность к минимальным передвижениям у экспериментальных животных еще сохранялась. Надо отметить, что у животных, погибших на 26–28-й неделе, не отмечено видимых неврологических нарушений, при том что некоторые животные с парезом трех конечностей оставались живы около 40 нед.

Динамика убыли животных в зависимости от пола представлена на рис. 5.

Иммунорфологическое исследование выявило дегенерацию нейронов у животных в поздней и терминальной стадиях развития процесса. Обнаружили статистически значимые изменения числа нейронов в вентральных рогах спинного мозга на уровне L3–L5. Плотность PGP9.5-позитивных нейронов у мышей G93A была ниже на 38 % относительно группы сравнения ($p = 0,0397$), что согласуется с результатами подсчета NeuN-позитивных клеток. Число NeuN-позитивных нейронов у мышей G93A в вентральных рогах спинного мозга также было ниже на 42 % по сравнению



Рис. 4. Характерный внешний вид животных на поздней стадии

Fig. 4. The characteristic appearance of animals at a late stage

с группой контроля ($p = 0,016$). Определяемый уровень экспрессии PGP9.5 обнаруживался не во всех нейронах, но выявляемые нейроны относились к разным типам, включая крупные альфа-мотонейроны, что совпадает с данными литературы [17]. В сохранных клетках изменения интенсивности окрашивания на PGP9.5 по сравнению с контрольной группой не выявлено, но средний размер сохранных PGP9.5-позитивных нейронов у мышей G93A был меньше ($p < 0,031$), что можно связать с преимущественным повреждением крупных мотонейронов.

Наблюдавшаяся в группе G93A асимметрия двигательных нарушений проявлялась и при морфологическом исследовании: на стороне повреждения визуально

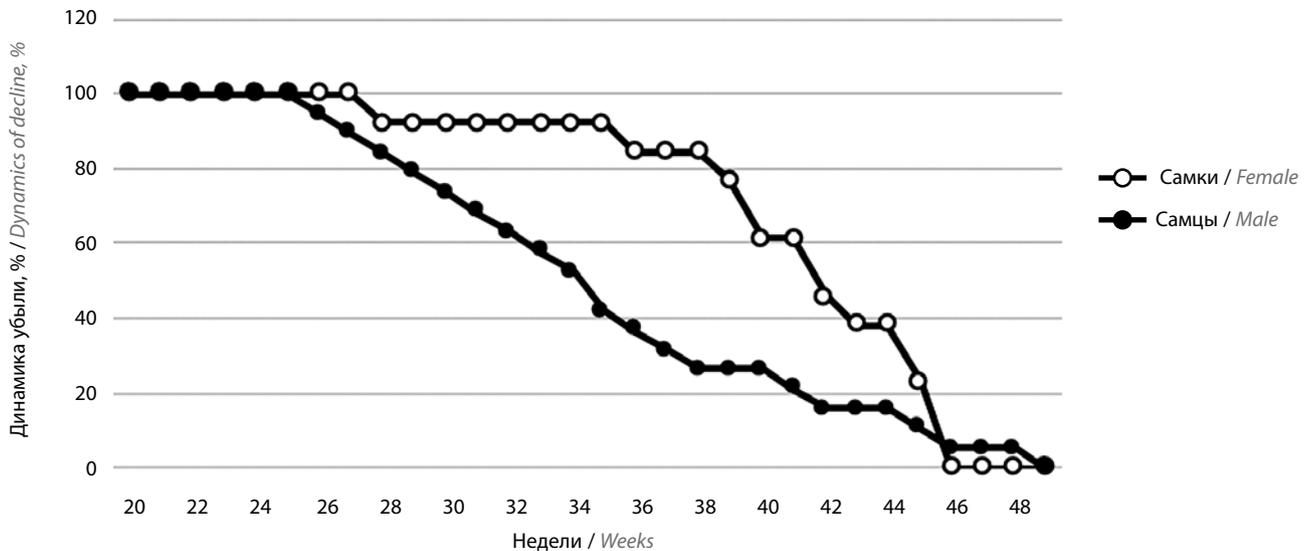


Рис. 5. Различия в динамике убыли самцов и самок мышей G93A за время наблюдения

Fig. 5. Differences in male and female G93A mice survival time

отмечали не только большее выпадение мотонейронов, но и более интенсивную глиальную реакцию в вентральных рогах спинного мозга (рис. 6). Локализация митохондриального маркера МТС02 демонстрировала отчетливую связь с выраженностью двигательных нарушений (см. рис. 5). Так, в контрольной группе серое вещество спинного мозга характеризовалось диффузным окрашиванием, более плотным в нейропиле и телах нейронов. У мышей G93A, имевших разную степень развития двигательных нарушений, интенсивность окрашивания на МТС02 снижалась, причем неравномерно и более выражено в люмбальных отделах спинного мозга, а в терминальной стадии белок выявлялся преимущественно в микроглии. С помощью антител к IBA1 у мышей G93A обнаружили резкие изменения морфологии микроглии, связанные с ее активацией, — гипертрофию, утолщение и уменьшение числа отростков и повышение плотности клеток на 90 % относительно контроля ($p = 0,016$). Протоплазматические GFAP-позитивные астроциты серого вещества также были гипертрофированы, а интенсивность окрашивания на GFAP была выше по сравнению с контрольной группой ($p = 0,016$). Вместе с тем не выявлено значимых изменений интенсивности окрашивания на белок олигодендроглии CNP у мышей G93A ($p = 0,077$).

В дополнение к изменениям в спинном мозге у мышей G93A обнаружили и характерные изменения в мышцах. Гистохимическое исследование показало усиление окрашивания на СДГ в биоптатах *m. tibialis anterior* (рис. 7), что отражает увеличение гликолитической активности. Изменение типа обмена мышечных волокон и переход скелетных мышц на окислительный метаболизм связывают в большей степени с митохондриальными нарушениями, но не с нарушениями иннервации [18].

Обсуждение

За последние несколько десятилетий изучение генетических мутаций, связанных с БДН, привело к разработке ряда трансгенных моделей заболевания на животных. Внедрение трансгенных моделей в экспериментальную практику способствовало значительному прогрессу в изучении БДН. Получение дополнительных данных о моделях, более детальное изучение развивающихся у животных гистологических, неврологических и поведенческих патологий позволит правильно выбрать и адекватно использовать для задач конкретного эксперимента ту или иную модель, наиболее соответствующую поставленной цели исследования.

У изучаемой нами в данной работе линии мышей B6SJL-Tg (SOD1*G93A) наблюдалось развитие нейродегенеративного процесса с избирательным поражением двигательных нейронов. Начальные стадии болезни протекали бессимптомно, двигательные нарушения появлялись в возрасте 24–26 нед, что согласуется с результатами, полученными в других работах, затем отмечался неуклонный прогресс изменений, наблюдалось последовательное развитие пареза задних, затем передних конечностей, что сопровождалось общей гипотрофией [14]. Также была отмечена большая вариабельность в сроках появления первых симптомов и продолжительности жизни мышей-самцов, чем у самок. Самки мышей дольше самцов сохраняли видимое здоровье, первые симптомы заболевания появились сразу у большей части группы и гибель животных носила обвальнй характер.

Перечисленные особенности: отсутствие явно выраженной доклинической стадии при протекающем нейродегенеративном процессе в мотонейронах, быстрое нарастание двигательных нарушений и мышечных

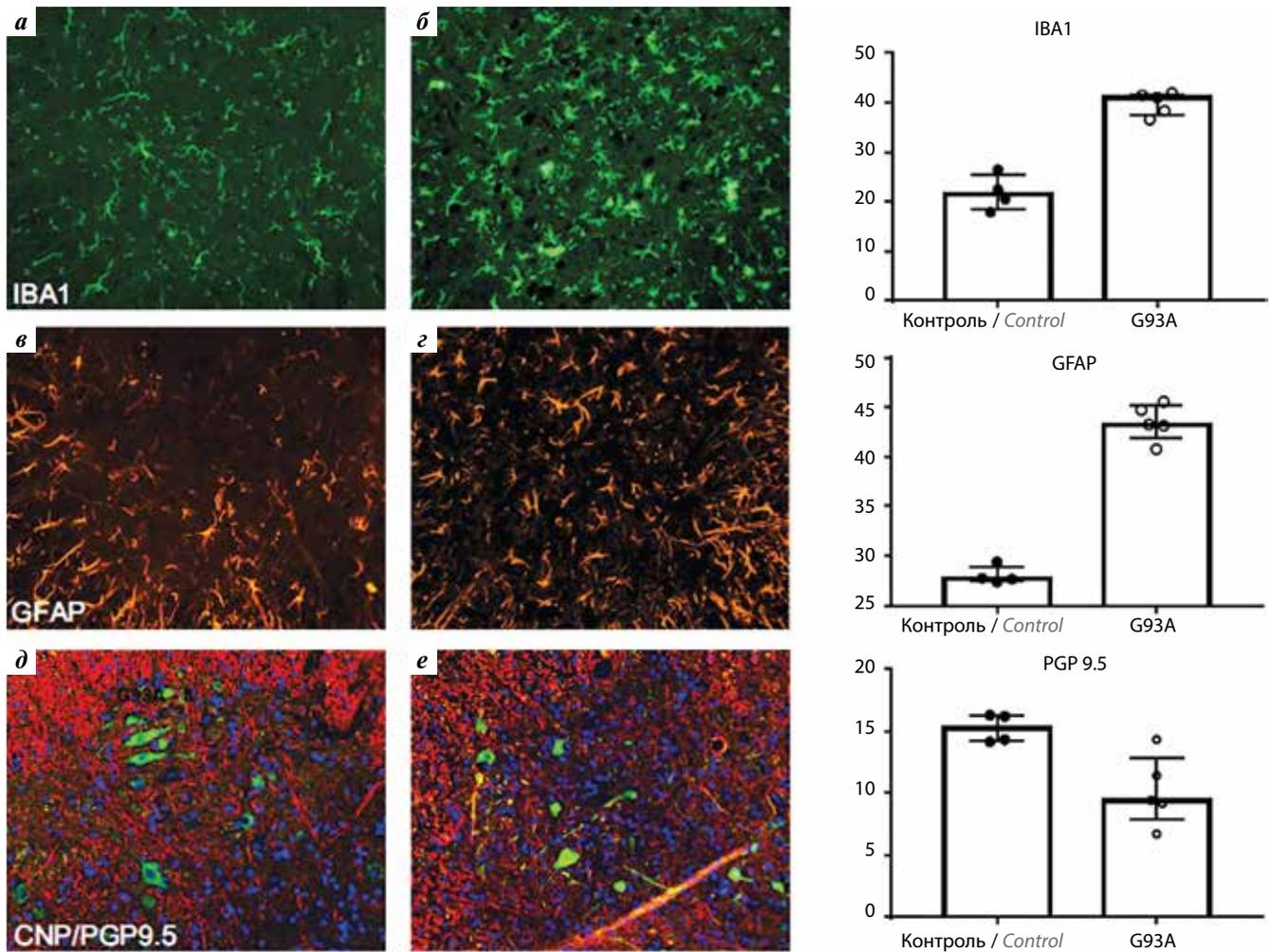


Рис. 6. Изменения в вентральных рогах спинного мозга у мышей линии G93A в поздней стадии патологического процесса: а, б – активация микроглии (иммуноокрашивание на IBA1), график – изменение плотности IBA1-позитивных клеток; в, г – астроглиоз (окрашивание на GFAP), график – изменение интенсивности окрашивания на GFAP (в условных единицах яркости); д, е – повреждение мотонейронов (окрашивание на PGP9.5, зеленым) и отсутствие изменений окрашивания на циклонуклеотидфосфатазу (красным)

Fig. 6. Changes in the ventral horn of the spinal cord in G93A mice in the late stage of the pathological process: а, б – activation of microglia (immunostaining for IBA1), graph – change in the density of IBA1-positive cells; в, г – astrogliosis (staining for GFAP), graph – change in the intensity of staining for GFAP (in arbitrary units of brightness); д, е – damage to motor neurons (staining for PGP9.5, green) and no changes in staining for cyclonucleotide phosphatase (red)

атрофий, – свидетельствуют о схожести наблюдаемого течения болезни у модельных мышей с течением БДН (и его наиболее распространенной формы – БАС) у человека.

Линия SOD1-G93A экспрессирует мутантную форму человеческой СДГ 1 (SOD1) с заменой глицина на аланин в позиции 93 [19]. Среднее время развития паралича у линии TgN [SOD1-G93A] 1Gur с отсроченным развитием болезни составляет 189–252 дня [20]. Примерно у 20 % пациентов с семейной формой БДН обнаруживаются мутации SOD1. Разнообразные мутации в гене SOD1 приводят к фенотипически идентичным проявлениям заболевания, и причиной гибели нейронов служит не потеря функции фермента СДГ, а нарушение фолдинга фермента и токсичность его мутантных форм. Патогенетическое значение агрегации SOD1 и образования внутринейрональных SOD1-позитивных включений остается противоречивым. Показано, что мутантные формы SOD1 повреждают нейроны, однако процесс агрегации патологического белка и перевод его в нерастворимую форму, по мнению некоторых авторов, играет нейропротекторную роль [21, 22].

Обнаруживаемая дегенерация в вентральных рогах спинного мозга у линии SOD1-G93A коррелирует с развитием двигательных симптомов [20]. В нашей работе средний размер сохранившихся нейронов вентральных рогов спинного мозга у мышей G93A был ниже по сравнению с контролем, что свидетельствует о поражении мотонейронов. По данным литературы, снижение числа нейронов и их размеров в большей степени связано с повреждением крупных альфа-мотонейронов, тогда как гамма-мотонейроны остаются сохранными [23]. Молекулярные основы преимущественного повреждения

ттивных включений остается противоречивым. Показано, что мутантные формы SOD1 повреждают нейроны, однако процесс агрегации патологического белка и перевод его в нерастворимую форму, по мнению некоторых авторов, играет нейропротекторную роль [21, 22].

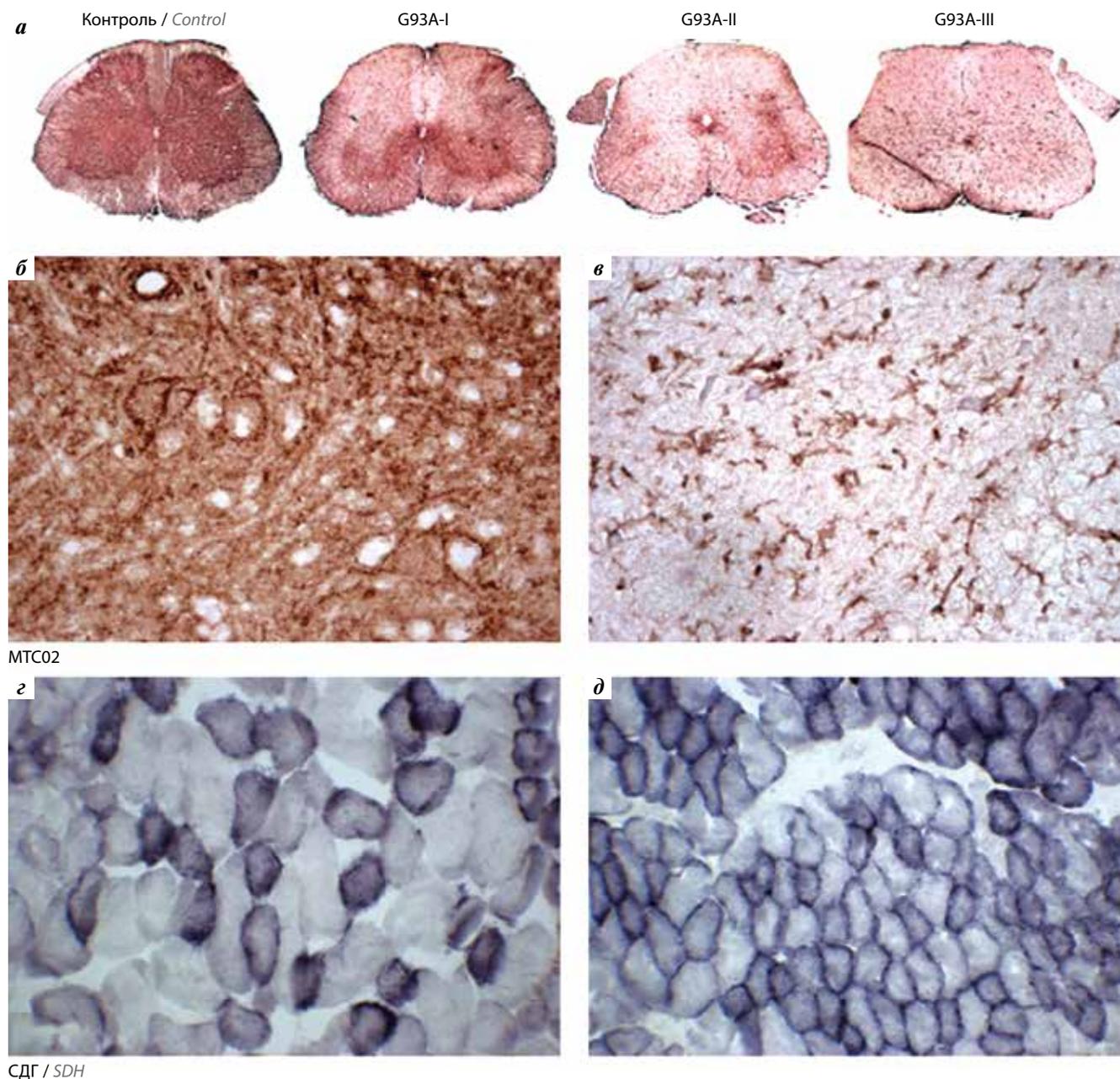


Рис. 7. Митохондриальные изменения в спинном мозге на уровне L3–L4 и в *m. tibialis anterior* мышей G93A: а–в – изменение локализации и снижение иммуноокрашивания на MTC02 в спинном мозге мышей G93A. G93A-I, II, III – срезы получены от животных с разной выраженностью двигательных нарушений (от более легкой – к более тяжелой); г, д – гистохимическая активность СДГ, демонстрирующая переход скелетных мышц на окислительный метаболизм у мышей G93A. СДГ – сукцинатдегидрогеназа

Fig. 7. Mitochondrial changes in the spinal cord at the L3–L4 level and in *m. tibialis anterior* of G93A mice: а–в – changes in localization and reduced immunostaining for MTC02 in the spinal cord of G93A mice. G93A-I, II, III – sections were obtained from animals with different severity of movement abnormalities (from lighter to more severe); г, д – histochemical activity of succinate dehydrogenase demonstrating the transition of skeletal muscles to oxidative metabolism in G93A mice. SDH – dehydrogenase succinate

мотонейронов определенных типов при БАС неясны, и, вероятно, важную роль в этом процессе играет характер синаптических связей отдельных типов нейронов – их возбуждающих влияний и выделения нейронами нейротрофических факторов [23, 24]. Интересно, что наше исследование не выявило изменений иммуноокрашивания на PGP9.5 в сохранных нейронах по сравнению с контролем, что может быть связано

со стабильной работой убиквитин-протеасомной системы в них. Предполагают, что изменения активности PGP9.5 – убиквитин С-концевой гидролазы могут быть ассоциированы с агрегацией патологических белков, например при синуклеинопатиях [25]. В цереброспинальной жидкости пациентов с БАС обнаруживается повышенное содержание пептидных фрагментов этого белка, однако его роль при БДН не изучена [26].

Митохондриальная дисфункция при БДН включает нарушение окислительного фосфорилирования, аккумуляции кальция, избыточную продукцию активных форм кислорода и нарушение митохондриальной динамики [27]. На ультраструктурном уровне отмечаются вакуолизация, набухание и фрагментация митохондрий, дезорганизация крист уже на начальных стадиях процесса [28, 29]. Мутантные формы SOD1 непосредственно повреждают митохондрии, формируя нерастворимые агрегаты на поверхности внешней мембраны. Показано взаимодействие мутантной SOD1, например с проапоптотическими белками семейства Bcl-2 [30]. Резкое снижение иммунореактивности к митохондриальному маркеру MTC02, выявленное в нашей работе, демонстрирует выраженные митохондриальные нарушения не только в нейронах, но и в глиальных клетках [31]. Вместе с тем полученным результатам сложно дать функциональную интерпретацию в связи с отсутствием данных о функциях 60 кДа негликозилированного митохондриального белка, выявляемого антителами MTC02, что указывает на необходимость дальнейшего исследования. Ранее сообщалось о снижении митохондриального импорта и содержания в митохондриях ряда белков в спинном мозге мышей с мутациями в SOD1 [32].

Хотя БДН характеризуется преимущественно дегенерацией моторных нейронов, данное заболевание является многофакторным, затрагивающим многие типы клеток. Патологические изменения астроцитов и микроглии ведут к нарушению взаимодействий с нейронами, а провоспалительные факторы, выделяемые

активированной глией, усиливают нейродегенерацию. Дисфункцию микро- и астроглии рассматривают как отдельное звено патогенеза заболевания [33]. Так, делеция мутантной SOD1 в астроцитах и микроглии [34, 35] замедляет развитие заболевания, а мутантные по SOD1 глиальные клетки, наоборот, приводят к повреждению двигательных нейронов *in vitro* и *in vivo* [36, 37]. Известно, что олигодендроглия также подвергается дегенерации и накоплению патологических включений у мышей SOD1 G93A [38]. При этом число олигодендроцитов остается неизменным в результате усиленного деления и дифференцировки их предшественников [38, 39]. Эти данные согласуются с отсутствием снижения окрашивания на циклонуклеотидфосфатазу в олигодендроцитах. Вместе с тем очевидно, что характерное для мышей SOD1-G93A снижение содержания миелина, обнаруживаемое уже на досимптомных стадиях, не связано с уменьшением числа олигодендроцитов, но отражает их функциональную недостаточность [40].

Таким образом, полученные результаты демонстрируют развитие у мышей G93A комплекса двигательных и патоморфологических изменений, характерных для БДН. Наиболее чувствительным двигательным тестом в нашем исследовании оказался тест «сужающаяся дорожка». В целях тестирования перспективных лекарственных средств с нейропротективным потенциалом и новых методов разрабатываемой сегодня генной терапии патоморфологическая оценка изменений у мышей G93A должна включать, помимо исследования состояния нейронов спинного мозга, всестороннюю оценку активации микроглии и астроглии.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Завалишин И.А., Захарова М.Н. Боковой амиотрофический склероз Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова 1999;4:60–4. [Zavalishin I.A., Zakharova M.N. Amyotrophic lateral sclerosis. Zhurnal nevrologii i psikiatrii im. S.S. Korsakova = Journal of neurology and psychiatry named after S.S. Korsakov 1999;4:60–4. (In Russ.)].
2. Brenner D., Weishaupt J.H. Update on amyotrophic lateral sclerosis genetics. Curr Opin Neurol 2019;32(5):735–9. DOI: 10.1097/WCO.0000000000000737. PMID: 31335339.
3. Burk K., Pasterkamp R.J. Disrupted neuronal trafficking in amyotrophic lateral sclerosis. Acta Neuropathol 2019;137(6): 859–77. DOI: 10.1007/s00401-019-01964-7. PMID: 30721407.
4. Andersen P.M. Genetics of sporadic ALS. Amyotrophic lateral sclerosis and other motor neuron disorders 2001;2(1):37–41. DOI: 10.1080/14660820152415726. PMID: 11465923.
5. Иллариошкин С.Н. Генетика бокового амиотрофического склероза. В кн.: Боковой амиотрофический склероз. Руководство для врачей Под. ред. И.А. Завалишина. М.: Евразия плюс, 2007. С. 229–255. [Illarioshkin S.N. Genetics of lateral amyotrophic sclerosis. In book: Lateral amyotrophic sclerosis. Guide for doctors. Ed. by I.A. Zavalishin. M.: Eurasia plus, 2007. P. 229–55. (In Russ.)].
6. Andersen P.M., Al-Chalabi A. Clinical genetics of amyotrophic lateral sclerosis: what do we really know? Nat Rev Neurol 2011;7:603–15. DOI: 10.1038/nrneurol.2011.150. PMID: 21989245.
7. Rosen D.R., Siddique T., Patterson D. et al. Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. Nature 1993;362(6415):59–62. DOI: 10.1038/362059a0. PMID: 8446170.
8. Скворцова В.И., Смирнов А.П., Алехин А.В., Ковражкина Е.А. Факторы риска бокового амиотрофического склероза: исследование «случай-контроль». Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова 2009;109(2): 69–72. PMID: 19385123. [Skvortsova V.I., Smirnov A.P., Alekhin A.V., Kovrazhkina E.A. Risk factors of lateral amyotrophic sclerosis: a case-control study. Zhurnal nevrologii i psikiatrii im. S.S. Korsakova = Journal of neurology and psychiatry named after S.S. Korsakov 2009;109(2):69–72 (In Russ.)].
9. Brown R.C., Lockwood A.H., Sonawane B.R. Neurodegenerative diseases: an overview of environmental risk factors environ health perspect 2005;113:1250–6. DOI: 10.1289/ehp.7567. PMID: 16140637.
10. Cellura E., Spataro R., Taiello A.C., La Bella V. Factors affecting the diagnostic delay in amyotrophic lateral sclerosis. Clin Neurol Neurosurg 2012;114(6):550–4. DOI: 10.1016/j.clineuro.2011.11.026. PMID: 22169158.
11. Васильев А.В. Клинико-биохимические особенности бокового амиотрофического склероза у лиц молодого

- возраста. Автореф. дис. ... канд. мед. наук. Москва, 2008. 30 с. [Vasiliev A.V. Clinical and biochemical features of amyotrophic lateral sclerosis in young people. Avtoref. dis. ... kand. med. nauk. Moscow, 2008. 30 p. (In Russ.)].
12. Мухамедьяров М.А., Петров А.М., Григорьев П.Н. и др. Боковой амиотрофический склероз: современные представления о патогенезе и экспериментальные модели. Журнал высшей нервной деятельности им. И.П. Павлова 2018;68(5):551–66. [Mukhamediarov M.A., Petrov A.M., Grigoryev P.N. et al. Amyotrophic Lateral Sclerosis: Modern Views on the Pathogenesis and Experimental Models. Zhurnal vysshei nervnoi deiatelnosti im. I.P. Pavlova = Journal of higher nervous activity named after I.P. Pavlova 2018;68(5):511–66. (In Russ.)]. DOI: 10.1134/S0044467718050106.
 13. Kong J., Xu Z. Massive mitochondrial degeneration in motor neurons triggers the onset of amyotrophic lateral sclerosis in mice expressing a mutant SOD1. *J Neurosci* 1998;18(9):3241–50. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.18-09-03241.1998. PMID: 547233.
 14. Дейкин А.В. Ковражкина Е.А. Овчинников Р.К. и др. Модель бокового амиотрофического склероза на основе линии трансгенных мышей, экспрессирующих мутантную форму FUS белка человека. Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова 2014;114(8):62–9. PMID: 25345633. [Deikin A.V., Kovrazhkina E.A., Ovchinnikov R.K. et al. A mice model of amyotrophic lateral sclerosis expressing mutant human FUS protein. Zhurnal nevrologii i psikiatrii im. S.S. Korsakova = Journal of neurology and psychiatry named after S.S. Korsakov 2014;114(8):62–9. (In Russ.)].
 15. Каркищенко Н.Н., Грачев С.В. Руководство по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских исследованиях. Москва: Профиль, 2010. 358 с. [Karkishchenko N.N. Guide for laboratory animals and alternative models in biomedical research. Moscow: Profil', 2010. 358 p. (In Russ.)].
 16. Lillie R.D., Fullmer H.M. Histopathologic technic and practical histochemistry. New York: McGraw-Hill, 1976. 942 p.
 17. Genç B., Lagrimas A.K.B., Kuru P. et al. Visualization of sensory neurons and their projections in an upper motor neuron reporter line. *PLoS One* 2015;10(7):e0132815. DOI: 10.1371/journal.pone.0132815. PMID: 26222784.
 18. Scaricamazza S., Salvatori I., Giacobazzo G. et al. Skeletal-muscle metabolic reprogramming in ALS-SOD1G93A mice predates disease onset and is a promising therapeutic Target. *iScience* 2020;23(5):101087. DOI: 10.1016/j.isci.2020.101087. PMID: 32371370.
 19. Gurney M., Pu H., Chiu A. et al. Motor neuron degeneration in mice that express a human Cu,Zn superoxide dismutase mutation. *Science* 1994;264(5166):1772–5. DOI: 10.1126/science.8209258. PMID: 8209258.
 20. Feeney S.J., McKelvie P.A., Austin L. et al. Presymptomatic motor neuron loss and reactive astrocytosis in the SOD1 mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Muscle Nerv* 2001;24(11):1510–9. DOI: 10.1002/mus.1176. PMID: 29234096.
 21. Ayers J.I., McMahon B., Gill S. et al. Relationship between mutant Cu/Zn superoxide dismutase 1 maturation and inclusion formation in cell models. *J Neurochem* 2017;140(1):140–50. DOI: 10.1111/jnc.13864. PMID: 27727458.
 22. Gill C., Phelan J.P., Hatzipetros T. et al. SOD1-positive aggregate accumulation in the CNS predicts slower disease progression and increased longevity in a mutant SOD1 mouse model of ALS. *Sci Rep* 2019;9(1):6724. DOI: 10.1038/s41598-019-43164-z. PMID: 26222784.
 23. Lalancette-Hebert M., Sharma A., Lyashchenko A.K., Shneider N.A. Gamma motor neurons survive and exacerbate alpha motor neuron degeneration in ALS. *Proc Natl Acad Sci* 2016;113(51):E8316–25. DOI: 10.1073/pnas.1605210113. PMID: 27930290.
 24. Falgairolle M., O'Donovan M.J. Motoneuronal spinal circuits in degenerative motoneuron disease. *Front Mol Neurosci* 2020;13. DOI: 10.3389/fnmol.2020.00074. PMID: 32523513.
 25. Liu Y., Fallon L., Lashuel H.A. et al. The UCH-L1 gene encodes two opposing enzymatic activities that affect α -synuclein degradation and Parkinson's disease susceptibility. *Cell* 2002;111(2):209–18. DOI: 10.1016/S0092-8674(02)01012-7. PMID: 12408865.
 26. Zhu S., Wuolikainen A., Wu J. et al. Targeted multiple reaction monitoring analysis of CSF identifies UCHL1 and GPNMB as candidate biomarkers for ALS. *J Mol Neurosci* 2019;69(4):643–57. DOI: 10.1007/s12031-019-01411-y. PMID: 31721001.
 27. Smith E.F., Shaw P.J., De Vos K.J. The role of mitochondria in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurosci Lett* 2019;710:132933. DOI: 10.1016/j.neulet.2017.06.052. PMID: 28669745.
 28. De Vos K.J., Chapman A.L., Tennant M.E. et al. Familial amyotrophic lateral sclerosis-linked SOD1 mutants perturb fast axonal transport to reduce axonal mitochondria content. *Hum Mol Genet* 2007;16(22):2720–8. DOI: 10.1093/hmg/ddm226. PMID: 17725983.
 29. Magrané J., Cortez C., Gan W.-B., Manfredi G. Abnormal mitochondrial transport and morphology are common pathological denominators in SOD1 and TDP43 ALS mouse models. *Hum Mol Genet* 2014;23(6):1413–24. DOI: 10.1093/hmg/ddt528. PMID: 24154542.
 30. Tan W., Pasinelli P., Trotti D. Role of mitochondria in mutant SOD1 linked amyotrophic lateral sclerosis. *Biochim Biophys Acta – Mol Basis Dis* 2014;1842(8):1295–301. DOI: 10.1016/j.bbadis.2014.02.009. PMID: 28669745.
 31. Cowan D.B., Yao R., Theddanamoorthy J.K. et al. Transit and integration of extracellular mitochondria in human heart cells. *Sci Rep* 2017;7(1):17450. DOI: 10.1038/s41598-017-17813-0. PMID: 29234096.
 32. Li Q., Vande Velde C., Israelson A. et al. ALS-linked mutant superoxide dismutase 1 (SOD1) alters mitochondrial protein composition and decreases protein import. *Proc Natl Acad Sci* 2010;107(49):21146–51. DOI: 10.1073/pnas.1014862107. PMID: 21078990.
 33. Serio A., Patani R. Concise review: the cellular conspiracy of amyotrophic lateral sclerosis. *Stem Cells* 2018;36(3):293–303. DOI: 10.1002/stem.2758. PMID: 29235200.
 34. Boillee S., Yamanaka K., Lobsiger C.S. et al. Onset and progression in inherited ALS determined by motor neurons and microglia. *Science* 2006;312(5778):1389–92. DOI: 10.1126/science.1123511. PMID: 16741123.
 35. Yamanaka K., Chun S.J., Boillee S. et al. Astrocytes as determinants of disease progression in inherited amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Neurosci* 2008;11(3):251–3. DOI: 10.1038/nn2047. PMID: 18246065.
 36. Frakes A.E., Ferraiuolo L., Haidet-Phillips A.M. et al. Microglia induce motor neuron death via the classical NF- κ B pathway in amyotrophic lateral sclerosis. *Neuron* 2014;81(5):1009–23. DOI: 10.1016/j.neuron.2014.01.013. PMID: 24607225.
 37. Papadeas S.T., Kraig S.E., O'Banion C. et al. Astrocytes carrying the superoxide dismutase 1 (SOD1G93A) mutation induce wild-type motor neuron degeneration in vivo. *Proc Natl Acad Sci* 2011;108(43):17803–8. DOI: 10.1073/pnas.1103141108. PMID: 21969586.
 38. Philips T., Bento-Abreu A., Nonneman A. et al. Oligodendrocyte dysfunction in the pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis. *Brain* 2013;136(2):471–82. DOI: 10.1093/brain/aws339. PMID: 23378219.

39. Kang S.H., Li Y., Fukaya M. et al. Degeneration and impaired regeneration of gray matter oligodendrocytes in amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Neurosci* 2013;16(5):571–9. DOI: 10.1038/nn.3357. PMID: 23542689.
40. Gatto R.G., Amin M.Y., Deyoung D. et al. Ultra-high field diffusion MRI reveals early axonal pathology in spinal cord of ALS mice. *Transl Neurodegener* 2018;7(1):20. DOI: 10.1186/s40035-018-0122-z. PMID: 30128146.

Вклад авторов

А.В. Ставровская: сбор материала, анализ данных, анализ литературы, написание текста рукописи, представление рисунков;
 Д.Н. Воронков, А.С. Гушина: сбор материала, анализ данных, анализ литературы, представление рисунков;
 Э.А. Артёмова, Б.В. Белугин: сбор материала;
 М.М. Шмаров: дизайн исследования, анализ данных;
 Н.Г. Ямщикова, Б.С. Народицкий, А.С. Ольшанский: сбор материала, анализ данных;
 С.Н. Иллариошкин: дизайн исследования, обзор публикаций по теме статьи, написание текста, окончательное утверждение версии перед сдачей в печать.

Authors' contributions

A.V. Stavrovskaya: material collecting, data analysis, literature analysis, manuscript writing, presentation of drawings;
 D.N. Voronkov, A.S. Gushchina: material collecting, data analysis, literature analysis, presentation of drawings;
 E.A. Artyomova, B.V. Belugin: material collecting;
 M.M. Shmarov: study design, data analysis;
 N.G. Yamshchikova, B.S. Naroditsky, A.S. Olshansky: material collecting, data analysis;
 S.N. Illarioshkin: study design, review of publications on the topic of the article, writing of the text, final approval of the version before going to print.

ORCID авторов / ORCID authors'

А.В. Ставровская / A.V. Stavrovskaya: <http://orcid.org/0000-0002-8689-0934>
 Д.Н. Воронков / D.N. Voronkov: <http://orcid.org/0000-0001-5222-5322>
 Э.А. Артёмова / E.A. Artyomova: <http://orcid.org/0000-0002-7081-0311>
 Б.В. Белугин / B.V. Belugin: <http://orcid.org/0000-0003-2646-9774>
 М.М. Шмаров / M.M. Shmarov: <http://orcid.org/0000-0002-5268-1296>
 Н.Г. Ямщикова / N.G. Yamshchikova: <http://orcid.org/0000-0003-4387-2266>
 А.С. Гушина / A.S. Gushchina: <http://orcid.org/0000-0003-3026-0279>
 А.С. Ольшанский / A.S. Olshansky: <http://orcid.org/0000-0002-5696-8032>
 Б.С. Народицкий / B.S. Naroditsky: <http://orcid.org/0000-0001-5522-8238>
 С.Н. Иллариошкин / S.N. Illarioshkin: <http://orcid.org/0000-0002-2704-6282>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.
Conflict of interest. The author declares no conflict of interest.

Финансирование. Исследование проведено без спонсорской поддержки.
Financing. The study was done without sponsorship.

Соблюдение правил биоэтики. Протокол исследования одобрен локальным этическим комитетом ФГБНУ «Научный центр неврологии» (протокол № 32-5/19 от 20.02.2019 г.).

Исследование выполнено в соответствии с этическими нормами обращения с животными, принятыми Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для исследовательских и иных научных целей.

Compliance with principles of bioethics. The study protocol was approved by the local ethics committee of Research Center of Neurology protocol 32-5/19 dated 20.02.2019). The study was performed in accordance with ethical principles adopted by the European Convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes.