

На правах рукописи

Нинкина Наталья Николаевна

**Молекулярно-клеточные механизмы патогенеза болезни двигательного
нейрона: роль гамма-синуклеина**

14.03.03– патологическая физиология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание учёной степени
доктора медицинских наук

МОСКВА – 2012

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте физиологически активных веществ РАН и в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте молекулярной биологии РАН им В.А. Энгельгардта.

Научный консультант:

Доктор медицинских наук, профессор, член-корреспондент РАМН

Вероника Игоревна Скворцова

Официальные оппоненты:

Вадим Сергеевич Репин

Доктор медицинских наук, профессор, член-корреспондент РАМН

Федеральное государственное бюджетное учреждение "Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии" РАМН
Главный научный сотрудник лаборатории клеточной биологии и патологии развития

Александр Александрович Терентьев

Доктор медицинских наук, профессор, член-корреспондент РАМН

Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова»
Минздравсоцразвития РФ

Заведующий кафедрой биохимии

Дина Мироновна Меркулова

Доктор медицинских наук, профессор

Центральная клиническая больница №2 им. Семашко ОАО "РЖД"

Руководитель Неврологического Центра им. проф. Б.М. Гехта

**Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования
Российский университет дружбы народов**

Защита состоится «__» _____ 2012 года в __ часов на заседании Диссертационного совета Д 001.003.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении «Научно-исследовательском институте общей патологии и патофизиологии» Российской академии медицинских наук, по адресу: 125315, Москва, ул. Балтийская, 8.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института.

Автореферат разослан «__» _____ 2012 года.

Ученый секретарь Диссертационного совета, кандидат медицинских наук

Лариса Николаевна Скуратовская

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы

Болезнь двигательного нейрона (БДН) – одно из самых тяжелых заболеваний центральной нервной системы – является на сегодняшний день практически некурабельным и, несмотря на многочисленные исследования, его этиология и патогенез остаются окончательно не установленными, а все разрабатываемые паллиативные методы лечения оказались неэффективными. Заболевание поражает преимущественно лиц среднего возраста, в подавляющем большинстве случаев характеризуется быстрым течением, тяжелой инвалидизацией и приводит к неизбежной гибели пациентов, что и обуславливает большую медико-социальную значимость БДН. Распространенность БДН в мире составляет по различным оценкам от 0,8 до 7,5 случаев на 100 000 человек, а заболеваемость в среднем составляет от 0,2 до 2,4 на 100 000 в год; в московской популяции распространённость БДН по последним данным составляет 1,16 случаев на 100 000 человек, в Санкт-Петербурге - 1,3. Общее число больных в Российской Федерации оценивается примерно в 9 000 человек, однако это не отражает масштабности проблемы, поскольку быстрое течение заболевания (в среднем 3-5 лет с момента постановки диагноза и более стремительное при бульбарном дебюте), заканчивающееся летальным исходом, влияет на статистические показатели числа больных, зарегистрированных на конкретный временной интервал. Недавно проведенные наиболее репрезентативные популяционные исследования по нейродегенеративным заболеваниям на территории Швеции показали, что смертность от БДН за период с 1990 по 2010 годы составила 2,9 на 100 000, в то время как для рассеянного склероза, традиционно считающегося более распространенным заболеванием, смертность составила всего 2,04 на 100 000.

Таким образом, в целом от БДН погибает больше больных, чем от рассеянного склероза. Если учесть, что непосредственно перед постановкой диагноза большинство пациентов с этим заболеванием являлись работоспособными и, в большинстве случаев, обладали хорошим здоровьем без сопутствующих патологий в их *anamnesis vitae*, то проблема лечения БДН приобретает еще и важное социально-экономическое значение.

Наиболее актуальной задачей в исследовании патогенеза БДН остается выявление причинного молекулярно-клеточного механизма селективного поражения двигательных нейронов. Изучение наследственных форм позволило идентифицировать целый ряд генетических факторов, ассоциированных с БДН (SOD1, ALS2, angiogenin, TDP43, FUS, C9ORF72, всего более 20 генетических аномалий), однако оказалось недостаточным для создания единой теории, описывающей механизм избирательного поражения двигательных нейронов, а попытки создания *in vivo* моделей БДН с помощью соответствующих модификаций геномов экспериментальных животных нельзя считать успешными, поскольку дегенеративные изменения двигательных нейронов в модельных системах всегда сопровождалась патологией других групп нейронов. Таким образом, наши исследования, позволившие выявить новый фактор – γ -синуклеин, вовлеченный в патогенез БДН, и показать его непосредственную роль в механизме селективного поражения двигательных нейронов, представляются актуальными и своевременными.

Минимальный прогресс в разработке терапевтических подходов для лечения БДН и создания эффективных фармпрепаратов, объясняется, в первую очередь, отсутствием адекватных моделей, которые могли бы быть использованы для преclinical испытаний. Единственным рекомендованным при БДН препаратом, является рилузол, применение которого, в соответствии с результатами клинических испытаний, может продлевать жизнь пациентов в среднем на 10%, что нельзя считать эффективным лечением, особенно, если учитывать тот факт, что ни при одной

из форм БДН применение рилузола не сопровождается стабилизацией состояния больных или улучшением качества их жизни. Созданная нами генетическая модель – линия трансгенных мышей *Thy1mySN*, характеризующаяся избирательной потерей определенных групп верхних и нижних двигательных нейронов и наиболее адекватно воспроизводящая картину БДН у лабораторных животных, позволит существенно оптимизировать безусловно актуальные работы по созданию патогенетической терапии для лечения данной группы заболеваний.

Цель работы и основные задачи исследования

Основной целью данной работы было выявление новых факторов, вовлеченных в патогенез болезни двигательного нейрона. Для достижения этой цели были поставлены следующие **задачи**:

1. Выявить ранее не описанные нейроспецифические гены, экспрессирующиеся в двигательных нейронах и кодирующие белки, которые в силу своих физико-химических свойств способны к патогенной агрегации и, таким образом, являются кандидатами на участие в нейродегенеративных процессах при болезни двигательного нейрона; детально изучить динамику экспрессии и внутриклеточной локализации белка, в наибольшей степени отвечающего критериям отбора.
2. Произвести модификацию генома лабораторных мышей, позволяющую изменить метаболизм и внутриклеточную локализацию отобранного белка-кандидата и создать линию трансгенных мышей с фенотипическими проявлениями нейродегенеративного процесса, локализованного в двигательных нейронах.
3. Провести детальную характеристику созданной линии трансгенных мышей с использованием молекулярно-биологических, биохимических, гистологических и поведенческих методов исследования.
4. Изучить аутопсийный материал больных боковым амиотрофическим склерозом (БАС) – наиболее часто встречающейся формы БДН, на предмет

выявления агрегированных форм исследуемого белка и сформированных ими патогистологических включений.

5. В целях развития патогенетической терапии провести валидацию практического применения созданной генетической модели для тестирования препаратов, модифицирующих процесс нейродегенерации и выявления их молекулярно-клеточных мишеней на примере разработанного в ИФАВ РАН препарата Димебон, обладающего нейропротекторными свойствами.

Научная новизна

В представленной работе обобщены данные первого и единственного на сегодняшний день масштабного исследования роли потенциально-амилоидогенного белка γ -синуклеина в патогенезе нейродегенеративных заболеваний и, в частности, селективной гибели двигательных нейронов при БДН. В многочисленных исследованиях наследственных форм БДН был выявлен ряд генов, мутации в которых ассоциированы с развитием этого заболевания. Однако, моделирование патологических состояний на основе экспрессии мутантных вариантов этих генов в генетически модифицированных животных, хотя и вызывало в случае успешных моделей поражение нейронов, не обеспечивало при этом селективную гибель двигательных нейронов, характерную для БДН. Более того, многие белки, кодируемые генами, в которых обнаружены мутации, специфичные для наследственных форм БДН, не были обнаружены в составе гистопатологических включений при спорадических формах этого заболевания. В представленной работе идентифицирован и охарактеризован новый патологический фактор – белок γ -синуклеин, - нарушение нормального функционирования которого может приводить к избирательной гибели двигательных нейронов. Для доказательства причинной роли γ -синуклеина в этиологии и патогенезе определенных форм БДН нами была создана и охарактеризована уникальная линия трансгенных мышей, характеризующаяся развитием в нервной системе всех взрослых

особей прогрессирующего нейродегенеративного процесса, сопровождающегося селективной гибелью двигательных нейронов и фенотипическими изменениями, воспроизводящими клиническую картину, характерную для больных БДН. Аналогов данной трансгенной линии не существует.

Выявлен новый тип гистопатологических включений – γ -синуклеин реактивные структуры, характерные только для больных БДН и не встречающиеся ни у контрольных здоровых индивидуумов, ни у пациентов с другими нейродегенеративными заболеваниями, сопровождающимися накоплением патогенных включений. Показано, что основой вновь выявленных включений являются агрегированные детергент-нерастворимые формы белка γ -синуклеина.

Теоретическая и практическая значимость

Полученные данные вносят существенный вклад в формирование нового взгляда на патогенез болезни двигательного нейрона. Идентификация нового, ранее не описанного фактора, способного инициировать каскадный процесс протеинопатии, позволило существенно расширить представления о молекулярном патогенезе, по крайней мере, некоторых форм бокового амиотрофического склероза.

Экспериментальное доказательство непосредственного участия γ -синуклеина в патологическом процессе, приводящем к селективной потере функции и гибели двигательных нейронов и их аксонов позволяет предложить новые молекулярные мишени для создания лекарственных препаратов, воздействующих непосредственно на патогенез БДН и наметить стратегию разработки новых терапевтических подходов для лечения данной группы заболеваний.

Созданная новая линия трансгенных мышей, на сегодняшний день является наиболее адекватной *in vivo* моделью БДН и может быть использована

в экспериментальных исследованиях механизма избирательной гибели двигательных нейронов, а также применена для тестирования новых нейропротекторных препаратов с терапевтическим действием, направленным непосредственно на сохранение и восстановление функции двигательных нейронов.

Положения, выносимые на защиту

1. Идентифицирован и охарактеризован новый фактор, вовлеченный в патогенез БДН, - γ -синуклеин, - который по своим физико-химическим свойствам является потенциально амилоидогенным белком. Создана карта его распределения по отделам нервной системы, выявлено высокое содержание γ -синуклеина в двигательных нейронах и показана регуляция уровня синтеза и внутриклеточной локализации при нейрогенезе в период эмбрионального развития, установлена роль γ -синуклеина в стабилизации сети нейрофиламентов, на основании чего сформулирована гипотеза специфического повреждения двигательных нейронов, обусловленного нарушением метаболизма γ -синуклеина.
2. В аутопсийном материале больных боковым амиотрофическим склерозом выявлен новый тип γ -синуклеин реактивных патогистологических включений.
3. Для доказательства роли γ -синуклеина в патогенезе болезни двигательного нейрона создана линия трансгенных мышей (*Thy1 μ SN*) с повышенным уровнем продукции этого белка в нейронах различных отделов нервной системы, при этом имела место селективная гибель только двигательных нейронов, что свидетельствует в пользу участия γ -синуклеина в патогенезе БДН.
4. Линия *Thy1 μ SN* мышей была адаптирована в качестве модельной тест-системы для решения задач патогенетической терапии при разработке лекарственных средств, обладающих нейропротекторными свойствами, что, в частности, позволило охарактеризовать отечественный препарат Димебон

как ингибитор прогрессии нейродегенеративного процесса в двигательных нейронах.

Апробация работы

Основные результаты диссертационной работы были представлены на следующих конференциях и конгрессах:

Пятый международный междисциплинарный конгресс Нейронаука для медицины и психологии (3-13 июня 2009 г., Судак, Крым, Украина); Annual Society for Neuroscience meetings (13-17 November 2010, San Diego, CA, and 12-16 November 2011 Washington, DC, USA); Первая международная научно-практическая конференция Постгеномные методы анализа в биологии, лабораторной и клинической медицине (17-19 ноября, 2010 г., Москва, Россия); 10th International Conference on Alzheimer's and Parkinson's Diseases (6-10 March 2011, Barcelona, Spain); 8th IBRO World Congress of Neuroscience (14 – 18 July 2011 Florence, Italy); The XIX World Congress on Parkinson's Disease and Related Disorder (11-14 December 2011, Shanghai, China); Ежегодных конференциях «Фундаментальные науки – медицине» (2008-20011 г., Москва, Россия); IV Neurotoxicity Society Meeting: Neurochemical Mechanisms of Neurodegenerative Disorders (24-26 April 2009, Arica, Chile); 4th Mammalian Genes, Development and Disease Meeting (2 July 2010, Cardiff UK); 23d ISN Biennial Meeting, From genes to pathogenesis (3-4 September 2011, Naxos, Greece), The 2012 European network for cure ALS meeting (25-27 May 2012, Dublin, Ireland).

Публикаций по теме диссертации

Опубликовано 29 статей в отечественных и зарубежных изданиях.

Объем и структура диссертации

Диссертация содержит следующие основные разделы: введение, обзор данных литературы, главы результатов собственных исследований и их обсуждение, заключение, выводы и библиографический указатель,

включающий работы на русском (34) и иностранных языках (287). Диссертация изложена на 315 страницах машинописного текста и содержит 6 таблиц и 54 рисунка.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Идентификация γ -синуклеина, анализ структуры, экспрессии и распределения белка в нервной системе

Семейство синуклеинов составляют три высокогомологичных белка – α -, β - и γ -синуклеин, кодируемые генами *SNCA*, *SNCB* и *SNCG*, которые в эволюции появляются только у позвоночных и картированы у человека на хромосомах 4q21.3-q22 [Chen X. et al., 1995], 5q35 [Specht C.G. et al., 2001] и 10q23 [Ninkina N. et al., 1998], соответственно. Синуклеины являются преимущественно нейрональными белками, обнаруживаемыми в большом количестве в пресинаптических окончаниях. Многочисленные клинические и лабораторные исследования установили ключевую роль α -синуклеина как в этиологии редких наследственных, так и в патогенезе идиопатических форм ряда НДЗ, прежде всего протеинопатий, характеризующихся образованием телец Леви – патологических цитоплазматических отложений, для которых агрегация α -синуклеина с образованием высокомолекулярных водонерастворимых фибрил является структуроформирующим фактором. γ -синуклеин был идентифицирован последним из трех членов семейства, независимо в нескольких лабораториях, включая нашу лабораторию, где был проведен наиболее полный и репрезентативный анализ структуры гена и кодируемого им белка для нескольких видов животных [Buchman V.L. et al., 1998; Ninkina N. et al., 1998; Alimova-Kost M. et al., 1999; Tiunova A.A. et al., 2000]. Несмотря на высокую степень гомологии γ -синуклеина и α -синуклеина на уровне аминокислотных последовательностей и близость многих физико-химических характеристик этих белков, чрезвычайно мало внимания уделялось исследованию функций γ -синуклеина в нервной системе, последствий

нарушения этих функций для нейронов и роли γ -синуклеина в развитии нейродегенеративных процессов.

Нами был выполнен первый подробный анализ экспрессии γ -синуклеина в нервной системе млекопитающих на примере мыши [Ninkina N. et al., 1998; Ninkina N. et al., 1999]. Было показано, что в онтогенезе γ -синуклеин начинает экспрессироваться в период активного нейрогенеза, у мыши это соответствует десятому и одиннадцатому дням эмбриогенеза (E10 и E11) (рисунок 1)

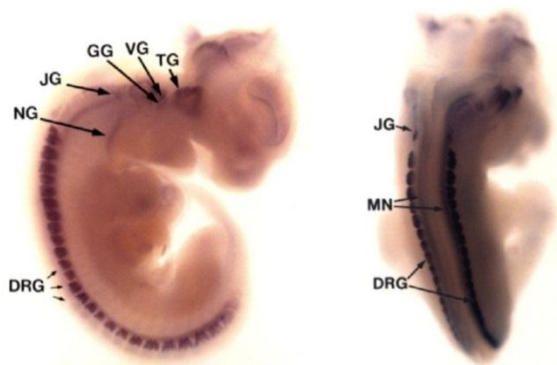


Рисунок 1. *In situ* гибридизация эмбрионов мыши (E11) с DIG-меченой антисмысловой кРНК γ -синуклеина.

TG - ганглий тройничного нерва; *VG* - вестибулярный ганглий; *GG* - коленчатый ганглий; *JG* - яремный ганглий; *NG* - нодозный ганглий; *DRG* – ганглий дорзального корешка; *MN* – мотонейроны в вентральных рогах спинного мозга.

При этом количество синтезируемого белка γ -синуклеина, оцениваемое относительно к общему количеству белка в данной анатомической структуре, прямо коррелирует с активностью процесса нейрогенеза. В качестве примера на рисунке 2 приведены данные анализа γ -синуклеина в ганглии тройничного нерва мыши, начиная с десятого дня эмбрионального развития до рождения.

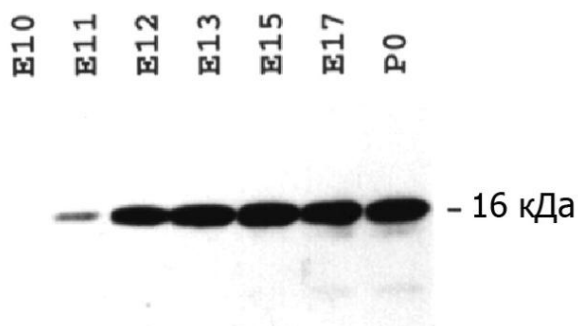


Рисунок 2. Анализ содержания белка γ -синуклеина в развивающемся ганглии тройничного нерва методом иммуноблоттинга.

Период эмбрионального развития с десятого (E10) по семнадцатый (E17) дни и первый день после рождения (P0). Справа указан размер выявляемого белка. Для детекции использовали полученные и аффинно очищенные нами антитела SK23, специфично узнающие С-концевой эпитоп γ -синуклеина мыши.

При иммуногистохимическом анализе срезов эмбрионов мыши хорошо видно, что антителами против γ -синуклеина окрашиваются как сами тела нейронов, так и корешковые нити (*fila radicularia*), которые образуют двигательный корешок (*radix ventralis*), и задние корешковые нити, образующие чувствительный корешок (*radix dorsalis*), что свидетельствует о присутствии этого белка в аксонах двигательных и чувствительных нейронов. Волокна, формирующие спинальный нерв, также интенсивно окрашиваются антителами против γ -синуклеина (рисунок 3).

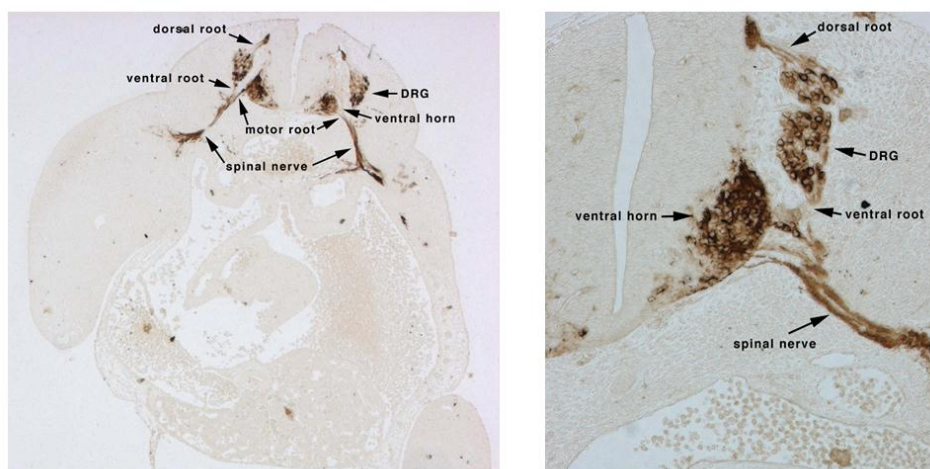


Рисунок 3. Иммуногистохимический анализ γ -синуклеина в развивающейся нервной системе мыши в период активного нейрогенеза (E12).

Для детекции использовали антитела SK23, специфично узнающие γ -синуклеин мыши. *dorsal root* – дорзальный корешок; *DRG* – ганглий дорзального корешка; *ventral root* – вентральный корешок; *ventral horn* – вентральные рога; *motor root* – двигательный корешок; *spinal nerve* – спинальный нерв.

Важным результатом проведенного изучения экспрессии γ -синуклеина в различных анатомических структурах нервной системы эмбрионов мыши явилось выявление высокого содержания этого белка в нижних и верхних двигательных нейронах, локализованных в вентральных рогах спинного мозга, в двигательных ядрах ствола мозга и в первичной двигательной коре головного мозга. На рисунке 4 представлены данные иммуногистохимического анализа двигательных ядер ствола мозга мыши на разных стадиях эмбрионального развития. Однако, в постнатальном периоде развития γ -синуклеин практически

полностью транслоцируется из тел большинства типов нейронов, в том числе двигательных, в их аксоны. В результате, как показали результаты проведенного нами детального картирования, в нервной системе взрослых животных лишь ограниченное число нейронов положительно окрашивается на γ -синуклеин при интенсивной окраске аксонов в большинстве проводящих путей.

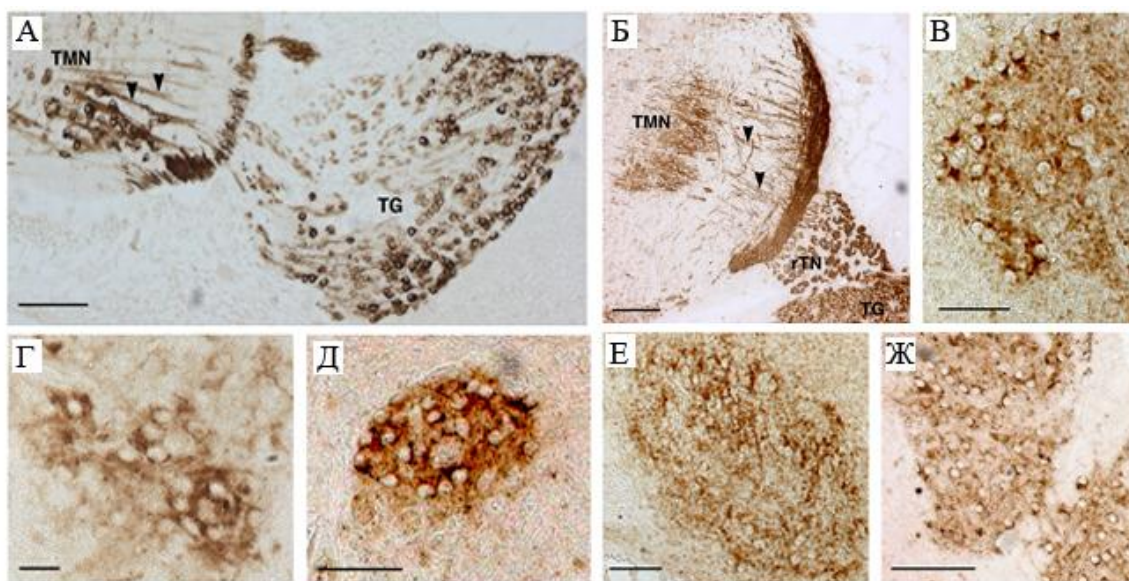


Рисунок 4. Иммуногистохимический анализ содержания γ -синуклеина в ядрах ствола мозга мыши при эмбриональном развитии.

A - E12, двигательное ядро (TMN) и ганглий (TG) тройничного нерва; Б – E15, двигательное ядро тройничного нерва; В – E18, двигательное ядро тройничного нерва; Г – E18, ядро глазодвигательного нерва; Д – E18, ядро блокового нерва; Е – E18, ядро лицевого нерва; Ж – E18, ядро подъязычного нерва.

Необходимо отметить, что структурные и биофизические исследования очищенного рекомбинантного белка позволили сделать вывод, что γ -синуклеин является потенциально амилоидогенным белком, и это косвенно подтверждается сходством с α -синуклеином, для которого доказана способность агрегировать, образовывать фибриллярные нерастворимые структуры и формировать амилоидные включения в различных модельных *in vivo* системах. Мы предположили, что нарушение метаболизма γ -синуклеина также может привести к накоплению и патогенной агрегации этого белка с последующими патологическими изменениями в тех типах нейронов, где

выявлен высокий уровень его экспрессии, и в первую очередь, в двигательных нейронах. Наиболее адекватным доказательством данной гипотезы явилось создание *in vivo* модели γ -синуклеинопатии, вызванной повышенной экспрессией этого потенциально амилоидогенного белка в нервной системе лабораторных мышей.

Моделирование болезни двигательного нейрона в трансгенных мышах

Нами была создана линия генетически модифицированных мышей (*Thy1 μ SN*), у которых во всех типах нейронов, включая двигательные нейроны, выявлялось высокое содержание белка γ -синуклеина. Нейроспецифичная экспрессия трансгена, содержащего полноразмерную кДНК, кодирующую γ -синуклеин, обеспечивалась высокоэффективным промотором *Thy1* в составе экспрессионной кассеты на основе вектора 323pTSC21k. Мыши линии *Thy1 μ SN* в первые месяцы жизни не имели выраженных признаков неврологической патологии, несмотря на высокий уровень экспрессии мРНК γ -синуклеина и накопление кодируемого белка во всех отделах нервной системы, которое отмечалось уже начиная со второй недели постнатального развития. В возрасте 6-9 месяцев у гомозиготных по трансгенной кассете *Thy1 μ SN* особей выявлялись очевидные признаки прогрессирующего нейродегенеративного процесса (рисунок 5), у гемизиготных мышей эти признаки менее выражены и проявляются в более позднем возрасте, что свидетельствует о влиянии дозы гена и, соответственно, уровня продукции белка на динамику развития патологического процесса.

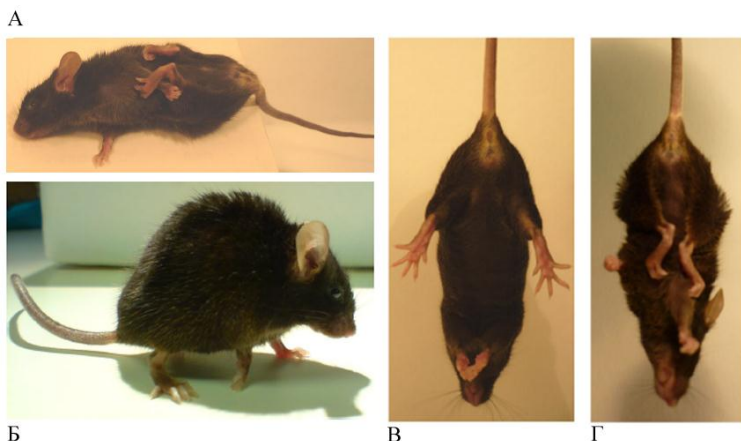


Рисунок 5. Развитие неврологического фенотипа у *Thy1 μ SN* мышей.

А: нарушение рефлекса переворачивания; *Б:* характерная патологическая посадка с выгнутой спиной; *Г:* сведение конечностей (рефлекс клешни) у *Thy1 μ SN*, который отсутствует у контрольных животных дикого типа того же возраста (*В*).

Нейродегенеративные изменения в нервной системе *Thy1 μ SN* мышей приводили к прогрессирующим с возрастом нарушениям двигательной функции, выявляемых при помощи инструментальных методов анализа еще до появления очевидных клинических признаков патологии. К таким нарушениям относятся изменения походки, снижение способности животных удерживаться на перевернутой сетке и на вращающемся стержне (рисунок 6). На поздних, симптоматических стадиях γ -синуклеинопатии у модельных животных развивались парезы и параличи конечностей, а затем и дыхательной мускулатуры, что приводило к их преждевременной гибели: продолжительность жизни *Thy1 μ SN* мышей составляет в среднем 12 месяцев, что в два раза меньше, чем продолжительность жизни контрольных животных дикого типа на том же генетическом фоне.

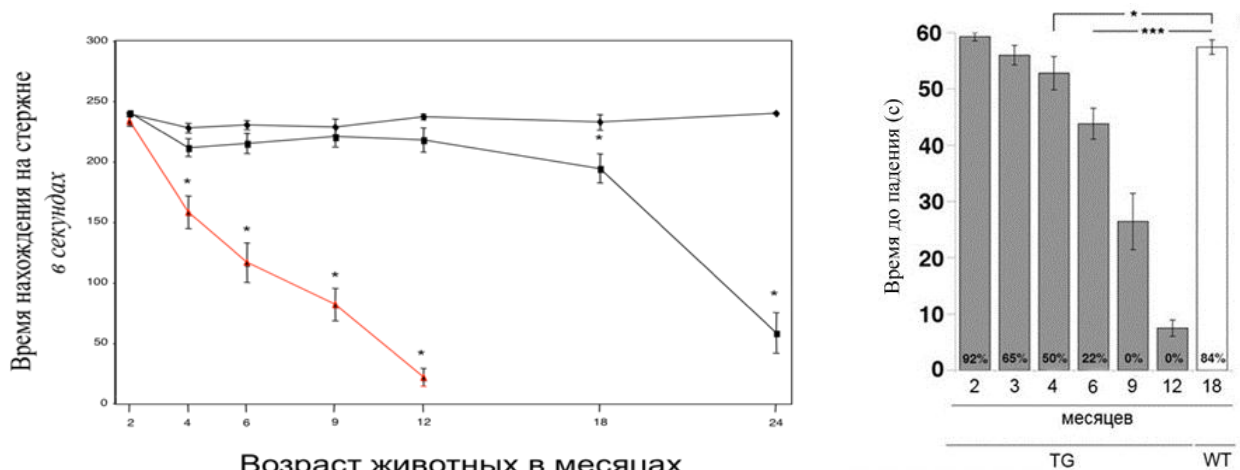


Рисунок 6. Прогрессирующий характер нарушения двигательной функции у *Thy1 μ SN* мышей.

А: тест на способность мышей разного возраста удержаться на вращающемся стержне. Красными треугольниками обозначены показатели гомозиготных по трансгенной кассете *Thy1 μ SN* мышей, черными квадратами - гемизиготных, черными ромбами - контрольных мышей дикого типа. Показана статистически значимая разница между трансгенными животными и животными дикого типа для каждого возраста (* - $p < 0,01$, тест Колмогорова-Смирнова). Б: время, которое гомозиготные *Thy1 μ SN* мыши разного возраста способны удержаться на перевернутой сетке (длительность теста - 60 секунд) и процент животных, способных успешно завершить тест как минимум в одной из трех попыток; незакрашенным столбцом показаны данные для контрольных животных дикого типа в возрасте 18 месяцев. (* - $p < 0,05$; *** - $p < 0,01$, тест Колмогорова-Смирнова).

В норме γ -синуклеин является растворимым белком и в нервной системе взрослых животных преимущественно обнаруживается в аксонах и пресинаптических окончаниях, однако, повышенная продукция в нейронах Thy1 μ SN мышей приводит к изменению его внутриклеточной локализации – значительное количество накапливается в цитоплазме тел нейронов, где γ -синуклеин агрегирует и образует детергент-нерастворимые фибриллярные структуры. Проведенный нами иммуногистохимический анализ препаратов различных отделов нервной системы мышей линии Thy1 μ SN выявил патологические включения, сформированные γ -синуклеином в телах и аксонах нейронов трансгенных животных, находящихся на симптоматической стадии заболевания (рисунок 7), причем количество обнаруживаемых включений прямо коррелировало с выраженностью неврологической симптоматики у модельных животных. Наибольшая плотность γ -синуклеин реактивных включений характерна для тех анатомических структур, в которых располагаются двигательные нейроны.

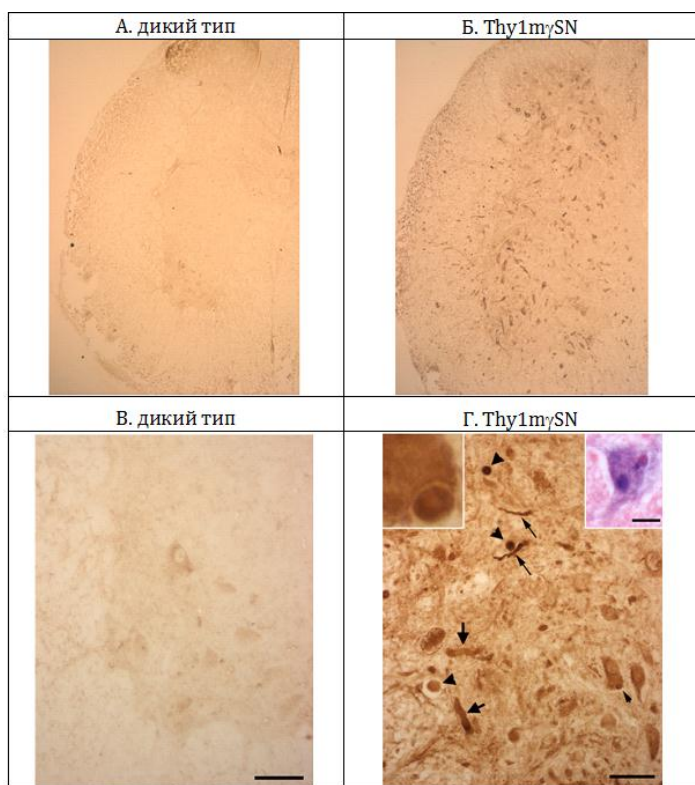


Рисунок 7. γ -синуклеин реактивные включения в нейронах спинного мозга Thy1 μ SN мышей в возрасте 12 месяцев.

Иммуногистохимическая окраска поперечных срезов спинного мозга контрольных (дикий тип, А, В) и трансгенных (Б, Г) мышей антителами SK23, специфически узнающими γ -синуклеин. А, Б. Увеличение 100X. В, Г. Увеличение 400X, шкала 25 мкм. Стрелками указаны патологические γ -синуклеин реактивные включения, выявляемые в тканях трансгенных животных: сфероиды (острие стрелки), различные типы аномальных нейритов (стрелки) и внутриклеточные включения (тонкое острие стрелки). Вставки (панель Г) иллюстрируют крупные включения в цитоплазме отдельных моторных нейронов при большом увеличении; на правой вставке показан

нейрон, окрашенный гематоксилин-эозином и содержащий крупное цитоплазматическое эозинофильное включение.

Обнаруживаемые в нервной системе *Thy1 μ SN* мышей γ -синуклеин реактивные включения окрашивались классическими красителями на амилоид – Конго красным и тиофлавином S (рисунок 8А). В тканях контрольных животных подобные структуры нами никогда не были обнаружены даже у стареющих особей (рисунок 8Б). Прогрессия нейродегенеративной патологии у *Thy1 μ SN* мышей коррелировала с накоплением амилоидных отложений.

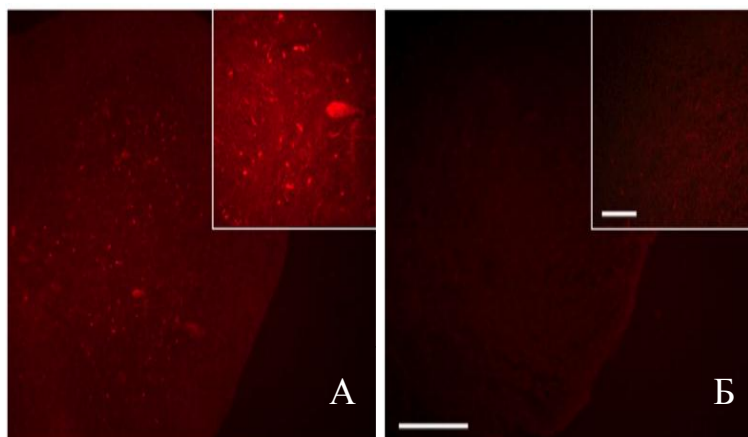


Рисунок 8. Амилоидные включения в тканях спинного мозга *Thy1 μ SN* мышей.

Окраска Конго красным препаратов грудного отдела спинного мозга *Thy1 μ SN* мышей (А) и мышей дикого типа (Б), возраст 12 месяцев.

Шкала 200 мкм и 25 мкм (для вставок).

Методом последовательного фракционирования белков из тканей спинного мозга *Thy1 μ SN* мышей в буферах с различным содержанием детергентов нами была выделена белковая фракция, содержащая агрегаты, которые не растворимы в присутствии детергентов тритон X-100 и 0.1% SDS, и могут быть высвобождены только кипячением в 1% SDS (рисунок 9А).

При электронно-микроскопическом исследовании детергент-нерастворимой фракции белков спинного мозга *Thy1 μ SN* мышей, находящихся на терминальной стадии протеинопатии, было показано, что агрегаты представляют собой сеть фибриллярных тяжей характерного для амилоида размера и диаметра, а окраска электронно-микроскопических препаратов с помощью антител против γ -синуклеина и вторичных антител, меченых частицами коллоидного золота показала, что фибриллированный γ -синуклеин является компонентом этих структур (рисунок 9Б).

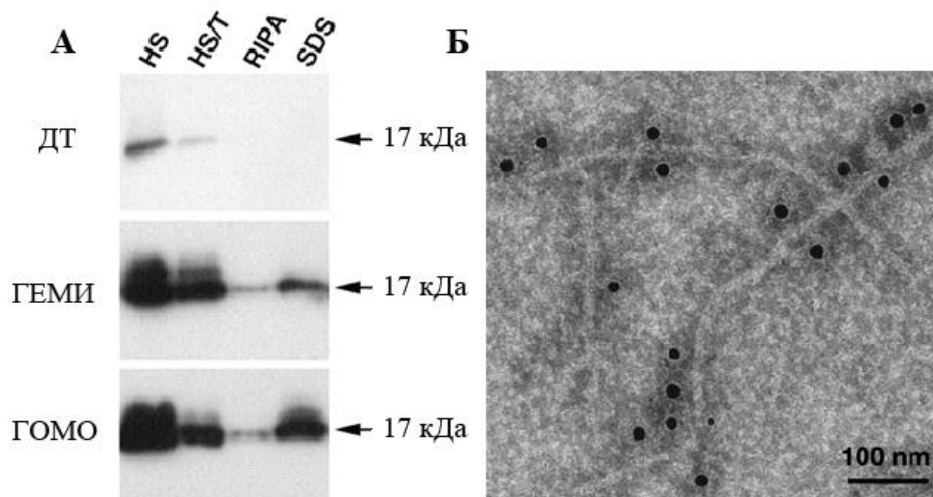


Рисунок 9. Детергент-нерастворимые фибриллярные формы γ -синуклеина в тканях спинного мозга *Thy1 μ SN* мышей, возраст 12 месяцев.

А. Анализ различных фракций, полученных из образцов спинного мозга гомозиготных (ГОМО) и гемизиготных (ГЕМИ) по трансгенной кассете животных и животных дикого типа (ДТ), на присутствие γ -синуклеина. Детекцию проводили методом иммуноблотинга с использованием антител SK23, специфично узнающих γ -синуклеин мыши. HS - фракция растворимых белков; HS/T - фракция белков, растворимых в присутствии Тритон X100 или в детергентах RIPA буфера (RIPA); SDS - фракция детергент-нерастворимых белков. Б. Электронно-микроскопическая иммунодетекция γ -синуклеина в составе фибрилл из детергент-нерастворимой фракции. Детекцию проводили с использованием антител SK23 и вторичных антител против иммуноглобулинов кролика, конъюгированных с частицами коллоидного золота.

Совокупность полученных нами экспериментальных данных позволила сделать вывод о том, что в составе патогенных включений, образующихся в нервной системе *Thy1 μ SN* мышей, именно белок γ -синуклеин образует фибриллы, из которых фомируются амилоидные включения в телах и аксонах нейронов.

Дегенеративные изменения в структуре периферических нервов *Thy1 μ SN* мышей отмечались уже на пресимптоматических стадиях γ -синуклеинопатии, а на терминальных стадиях заболевания имела место выраженная деградация всех трех белковых компонентов нейрофиламентов и других структурных белков цитоскелета, включая α -тубулин. При электронно-микроскопическом исследовании седалищного нерва *Thy1 μ SN* мышей, находящихся на терминальной стадии заболевания, были обнаружены

нарушения структуры миелиновых оболочек аксонов (рисунки 10А, 11), появление фагоцитирующих макрофагов, поглощающих фрагменты дегенерировавших аксонов и их миелиновых оболочек (рисунок 10Б), выявлена массивная потеря крупных миелинированных А-фибрилл (рисунок 11). При этом не наблюдалось потери и существенных морфологических изменений мелких С-фибрилл, за исключением частичной потери капсуляции их кластеров (рисунок 11).

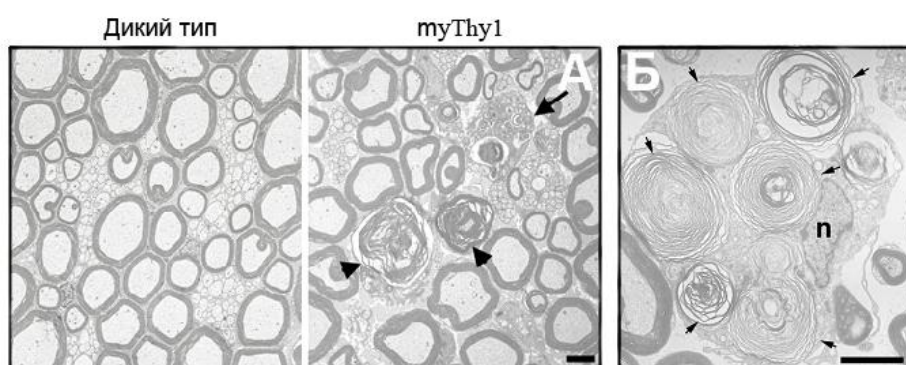


Рисунок 10. Патологические изменения в седалищном нерве *Thy1γSN* мышей.

А: электронно-микроскопические фотографии поперечного среза седалищного нерва *Thy1γSN* и контрольных животных в возрасте 12 месяцев. Стрелками указаны дегенерирующие миелинированные фибриллы. *Б:* дегенерирующие миелинированные фибриллы (стрелки) в цитоплазме макрофага, *n* - ядро макрофага. Шкала 3 мкм.

Наши данные говорят о том, что повышение внутриклеточного содержания γ -синуклеина и формирование этим белком фибриллярных структур является причиной нарушения системы организации нейрофиламентов и, следовательно, нарушения архитектоники и функционирования аксонов, что хорошо согласуется с данными, полученными нами ранее на первично культивируемых нейронах эмбрионов мыши [Buchman V.L. et al., 1998]. Поскольку седалищный нерв является смешанным нервом и в его составе проходят и афферентные, и эфферентные нервные волокна, не представлялось возможным определить, аксоны каких нейронов, формирующих А-фибриллы – чувствительных или двигательных – подвергаются деструктивным изменениям в наибольшей степени.

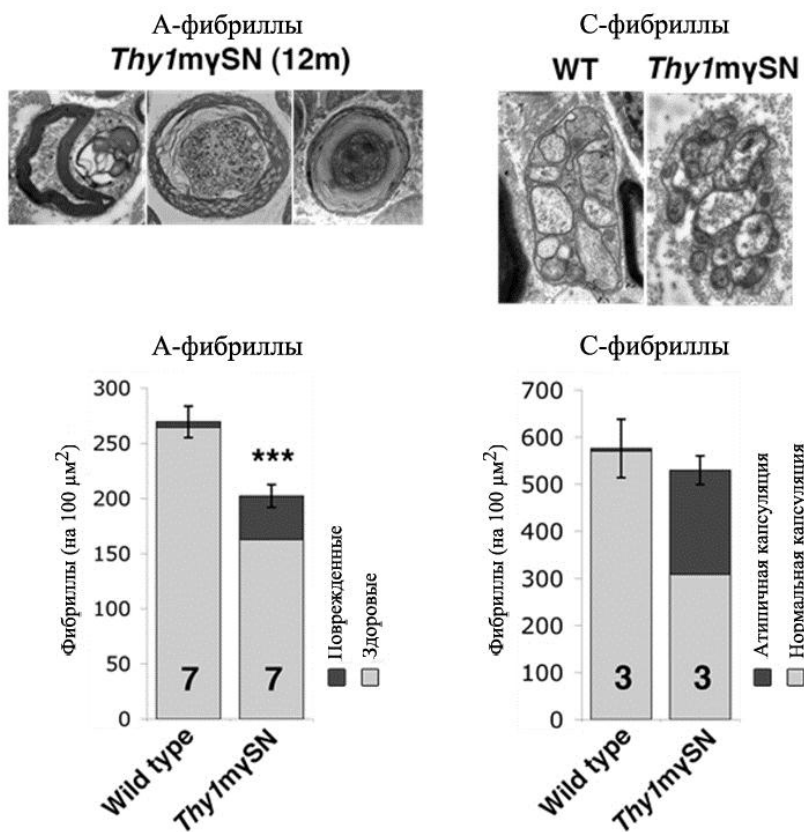


Рисунок 11. Потеря миелинированных А-фибрилл и атипичная капсуляция С-фибрилл в седалищном нерве Thy1mySN мышей, возраст 12 месяцев.

На верхних панелях представлены примеры дегенерирующих А-фибрилл седалищного нерва Thy1mySN мышей и сравнение морфологии С-фибрилл в двух группах мышей; на нижних – количество А- и С-фибрилл на единицу площади ($10^4 \mu\text{m}^2$) в седалищном нерве; у основания столбца указано количество животных, использованных для подсчета фибрилл. (***) - $p < 0,01$, тест Колмогорова-Смирнова).

Поэтому нами были исследованы отдельно корешковые нити (*fila radicularia*), образующие двигательный корешок (*radix ventralis*) и чувствительный корешок (*radix dorsalis*). Окраска ультратонких срезов толуидиновым синим выявила значительные патологические изменения в переднем корешке Thy1mySN мышей, аналогичные вышеописанным изменениям в седалищном нерве. В то же время морфология задних корешков не была существенно изменена (Рисунок 12А). Подсчет количества А-фибрилл с нормальной и патологически измененной морфологией подтвердил, что потеря и дегенерация этих структур специфичны для передних корешков (Рисунок 12Б), причем преимущественно теряются фибриллы большого диаметра (Рисунок 12В). Полученные данные убедительно свидетельствуют в пользу того, что аксоны двигательных нейронов в гораздо большей степени подвержены патологическим повреждениям, вызванным накоплением и

агрегацией γ -синуклеина, чем аксоны чувствительных нейронов *Thy1mySN* мышей.

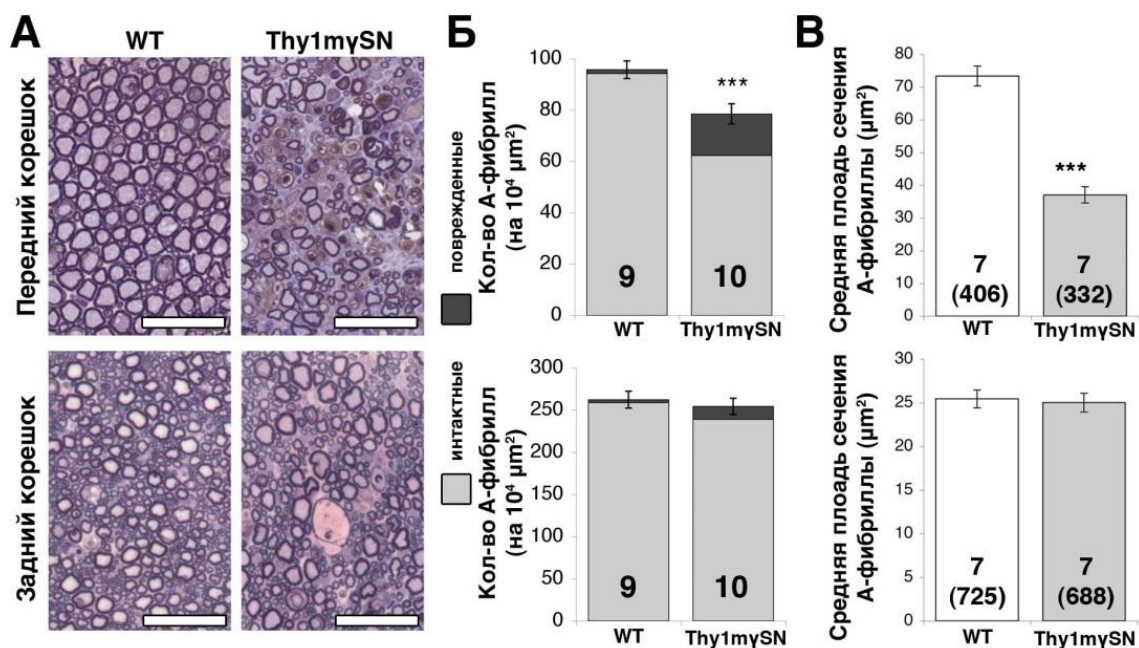


Рисунок 12. Анализ патологических изменений в передних и задних корешках спинного мозга.

А: поперечные срезы через передние и задние корешки *Thy1mySN* и контрольных (WT) мышей, окрашенные толуидиновым синим, шкала 50 мкм. *Б:* общее количество А-фибрилл на единицу площади ($10^4 \mu\text{m}^2$) и отдельно, количество морфологически нормальных и патологически измененных А-фибрилл; *В:* средняя площадь сечения волокон А-фибрилл. У основания каждого столбца указано количество животных, использованных для подсчета фибрилл и, в скобках, количество фибрилл, использованных для измерения их площади сечения (***) - $p < 0,001$, тест Колмогорова-Смирнова).

Патологические изменения в нервной системе *Thy1mySN* мышей не ограничиваются дегенерацией и последующей потерей аксонов двигательных нейронов. Уже на пресимптоматической стадии наблюдается значительное уменьшение числа тел нейронов, расположенных в передних рогах спинного мозга (Рисунок 13А), а для многих из сохранившихся двигательных нейронов характерен хроматолиз, вакуолизация и другие признаки развивающейся дегенерации (Рисунок 13Б). Процесс гибели спинальных двигательных нейронов носит прогрессирующий характер и на терминальных стадиях заболевания гомозиготные *Thy1mySN* мыши теряют около 60% этих клеток (Рисунок 13А). Однако даже на терминальной стадии не происходит потеря тел

чувствительных нейронов в ганглиях задних корешков спинного мозга (Рисунок 13В), что хорошо коррелирует с сохранностью чувствительных миелинированных и немиелинированных волокон в спинальных нервах этих животных.

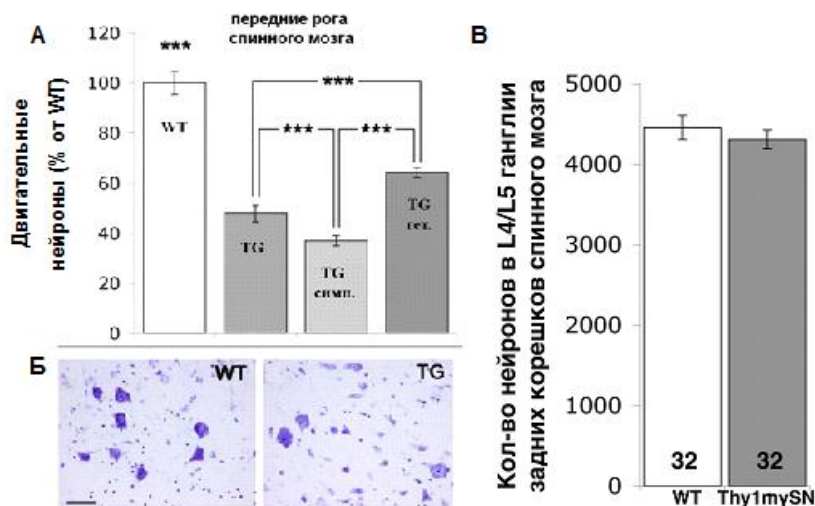


Рисунок 13. Селективная потеря двигательных нейронов спинного мозга у *Thy1mySN* мышей.

А: количество двигательных нейронов в передних рогах грудного отдела спинного мозга гомозиготных по трансгенной кассете животных, находящихся на ранней стадии (*TG*), такого же генотипа на поздней стадии заболевания (*TG симп.*) и гетерозиготных по трансгенной кассете (*TG гет.*) относительно среднестатистического количества двигательных нейронов в том же отделе у животных дикого типа (*WT*), которое принято за 100% (***) - $p < 0,01$, тест Колмогорова-Смирнова). *Б:* репрезентативные срезы спинного мозга окрашенные по Ниссля, шкала 15 мкм. *В:* количество чувствительных нейронов в ганглиях задних корешков спинного мозга гомозиготных *Thy1mySN* мышей, находящихся на поздней стадии заболевания и животных дикого типа того же возраста (*WT*).

Каковы механизмы и направление развития нейродегенеративного процесса в двигательных нейронах спинного мозга *Thy1mySN* мышей? Гибель нервных волокон может происходить через Валлерову дегенерацию, антероградно, и начинаться после нарушения связи между телом нейрона и отростком вследствие накопления токсичных продуктов агрегации γ -синуклеина в последнем и/или при механическом повреждении волокна крупными агрегатами. Однако, отмирание аксона может начинаться и уже после гибели нейрона. Наши данные позволяют предположить, что по крайней мере часть волокон подвергается Валлеровой дегенерации, поскольку было

показано присутствие значительных количеств γ -синуклеина в седалищном нерве, а часть волокон может отмирать уже после гибели нейрона.

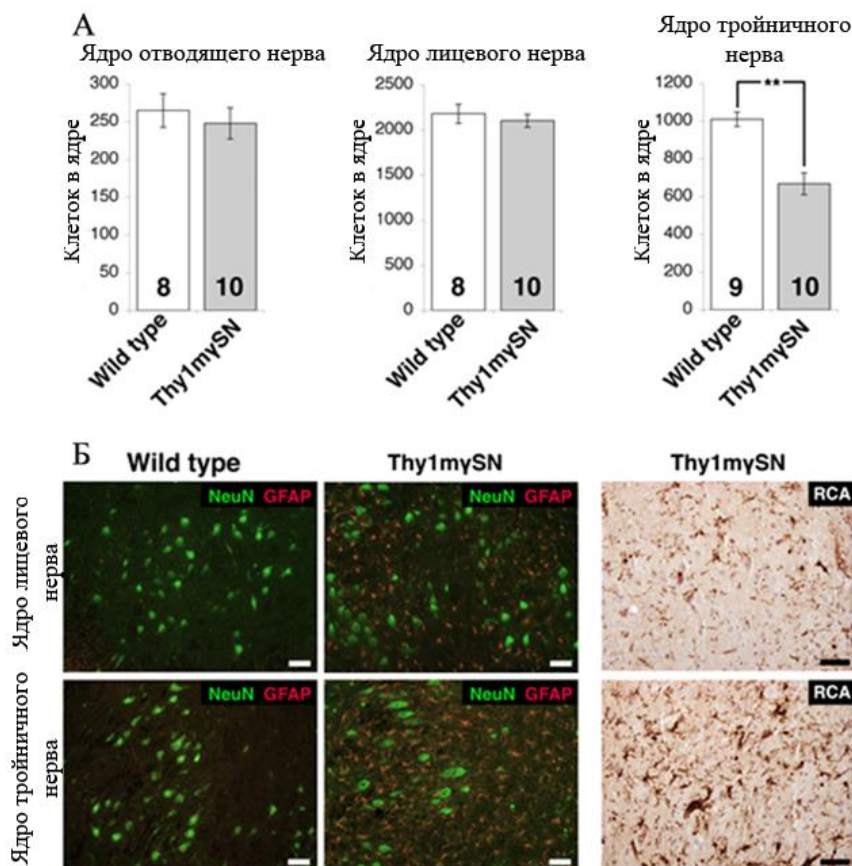


Рисунок 14. Анализ патологических изменений в ядрах ствола мозга гомозиготных *Thy1mySN* мышей.

А: количество двигательных нейронов, у основания каждого столбца указано количество животных, использованных для подсчета нейронов. *Б:* иммуногистохимическая окраска срезов через соответствующие ядра ствола мозга антителами против маркерных белков астроглиоза (*GFAP*, красный), ядер нейронов (*NeuN*, зеленый), и микроглиоза (*RCAI*, окраска с помощью 3,3'-диаминобензидина), шкала 75 мкм.

Важной характеристикой γ -синуклеинопатии у *Thy1mySN* мышей является избирательная дегенерация двигательных нейронов. Как и у больных БДН, у *Thy1mySN* мышей двигательные ядра ствола мозга выборочно вовлечены в патологический процесс. Например, в двигательном ядре тройничного нерва потеря нейронов составляет почти 40 % (рисунок 14А) и, как и в спинном мозге этих животных, сопровождается выраженной нейровоспалительной реакцией, характеризующейся появлением многочисленных активированных микроглиальных и астроглиальных клеток

(рисунок 14Б). В то же время, подобные изменения не характерны для других двигательных ядер ствола мозга, например в ядрах отводящего и лицевого нервов не обнаружено потери двигательных нейронов, а нейровоспалительная реакция выражена слабо (рисунок 14А, Б). Характерно, что и у больных БАС крайне редко поражается 6-я пара черепномозговых нервов - отводящий нерв (*nervus abducens*) и соответствующее ядро ствола мозга, а глазное яблоко сохраняет подвижность даже на терминальных стадиях заболевания. Таким образом, мы установили, что двигательные нейроны мышечной массы обладают избирательной чувствительностью к патогенному действию γ -синуклеина и его агрегированных форм. При этом у *Thy1 μ SN* мышечной массы наиболее выраженные патологические изменения наблюдаются в тех же ядрах черепномозговых нервов, которые чаще всего поражаются у больных БАС. Эти данные позволяют считать созданную нами линию трансгенных мышечной массы *Thy1 μ SN* адекватной моделью для изучения форм БДН с преимущественным поражением нижних двигательных нейронов.

Поражение верхних двигательных нейронов при сохранении нейронов соматосенсорной коры является еще одним характерным признаком патологии при БДН. Поэтому, в рамках настоящего исследования было проведено сравнительное изучение этих областей коры головного мозга *Thy1 μ SN* мышечной массы, и результаты исследования показали, что образование патологических γ -синуклеин реактивных включений характерно для верхних двигательных нейронов из области первичной двигательной коры головного мозга, но не для нейронов соматосенсорной области коры (рисунок 15А). Также, значительно большее количество детергент-нерастворимого γ -синуклеина было обнаружено в препаратах белка, полученных при фракционировании тканей из двигательной, по сравнению с препаратами из соматосенсорной области коры (рисунок 15Б). Преимущественное развитие γ -синуклеинопатии коррелировало с более выраженным нейровоспалительным процессом в области первичной двигательной коры головного мозга (рисунок 15А).

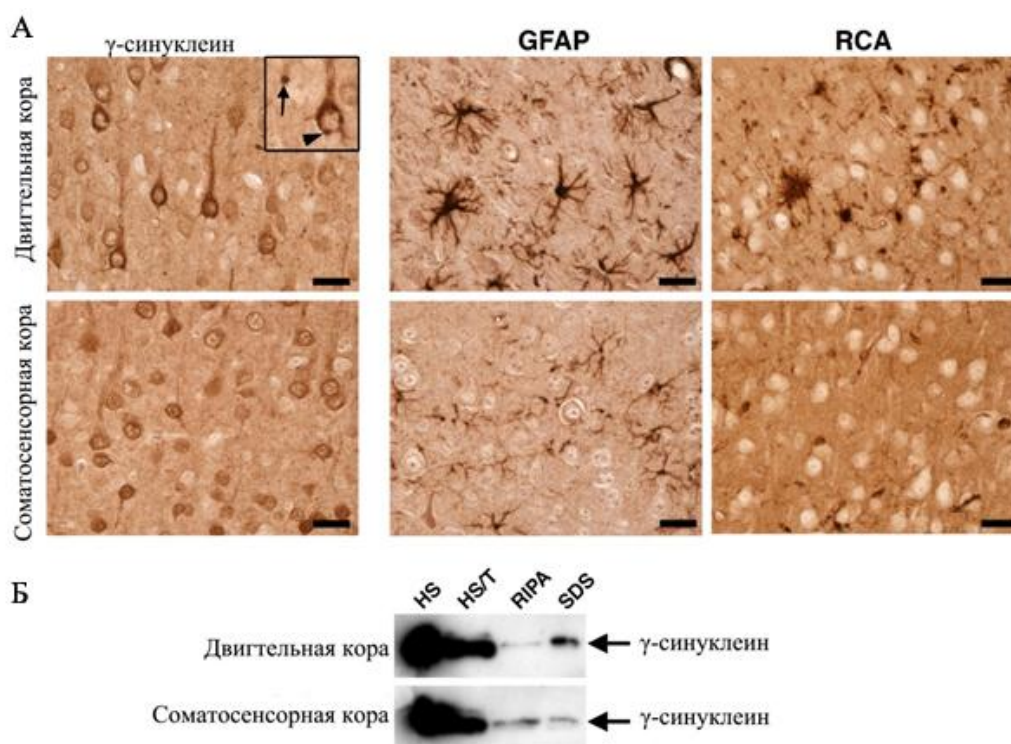


Рисунок 15. Сравнительный анализ областей первичной двигательной и соматосенсорной коры *Thy1γSN* мышей.

А: Иммуногистохимическая окраска антителами против γ -синуклеина (*А*) и маркеров астроглиоза (*GFAP*) и микроглиоза (*RCA*), шкала 75 мкм. Вставка на панели *А* демонстрирует γ -синуклеин положительные включения в цитоплазме верхнего двигательного нейрона (острие стрелки) и аксональный сфероид (стрелка). *Б:* детекция методом иммуноблотинга детергент-нерастворимых форм γ -синуклеина в тканях первичной двигательной и соматосенсорной коры *Thy1γSN* мышей; *HS* - фракция растворимых белков; *HS/T* - фракция белков, растворимых в присутствии Тритон X100 или в детергентах *RIPA* буфера (*RIPA*); *SDS* - фракция детергент-нерастворимых белков.

Отсутствие выраженных нарушений сенсорной функции у *Thy1γSN* мышей было подтверждено в экспериментах по исследованию тактильной чувствительности в группах животных разного возраста с использованием набора волосков Фрея (рисунок 16). У пациентов БДН наблюдаемые сенсорные нарушения, как правило, слабо выражены, в противоположность ярко проявляющимся двигательным нарушениям; согласно данным клинических исследований электромиографические отклонения регистрируются менее чем у 20% больных. Формы БДН, характеризующиеся сенсорной нейропатией, выделяются в отдельную группу, которая исследована на сегодняшний день гораздо хуже, чем “классические” формы БДН.

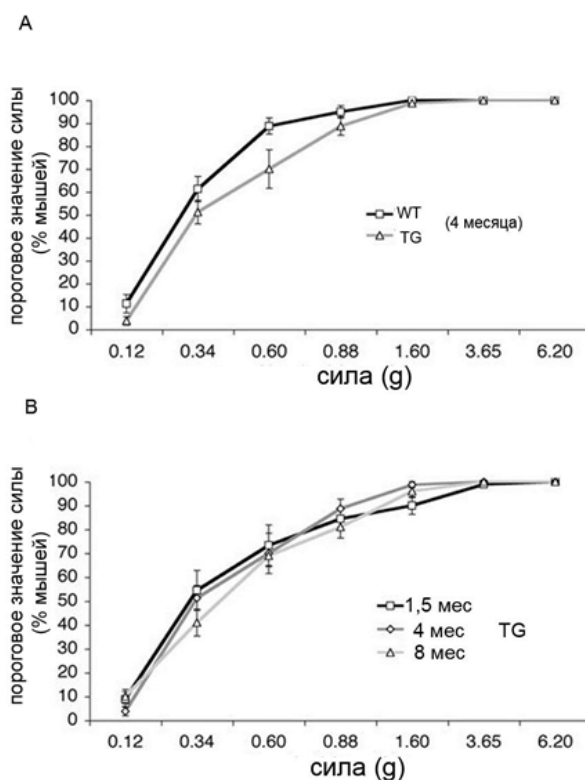


Рисунок 16. Определение тактильной чувствительности у мышей с помощью волосков Фрея.

На оси ординат указан % мышей, которые отдергивали конечность при соответствующем значении силы волоска. Одинаковая тактильная чувствительность гомозиготных *Thy1^{mySN}* (TG) и контрольных (WT) мышей в возрасте 4 месяцев (А) и отсутствие потери чувствительности на симптоматической стадии (Б).

Трансгенные технологии позволили получить целый ряд линий генетически модифицированных животных, характеризующихся прогрессирующей гибелью двигательных нейронов в тех же структурах нервной системы, которые поражаются и у больных БДН. Однако функциональное состояние сенсорной системы было достаточно глубоко исследовано лишь для немногих из имеющихся на сегодняшний день *in vivo* моделей БДН. Так, например, было показано, что наиболее широко применяемая в исследованиях трансгенная мышьяная модель БДН со сверхэкспрессией мутантной формы СОД1 (G93A) человека, характеризуется практически сопоставимой степенью дегенерации групп двигательных и сенсорных нейронов и нервных волокон. Таким образом, выраженные сенсорные нарушения можно отнести к недостаткам СОД1 модели, так как

подобные функциональные нарушения все же не характерны для большинства пациентов с БДН.

Проведенный сравнительный анализ степени нарушения сенсорной и моторной функций в созданной нами *Thy1mySN* трансгенной модели, включающий поведенческое тестирование, оценку числа сенсорных и двигательных нейронов в отдельных популяциях, гистологическую и биохимическую оценку состояния сенсорных и двигательных нейронов и нервных волокон, позволил классифицировать линию *Thy1mySN* мышей как адекватную модельную *in vivo* систему, которая может быть использована для изучения патогенеза болезни двигательного нейрона, и в первую очередь, тех форм заболевания, которые не сопровождаются развитием сенсорной нейропатии. Данная модель может также быть полезна для направленного отбора препаратов с заданными свойствами, эффективными в отношении указанных выше форм БДН.

Новый тип гистопатологических включений у больных БАС: γ -синуклеин реактивные структуры.

Нарушение метаболизма γ -синуклеина и его патогенная агрегация приводили к развитию у созданных нами трансгенных животных нейродегенеративных изменений со специфическим поражением двигательных нейронов. Это давало основание предполагать, что нарушения функции γ -синуклеина у человека, сопровождающиеся агрегацией этого белка, также могут инициировать развитие патологических процессов, которые приведут к гибели двигательных нейронов. В таком случае, среди различных форм БДН должны встречаться формы, сопровождающиеся накоплением в составе патогенных включений агрегированного γ -синуклеина. Исследования, направленные на выявление γ -синуклеин-содержащих белковых включений в тканях нервной системы больных с различными формами БДН, никогда ранее не проводились. Нами был впервые выполнен иммуногистохимический анализ аутопсий, полученных от больных БДН и контрольных групп, с

использованием двух типов антител специфически узнающих γ -синуклеин человека (SK109 и E20). Результатом этих исследований явилась идентификация нового типа включений, которые содержат γ -синуклеин и обнаруживаются в спинном мозге только больных БДН. Как следует из таблицы 1, почти половина исследованных образцов БАС (10 случаев из 22 проанализированных) содержали γ -синуклеин-реактивные включения. Подобных структур не было обнаружено ни в контрольных образцах, ни в аутопсийном материале больных другими формами НДЗ (таблица 1).

Таблица 1. Иммуногистохимический анализ аутопсий спинного мозга больных БАС и контрольных групп на присутствие γ -синуклеин реактивных включений.

Тип патологии		Число случаев	Возраст, лет	Время до фиксации, часов	Кортико-спинальный тракт		Потеря клеток Беца первичной моторной коры
					γ -синуклеин реактивные	атрофия/побледнение миелина	
Наследственные формы БАС	с мутацией в гене SOD1	3	53,7 \pm 7,7	27,7 \pm 18,4	2	2	3
	с мутацией в гене FUS	3	34,3 \pm 0,7	38,3 \pm 16,4	0	3	3
Идиопатические формы БАС		16	68,8 \pm 2,1	41,8 \pm 5,7	8	16	16
НДЗ без признаков БДН (БА, БДТЛ, БП)		8	77,8 \pm 3,5	23,1 \pm 6,6	0	0	0
Контрольные аутопсии без признаков неврологической патологии		8	70,4 \pm 4,7	59,0 \pm 8,8	0	0	0

Выявленные нами γ -синуклеин реактивные структуры встречаются исключительно в области кортико-спинального тракта, расположенного в дорзо-латеральном столбе спинного мозга, где проходят аксоны верхних двигательных нейронов коры головного мозга (рисунок 17). Мы не обнаружили γ -синуклеин реактивных включений в телах нижних двигательных нейронов, расположенных в вентральных рогах спинного мозга.

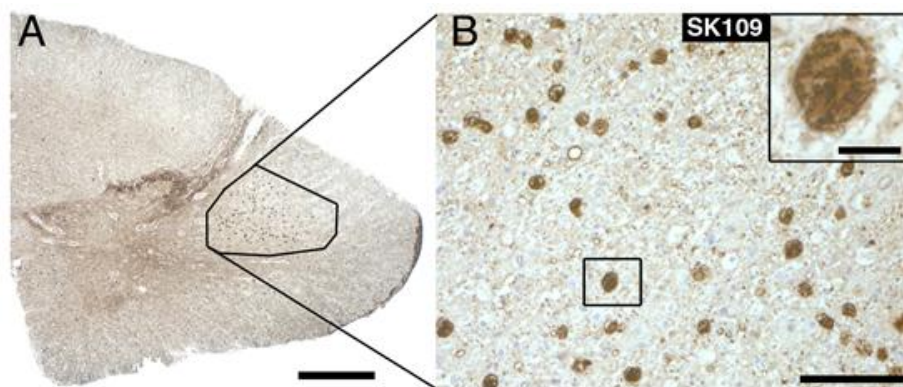


Рисунок 17. γ -синуклеин-реактивные включения в спинном мозге больного БАС.

Иммуногистохимическая окраска поперечного среза через шейный отдел спинного мозга больного с использованием антител SK109 специфически узнающих γ -синуклеин человека. γ -синуклеин реактивные включения обнаруживаются исключительно в дорзо-латеральном столбе спинного мозга (область кортико-спинального тракта) (A); при большем увеличении (B) отчетливо детектируются фибриллярные структуры овальной формы, положительно окрашиваемые специфическими антителами. Шкала 1 мм (A), 100 мкм (B) и 10 мкм (вставка).

Важно отметить, что обнаруженные нами структуры не содержали других белков, являющихся характерными маркерными белками для определенных форм БДН: TDP-43, p62, убиквитина и нейрофиламентов, что было показано методом двойного иммунофлюоресцентного окрашивания препаратов на γ -синуклеин и каждый из исследованных маркерных белков (рисунок 18). Таким образом, γ -синуклеин-реактивные включения являются специфичными для БДН гистопатологическими структурами, причем при идиопатических формах эти структуры характерны не только для формы заболевания с выраженной потерей верхних двигательных нейронов (выявлены в 4 из 11 случаев), но

также и для более редкой формы при которой не наблюдается существенной потери этих нейронов (выявлено в 4 из 5 случаев). Не было обнаружено и корреляции между присутствием γ -синуклеин-реактивных включений и степенью повреждения нисходящих двигательных волокон.

Отсутствие колокализации γ -синуклеина с пан-аксональным маркером нейрофиламентов (рисунок 18) указывает на то, что обнаруженные нами γ -синуклеин-реактивные включения не являются фрагментами деградированных аксонов, а представляют собой структуры, сформированные в сложном каскаде фибрилляции и аккумуляции, который является универсальным для процесса формирования патологических внутриклеточных включений, инициированных агрегацией амилоидогенных белков. Более того, γ -синуклеин-реактивные включения часто, хотя и не всегда, обнаруживались вблизи клеточных ядер,

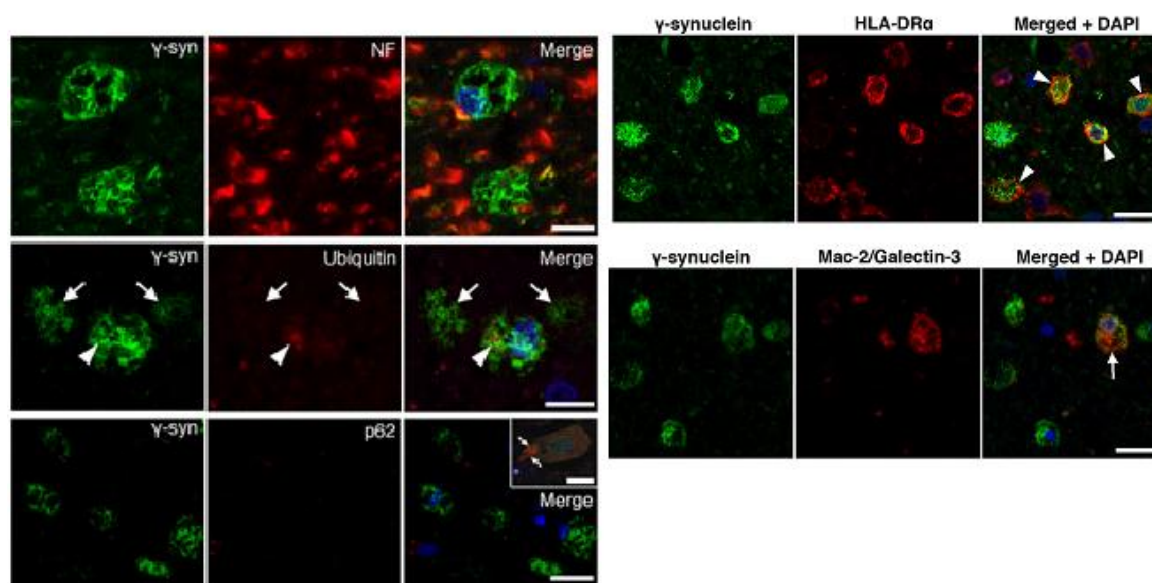


Рисунок 18. Анализ колокализации γ -синуклеина в составе включений с другими маркерными белками БАС.

Двойное иммунофлюоресцентное окрашивание гистологического среза через область дорзолатерального тракта спинного мозга больного БАС антителами против γ -синуклеина и другого маркерного белка: пан-аксонального маркера нейрофиламентов (NF); убиквитина; классического маркера белковых включений при БАС p62 (на вставке показана положительная окраска цитоплазматического включения в теле двигательного нейрона с того же среза); белка основного комплекса гистосовместимости HLA-DRa; маркерного белка фагоцитирующих астроцитов Mac-2/Galectin-3. Шкала 10 мкм на трех верхних и 20 мкм на трех нижних панелях.

окрашиваемых DAPI, что может быть свидетельством интернализации этих включений фагоцитирующей глией (рисунок 18). Это предположение подтверждается результатами совместного окрашивания препаратов антителами против γ -синуклеина и HLA-Dra - белка основного комплекса гистосовместимости, расположенного на поверхности многих типов фагоцитирующих клеток, или Mac-2/Galectin-3 - маркерного белка фагоцитирующих астроцитов. Перекраивание сигналов на периферии многих, но не всех γ -синуклеин-реактивных включений свидетельствует об активном фагоцитозе этих структур глиальными клетками.

При последовательном фракционировании белков из аутопсийного материала больных БДН детергент-нерастворимые агрегированные формы γ -синуклеина были выявлены в препаратах дорзо-латерального столба, в то время как препараты переднего рога спинного мозга тех же самых пациентов не содержали агрегированных форм этого белка (рисунок 19).

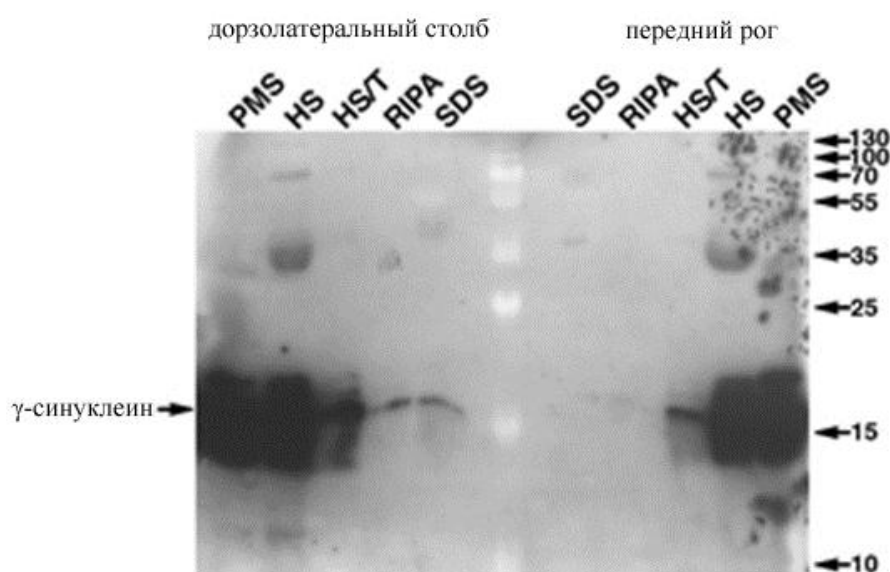


Рисунок 19. Последовательное фракционирование белков буферами с различным содержанием детергентов из аутопсийного материала больных БАС.

Детекция γ -синуклеина методом иммуноблотинга: PMS - постмитохондриальный супернатант; HS - фракция растворимых белков; HS/T - фракция белков, растворимых в присутствии Тритон X100 или в детергентах RIPA буфера (RIPA); SDS - фракция детергент-нерастворимых белков.

Следует отметить, что большие количества γ -синуклеина, наблюдаемые в растворимых фракциях, являются следствием высокого содержания этого белка в многочисленных здоровых нейронах и их аксонах, локализованных в исследованных областях. Наличие высокомолекулярных форм γ -синуклеина было не характерно даже для детергент-нерастворимых фракций, что, вероятно, отражает внутренние свойства агрегатов, сформированных γ -синуклеином, поскольку высокомолекулярные формы этого белка даже в тканях трансгенных мышей с резко выраженной патологической агрегацией γ -синуклеина и высоким содержанием γ -синуклеин-реактивных включений, обнаруживались лишь в следовых количествах [Ninkina N. et al., 2009]. Выявленные признаки молекулярной патологии γ -синуклеина в нисходящих отростках верхних двигательных нейронов позволяли предполагать, что и в телах этих нейронов будут обнаружены патологические изменения с участием γ -синуклеина. Действительно, при иммуногистохимическом анализе в первичной двигательной коре головного мозга больных БДН, имеющих γ -синуклеин-реактивные включения в дорзолатеральном столбе спинного мозга, были выявлены γ -синуклеин-реактивные дистрофические нейриты различной морфологии (рисунок 20А) и аморфные отложения (рисунок 20Б). При этом, γ -синуклеин-реактивные включения, аналогичные спинно-мозговому, в коре обнаружены не были. Таким образом, нами был описан новый тип гистопатологических включений у больных БДН, которые могут быть выявлены иммуногистохимически с использованием специфических антител против γ -синуклеина и детектируются преимущественно в верхних двигательных нейронах моторной коры головного мозга и в дорзо-латеральном столбе, где локализованы нисходящие аксоны этих нейронов. Обнаруженные нами включения не реагируют с антителами против других белков, которые специфически вовлечены в патогенез различных форм БДН. Гистопатологические структуры, содержащие γ -синуклеин, ранее были описаны при ряде нейродегенеративных заболеваний, например, в мозге

пациентов с болезнью Паркинсона, деменцией с тельцами Леви и синдромом Галлервордена-Спатца. Тем не менее, включения, которые описаны нами у больных БДН, отличаются по своей структуре и свойствам от описанных ранее γ -синуклеин-реактивных структур при других НДЗ.

Двигательная кора (БАС пациент)

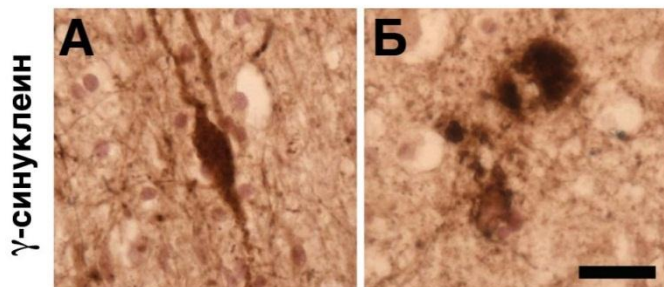


Рисунок 20. Патологические γ -синуклеин-реактивные структуры в первичной двигательной коре больного БАС.

Иммуногистохимическая окраска с использованием антител SK109, специфически узнающих γ -синуклеин человека, выявляет дистрофические нейриты (А) и аморфные отложения (В). Шкала 25мкм.

Аксональные сфероиды, которые обнаруживали в зубчатой извилине (dentate gyrus) при болезни Паркинсона и деменции с тельцами Леви, были в несколько раз мельче, а, кроме того, для их выявления необходимо было проводить предварительную обработку гистологических препаратов муравьиной кислотой. γ -синуклеин-реактивные сфероиды, выявленные у больных с синдромом Галлервордена-Спатца, одновременно реагировали с антителами против нейрофиламентов и убиквитина, в то время, как γ -синуклеин-реактивные включения у больных БДН этими антителами не детектировались. Однако, наиболее важным отличием является частота встречаемости описанных патологических структур. Описанные нами структуры характерны примерно для половины случаев БДН, в то время как лишь единичные случаи наличия γ -синуклеин-реактивных структур описаны для других НДЗ. Мы полагаем, что γ -синуклеин-реактивные включения могут формироваться на ранних стадиях атрофии верхних двигательных нейронов, поскольку включения были выявлены нами не только в случаях, когда имели место существенная потеря верхних двигательных нейронов и выраженные поражения их нисходящих аксонов, но и в тех случаях когда патологический процесс лишь незначительно затронул эти структуры. Способность γ -

синуклеина агрегировать с образованием детергент-нерастворимых фибрилл и патологических включений *in vivo*, была показана нами и другими исследователями в мышинных модельных системах [Ninkina N. et al., 2009; Nguyen J.V. et al., 2011]. Присутствие детергент-нерастворимых форм этого белка в экстрактах из дорзо-латерального столба, при том, что они отсутствуют в экстрактах переднего рога, позволяет предположить, что включения, выявленные в спинном мозге больных БДН, также сформированы агрегированными формами γ -синуклеина. Происхождение выявленных нами включений не до конца понятно. Поскольку в норме γ -синуклеин в большом количестве присутствует в аксонах верхних и нижних двигательных нейронов, то логично связать образование включений с аксональной агрегацией γ -синуклеина, вызванной изменениями внутриклеточного гомеостаза при развитии заболевания. Можно выдвинуть два предположения относительно роли этих структур в патогенезе БДН. Образовавшиеся включения могут сами по себе нарушить аксональный транспорт и тем самым усугубить и ускорить дегенеративные процессы, а их дальнейший рост может привести к механическому коллапсу и фрагментации аксонов. Однако, отсутствие белков нейрофиламентов в γ -синуклеин-реактивных включениях свидетельствует против того, что включения являются остатками разрушенных аксонов. Также можно предположить, что первичные продукты агрегации γ -синуклеина, например, олигомеры, токсичны для аксонов и ускорение следующего этапа агрегации с образованием из первичных продуктов фибрилл и включений, является механизмом нейтрализации токсичных молекул, продлевающим период функционального состояния аксона. Нельзя исключить, что верхние двигательные нейроны обладают специфическим механизмом удаления сформировавшихся γ -синуклеин-реактивных включений из их аксонов, например аналогичный, описанному в исследованиях M.Nguyen, в которых был продемонстрирован механизм формирования γ -синуклеин-реактивных сфероидов в оптическом нерве мышей при патологии, моделирующей развитие

глаукомы. В этой модельной системе показана передача аксональных агрегатов γ -синуклеина определенному субклассу астроцитов, экспрессирующих белок Mac-2/galactin-3, что может объяснить описанную ранее И.Сургучевой с соавт. аккумуляцию γ -синуклеина в астроцитах оптического нерва пациентов с глаукомой, при том, что в норме γ -синуклеин не экспрессируется в глиальных клетках. В области кортико-спинального тракта спинного мозга больных БДН часто наблюдаются γ -синуклеин-реактивные структуры, поглощенные клетками, экспрессирующими специфические маркеры фагоцитирующей глии, в том числе и Mac-2/galactin-3 (рисунок 18), который J.Y.Zhou ассоциирует с рядом форм БДН. Эти результаты позволяют предположить, что в какой-то момент образовавшиеся в аксонах верхних двигательных нейронов агрегаты γ -синуклеина фагоцитируются специализированными глиальными клетками.

Мы обнаружили новый тип патогистологических изменений в спинном мозге больных БДН, проявляющийся аккумуляцией агрегированных форм γ -синуклеина, образующихся в аксонах верхних двигательных нейронов, предположительно на ранних стадиях дегенерации этих клеток. Принимая во внимание, что нам удалось вызвать дегенеративные изменения в двигательных нейронах мышцы путем повышения продукции γ -синуклеина, приводящей к его агрегации, можно заключить, что этот белок вовлечен в патогенез ряда форм болезней двигательного нейрона.

Использование трансгенных модельных систем для разработки патогенетической терапии БДН.

Являясь важным элементом патогенеза протеинопатий, каскадная агрегация потенциально амилоидогенных белков рассматривается в настоящее время как возможная мишень для создания нового поколения терапевтических средств, способных модифицировать процессы, лежащие в основе развития нейродегенерации. Эффективность разработок такого рода препаратов может быть существенно оптимизирована применением адекватных *in vivo* моделей, и в первую очередь, линий трансгенных мышей, в нервной системе которых

воспроизводятся молекулярно-клеточные основы патологического процесса, приводящего к развитию определенного типа НДЗ. Линия трансгенных мышей *Thy1mySN* была успешно использована нами для изучения механизма действия отечественного препарата Димебон - соединения широкого спектра действия, для которого нейропротекторные свойства были подтверждены в ряде модельных систем с использованием различных методов, хотя его непосредственные молекулярно-клеточные мишени до сих пор не установлены. В клинических испытаниях II стадии применение препарата статистически достоверно улучшало показатели когнитивной функции у больных БА. Ранее на клеточных культурах нами было показано, что Димебон влияет на формирование и/или стабильность патогенных белковых агрегатов, формируемых при эктопной экспрессии белков, играющих роль в этиологии и патогенезе нейродегенеративных болезней [Yamashita M. et. al., 2009]. Использование трансгенных мышей линии *Thy1mySN* позволило провести подробное изучение действия Димебона на разных стадиях развития протеинопатии и охарактеризовать молекулярно-клеточные элементы нейродегенеративного процесса, на которые этот препарат оказывал ингибирующее действие. Экспериментальные животные хронически получали препарат по двум протоколам: либо начиная с пресимптоматической стадии γ -синуклеинопатии, либо на генерализованной стадии заболевания с выраженной неврологической симптоматикой. Как показал анализ баланса и координации *Thy1mySN* мышей на вращающемся стержне, применение Димебона существенно замедляло развитие двигательной дисфункции у модельных животных в обеих экспериментальных группах (рисунок 21).

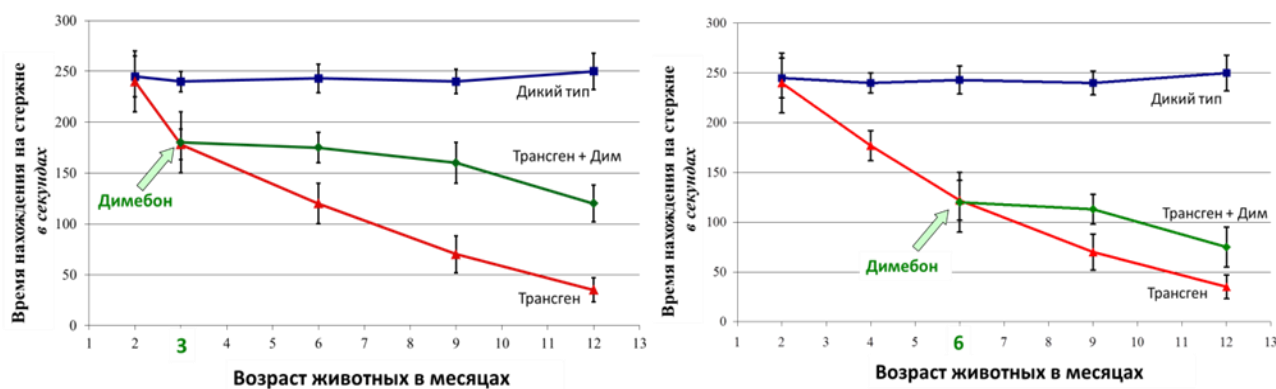


Рисунок 21. Анализ баланса и координации *Thy1mySN* мышей на вращающемся стержне.

Стрелкой указано время начала применения Димебона.

Несмотря на то, что уровень выживаемости *Thy1mySN* мышей был по-прежнему существенно ниже, чем у контрольных животных дикого типа, средняя продолжительность жизни трансгенных животных, получавших Димебон с трех-месячного возраста, статистически достоверно увеличивалась (таблица 2).

Таблица 2. Влияние хронического применения Димебона на выживаемость *Thy1mySN* мышей.

Группа	% выживших животных в различных возрастных группах								
	9 мес	10 мес	11 мес	12 мес	14 мес	15 мес	16 мес	17 мес	18 мес
-Димебон	82±8	70±12	55±15	40±15	20±6	15±5	0	0	0
+Димебон	89±6	80±9	70±10	65±5	43±9	35±8	28±7	21±7	0
C57Bl6J*	100±0	100±0	100±0	100±0	98±2	98±0	97±1	97±0	96±1

*C57Bl6J – нетрансгенные животные того же генетического фона (дикий тип)

При этом нейровоспалительная реакция, сопровождающая γ -синуклеинопатию, была менее выраженной у животных, получавших Димебон. Как показывает анализ количества и морфологии активированных астроцитов в препаратах спинного мозга *Thy1 μ SN* мышей, реактивный астроглиоз заметно ингибировался при хроническом применении Димебона (рисунок 22).

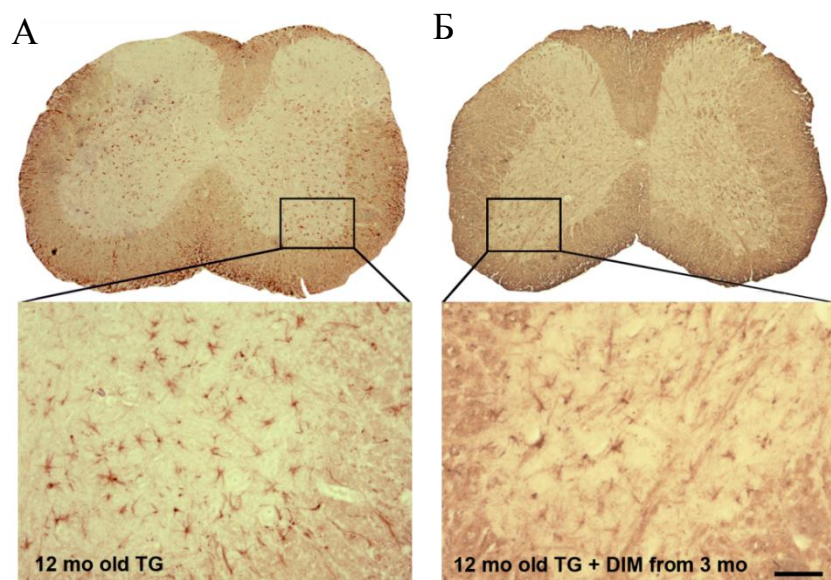


Рисунок 22. Влияние Димебона на реактивный астроглиоз. Иммуногистохимическая окраска срезов через область передних рогов спинного мозга *Thy1 μ SN* мышей антителами против маркерного белка активированных астроцитов GFAP. А: контрольная группа *Thy1 μ SN*, не получавшая Димебон; Б: группа *Thy1 μ SN*, получавшая Димебон в течение 9 месяцев.

При патогистологическом исследовании образцов тканей нервной системы *Thy1 μ SN* мышей, получавших Димебон в течение девяти месяцев, было выявлено значительное уменьшение амилоидных включений, сформированных агрегированным γ -синуклеином и окрашиваемых Конго красным, по сравнению с *Thy1 μ SN* животными такого же возраста, которые не получали препарат (таблица 3). Это давало основание предполагать, что Димебон может влиять *in vivo* на процесс образования и/или стабильности агрегатов, формируемых потенциально амилоидогенными белками.

Таблица 3. Влияние хронического применения Димебона на число амилоидных включений в передних рогах грудного отдела спинного мозга *Thy1mySN* мышей.

Начало введения Димебона (возраст в мес)	Длительность введения Димебона	Число амилоидных включений на 0,01 мм ² , среднее±ошибка средней	% по отношению к контролю
3 месяца	6 месяцев	20,0±1,6	41,2
6 месяцев	3 месяца	24,6±1,0	27,5
контроль	-	34,0±5,4	100

При биохимических исследованиях тканей спинного мозга *Thy1mySN* мышей было показано влияние Димебона на формирование фибриллярных, структур, образованных γ -синуклеином, который является основным белковым компонентом амилоидных внутриклеточных включений в нейронах трансгенных мышей. Содержание фибриллярных детергент-нерастворимых форм γ -синуклеина в образцах белка из тканей спинного мозга трансгенных мышей, получавших Димебон, было существенно снижено по сравнению с количеством таких форм белка в образцах от контрольных трансгенных животных, не получавших препарат (рисунок 23). При этом содержание промежуточных продуктов белковой агрегации – олигомеров и протофибрилл, которые являются детергент-растворимыми и высвобождаются из осадков ресуспендированием в присутствии детергента Тритон X-100, было одинаковым в белковых препаратах из экспериментальной и контрольной групп *Thy1mySN* мышей. Уровень мономерного убиквитина в растворимой фракции белков спинного мозга *Thy1mySN* мышей повышался при воздействии Димебона (рисунок 23), в то время как уровень убиквитинированных белков понижался, что свидетельствует об активации убиквитин-протеасомной системы – важного компонента внутриклеточных систем контролируемой деградации аберантных белков и их патогенных агрегированных форм.

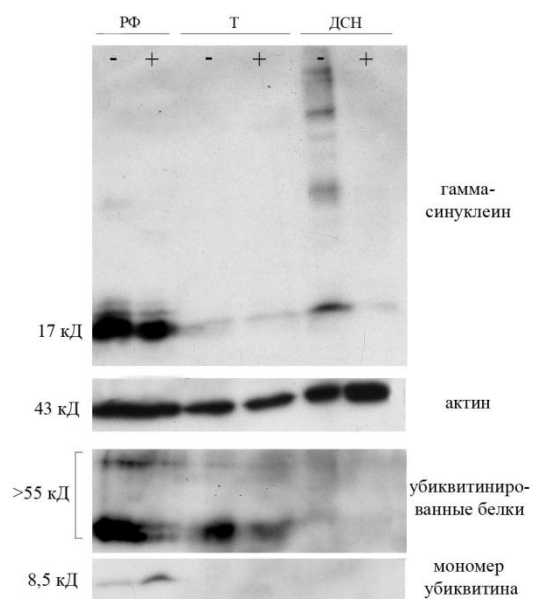


Рисунок 23. Эффект Димебона на содержание γ -синуклеина в детергент-нерастворимых фракциях из тканей спинного мозга *Thy1mySN* мышей.

Растворимые (ДФ), растворимые только в присутствии детергента Тритона X100 (Т) и детергент-нерастворимые (ДСН) белки, полученные при последовательном фракционировании экстрактов из спинного мозга трансгенных животных, получавших (+) и не получавших (-) Димебон анализировали методом иммуноблотинга с антителами против γ -синуклеина (верхняя панель), β -актина (нижняя панель) и убиквитина (нижние панели).

Полученные данные позволяют предположить, что снижение содержания амилоидных включений, выявленное нами при гистологическом анализе срезов спинного мозга животных, получавших Димебон, может являться следствием активации протеасомной деградации γ -синуклеина или первичных продуктов его агрегации. Таким образом, применение трансгенной линии *Thy1mySN* мышей оказалось исключительно эффективным инструментом при изучении механизма действия нейропротекторного препарата, выявлению его мишеней, действие которых направлено непосредственно на патогенез протеинопатий.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Участие γ -синуклеина в патогенезе протеинопатий все еще остается недостаточно хорошо исследованным. Во многом это объясняется тем, что при изучении синуклеинов основное внимание традиционно уделялось другому члену этого семейства белков – α -синуклеину, являющемуся основным компонентом телец Леви и подобных патологических внутриклеточных включений, и играющему важную роль в этиологии и патогенезе ряда НДЗ, включая болезнь Паркинсона. Несмотря на то, что и структурно, и по своим физико-химическим свойствам, α - и γ -синуклеины схожи и оба являются потенциально амилоидогенными белками, участие γ -синуклеина в патогенной агрегации, которая может привести к развитию нейродегенеративного процесса, не было экспериментально доказано.

В данной диссертационной работе объединены результаты многолетних исследований нормальной функции γ -синуклеина и его участия в нейродегенеративных процессах. Анализ уровней мРНК и белка в различных анатомических структурах нервной системы мыши в эмбриональном развитии и в постнатальном периоде, позволили установить динамику экспрессии и внутриклеточной локализации γ -синуклеина, а также создать карту распределения этого белка по отделам нервной системы и типам нейронов. В центральной нервной системе взрослых мышей максимальная экспрессия была выявлена в двигательных нейронах передних рогов спинного мозга и ядер черепно-мозговых нервов ствола головного мозга, а максимальное содержание γ -синуклеина – в аксонах этих нейронов. Нарушение функции двигательных нейронов приводит к развитию тяжелых заболеваний, в том числе БДН. Наши исследования впервые продемонстрировали участие γ -синуклеина в патологических процессах, сопровождающих ряд форм этой группы заболеваний. Создание трансгенной модели γ -синуклеинопатии и анализ патологических изменений в нервной системе трансгенных мышей подтвердили выдвинутые нами предположения, что агрегация γ -синуклеина

может вызвать дегенерацию нейронов и их аксонов, и что двигательные нейроны обладают повышенной чувствительностью к продуктам агрегации γ -синуклеина. Таким образом мы выявили новое звено в сложном каскаде патологических событий, приводящем к развитию одного из самых тяжелых и неизлечимых заболеваний - БДН. Более того, при исследовании аутопсийного материала больных нами был впервые описан новый тип гистопатологических включений – γ -синуклеин-реактивные структуры, что окончательно подтвердило важную роль γ -синуклеина в патогенезе БДН. Созданная нами трансгенная модель может быть использована не только для изучения деталей процесса дегенерации двигательных нейронов и их аксонов, но и для тестирования препаратов, способных ингибировать или остановить этот процесс, как продемонстрировано нами на примере препарата Димебон, ранее не рассматривавшегося как средство для лечения болезней двигательного нейрона.

ВЫВОДЫ

1. Идентифицирован и охарактеризован новый фактор, вовлеченный в патогенез болезни двигательного нейрона, - γ -синуклеин - ранее неизвестный член семейства синуклеинов; охарактеризована структура кодирующих его генов человека и мыши, изучена экспрессия γ -синуклеина в процессе эмбрионального развития мыши.
2. Создана карта распределения γ -синуклеина по отделам нервной системы, выявлена динамика изменения его продукции и внутриклеточной локализации в развивающемся организме.
3. Выявлена роль γ -синуклеина в стабилизации сети нейрофиламентов в нейронах.
4. Впервые было показано, что для ряда форм болезни двигательного нейрона характерна патогенная агрегация γ -синуклеина в аксонах двигательных нейронов с образованием прежде не описанных патогистологических включений.

5. Созданы уникальные линии генетически модифицированных мышей с повышенным уровнем продукции γ -синуклеина в нейронах различных отделов нервной системы, позволившие моделировать патологические процессы, обусловленные нарушением метаболизма этого белка.
6. Детальная фенотическая характеристика с использованием молекулярно-биологических, биохимических, гистологических и поведенческих методов исследования показала, что патологические изменения в нервной системе трансгенных животных линии Thy1 μ SN схожи с изменениями, характерными для болезни двигательного нейрона, что свидетельствует в пользу участия γ -синуклеина в патогенезе определенных форм этого заболевания.
7. Новая трансгенная модель Thy1 μ SN может быть использована как для изучения молекулярно-клеточных процессов, сопровождающих развитие болезни двигательного нейрона, так и для тестирования новых лекарственных препаратов при разработке патогенетической терапии болезни двигательного нейрона, что продемонстрировано на примере изучения механизма нейропротекторного действия отечественного препарата Димебон.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Buchman V.L., Adu J., Pinon L.G., Ninkina N.N., Davies A.M. Persyn, a member of the synuclein family, influences neurofilament network integrity // Nature Neurosci. – 1998a. – V. 1. – № 2. – P. 101-103.
2. Buchman V.L., Hunter H.J., Pinon L.G., Thompson J., Privalova E.M., Ninkina N.N., Davies A.M. Persyn, a member of the synuclein family, has a distinct pattern of expression in the developing nervous system // J Neurosci. – 1998b. – V. 18. – № 22. – P. 9335-9341.

3. Ninkina N.N., Alimova-Kost M.V., Paterson J.W., Delaney L., Cohen B.B., Imreh S., Gnuchev N.V., Davies A.M., Buchman V.L. Organization, expression and polymorphism of the human persyn gene // *Hum Mol Genet.* – 1998. – V. 7. – № 9. – P. 1417-1424.
4. Alimova-Kost M.V., Ninkina N.N., Imreh S., Gnuchev N.V., Adu J., Davies A.M., Buchman V.L. Genomic structure and chromosomal localization of the mouse persyn gene // *Genomics.* – 1999. – V. 56. – № 2. – P. 224-227.
5. Flowers J.M., Leigh P.N., Davies A.M., Ninkina N.N., Buchman V.L., Vaughan J., Wood N.W., Powell J.F. Mutations in the gene encoding human persyn are not associated with amyotrophic lateral sclerosis or familial Parkinson's disease // *Neurosci Lett.* – 1999. – V. 274. – № 1. – P. 21-24.
6. Ninkina N.N., Privalova E.M., Pinon L.G., Davies A.M., Buchman V.L. Developmentally regulated expression of persyn, a member of the synuclein family, in skin // *Exp Cell Res.* – 1999. – V. 246. – № 2. – P. 308-311.
7. Tiunova A.A., Anokhin K.V., Saha A.R., Schmidt O., Hanger D.P., Anderton B.H., Davies A.M., Ninkina N.N., Buchman V.L. Chicken synucleins: cloning and expression in the developing embryo // *Mech Dev.* – 2000. – V. 99. – № 1-2. – P. 195-198.
8. Нинкина Н.Н., Бухман В.Л. Синуклеины: иметь или не иметь? // *Генетика.* – 2000. – Т. 36. – № 11. – С. 1487-1491.
9. Ninkina N., Papachroni K., Robertson D.C., Schmidt O., Delaney L., O'Neill F., Court F., Rosenthal A., Fleetwood-Walker S.M., Davies A.M., Buchman V.L. Neurons expressing the highest levels of gamma-synuclein are unaffected by targeted inactivation of the gene // *Mol Cell Biol.* – 2003. – V. 23. – № 22. – P. 8233-8245.
10. Robertson D.C., Schmidt O., Ninkina N., Jones P.A., Sharkey J., Buchman V.L. Developmental loss and resistance to MPTP toxicity of dopaminergic neurones in substantia nigra pars compacta of gamma-synuclein, alpha-

- synuclein and double alpha/gamma-synuclein null mutant mice // *J Neurochem.* – 2004. – V. 89. – № 5. – P. 1126-1136.
11. Papachroni K., Ninkina N., Wanless J., Kalofoutis A.T., Gnuchev N.V., Buchman V.L. Peripheral sensory neurons survive in the absence of alpha- and gamma-synucleins // *J Mol Neurosci.* – 2005. – V. 25. – № 2. – P. 157-164.
 12. Surgucheva I., Ninkina N., Buchman V.L., Grasing K., Surguchov A. Protein aggregation in retinal cells and approaches to cell protection // *Cell Mol Neurobiol.* – 2005. – V. 25. – № 6. – P. 1051-1066.
 13. Kuhn M., Haebig K., Bonin M., Ninkina N., Buchman V.L., Poths S., Riess O. Whole genome expression analyses of single- and double-knock-out mice implicate partially overlapping functions of alpha- and gamma-synuclein // *Neurogenetics.* – 2007. – V. 8. – № 2. – P. 71-81.
 14. Akil O., Weber C.M., Park S.N., Ninkina N., Buchman V., Lustig L.R. Localization of synucleins in the mammalian cochlea // *J Assoc Res Otolaryngol.* – 2008. – V. 9. – № 4. – P. 452-463.
 15. Buchman V.L., Ninkina N. Modulation of alpha-synuclein expression in transgenic animals for modelling synucleinopathies--is the juice worth the squeeze? // *Neurotox Res.* – 2008. – V. 14. – № 4. – P. 329-341.
 16. Нинкина Н.Н., Устюгов А.А., Бухман В.Л. Моделирование синуклеинопатий в генетически модифицированных животных – успехи и неудачи // *Молекуляр. биология.* – 2008. – № 42. – С. 840–855.
 17. Ninkina N., Peters O., Millership S., Salem H., van der Putten H., Buchman V.L. Gamma-synucleinopathy: neurodegeneration associated with overexpression of the mouse protein // *Hum Mol Genet.* – 2009. – V. 18. – № 10. – P. 1779-1794.
 18. Yamashita M., Nonaka T., Arai T., Kametani F., Buchman V.L., Ninkina N., Bachurin S.O., Akiyama H., Goedert M., Hasegawa M. Methylene blue and dimebon inhibit aggregation of TDP-43 in cellular models // *FEBS Lett.* – 2009. – V. 583. – № 14. – P. 2419-2424.

19. Бачурин С.О., Устюгов А.А., Петерс О., Шелковникова Т.А., Бухман В.Л., Нинкина Н.Н. Блокада нейродегенеративных процессов, вызванных протеинопатией, как новый механизм действия нейропротекторных и когнитивно-стимулирующих препаратов // ДАН. – 2009. – № 428. – С. 262–265.
20. Bachurin S.O., Shelkovnikova T.A., Ustyugov A.A., Peters O., Khritankova I., Afanasieva M.A., Tarasova T.V., Alentov, II, Buchman V.L., Ninkina N.N. Dimebon Slows Progression of Proteinopathy in gamma-Synuclein Transgenic Mice // Neurotox Res. – 2011. – V. 22. – № 1. – P. 33-42.
21. Shelkovnikova T.A., Ustyugov A.A., Millership S., Peters O., Anichtchik O., Spillantini M.G., Buchman V.L., Bachurin S.O., Ninkina N.N. Dimebon does not ameliorate pathological changes caused by expression of truncated (1-120) human alpha-synuclein in dopaminergic neurons of transgenic mice // Neurodegener Dis. – 2011. – V. 8. – № 6. – P. 430-437.
22. Кохан В.С., Болкунов А.В., Устюгов А.А., Ванькин Г.И., Шелковникова Т.А., Стрекалова Т.В., Редкозубова О.М., Бухман В.Л., Нинкина Н.Н., Бачурин С.О. Направленная инактивация гена, кодирующего гамма-синуклеин, влияет на уровень тревожности и исследовательской активности мышей // Журнал высшей нервной деятельности. – 2011. – Т. 61. – № 1. – С. 85-93.
23. Скворцова В.И., Бачурин С.О., Разинская О.Д., Смирнов А.П., Ковражкина Е.А., Почигаева К.И., Нинкина Н.Н., Шелковникова Т.А., Устюгов А.А. Новые аспекты патогенеза бокового амиотрофического склероза // Журнал неврологии и психиатрии им. Корсакова. – 2011. – Т. 2. – С. 4-9.
24. Устюгов А.А., Нинкина Н.Н. Разработка генетической модели прогрессирующей протеинопатии в трансгенных мышях с целью создания нового поколения нейропротекторных препаратов,

- действующих на патогенез нейродегенеративных заболеваний // Технологии живых систем. – 2011а. – Т. 8. – С. 23-31.
25. Устюгов А.А., Шелковникова Т.Т., Кохан В.С., Хританкова И.В., О. Петерс О., Бухман В.Л., Бачурин С.О., Нинкина Н.Н. Димебон снижает содержание агрегированных форм амилоидогенного белка в детергент-нерастворимых фракциях *in vivo* // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2011b. – Т. 152. – № 12. – С. 675-678.
26. Шелковникова Т.А., Устюгов А.А., Смирнов А.П., Скворцова В.И., Бухман В.Л., Бачурин С.О., Нинкина Н.Н. Мутации в гене FUS, ассоциированные с наследственными формами бокового амиотрофического склероза, влияют на клеточную локализацию кодируемого белка и его способность к агрегации // Доклады Академии наук: Биохимия и Биофизика. – 2011. – Т. 438. – № 3. – С. 422-426.
27. Кохан В.С., Ванькин Г.И., Нинкина Н.Н., Бачурин С.О., Шамакина И.Ю. Синуклеины: возможная роль в патогенезе зависимости от психоактивных веществ // Вопросы наркологии. – 2012. – Т. 1. – С. 87-95.
28. Шелковникова Т.А., Куликова А.А., Цветков Ф.О., Петерс О., Бачурин С.О., Бухман В.Л., Нинкина Н.Н. Протеинопатии – формы нейродегенеративных заболеваний, в основе которых лежит патологическая агрегация белков // Молекулярная биология. – 2012. – Т. 46. – № 3. – С. 402-415.
29. Peters O., Millership S., Shelkovnikova T.A., Soto I., Keeling L., Hann A., Marsh-Armstrong N., Buchman V.L., Ninkina N. Selective pattern of motor system damage in gamma-synuclein transgenic mice mirrors the respective pathology in amyotrophic lateral sclerosis // *Neurobiol Dis.* – 2012. – V. 48. – P. 124–131.

Ninkina Natalia Nikolaevna

**Molecular and cellular mechanisms in pathogenesis of motor neuron disease:
role of gamma synuclein.**

Abstract

Motor neuron disease (MND) is a group of fatal disorders characterised by selective loss of discrete populations of upper and lower motor neurons. Currently there is no effective cure for MND and one of the main reasons is poor understanding of molecular and cellular mechanisms causing damage and death of selective populations of motor neurons. The aim of the present study was to reveal new key factors involved in pathogenesis of MND. A novel member of the synuclein family of proteins, γ -synuclein, has been revealed as an important component of pathogenic cascade implicated in selective loss of certain types of motor neurons. The highest level and developmentally regulated pattern of γ -synuclein expression have been found in motor neurons as well as high abundance of the protein in axons of mature neurons, where it is involved in structural stabilisation of the neurofilament network and thus, functional integrity of axonal cytoskeleton. To model γ -synucleinopathy in vivo, a transgenic mouse line Thy1 μ γ SN has been produced. Detailed studies of these transgenic mice have demonstrated that when overexpressed in neurons, unmodified γ -synuclein aggregates, fibrillates and forms axonal and perikaryal inclusions, coupled with progressive and selective loss of motor neurons and their axons as well as the development of clinical signs of motor neuron pathology. This model has been proved to be useful for testing drugs affecting pathological protein aggregation in the nervous system. Further confirmation of γ -synuclein involvement in pathogenesis of MND came from the analysis of postmortem patient samples that has revealed a novel type of pathological profiles formed by aggregated γ -synuclein specifically in the dorsolateral column of the spinal cord in nearly a half of studied cases. Taken together results obtained in the present study allow suggesting a new pathogenic mechanism in a subset of MND cases – pathological aggregation of γ -synuclein in cell bodies and particularly, axons of upper and lower motor neurons leading to their structural damage and functional dysfunction.