

УДК 616.8

Интравентрикулярное введение экзосом от пациентов с боковым амиотрофическим склерозом вызывает болезнь двигательного нейрона у мышей

А. В. Ставровская¹, Д. Н. Воронков¹, А. К. Павлова¹, А. С. Ольшанский¹, Б. В. Белугин², М. В. Иванова¹, М. Н. Захарова¹, С. Н. Иллариошкин^{1*}

¹Научный центр неврологии, Министерство науки и высшего образования РФ, Москва, 125367 Россия

²Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи Министерства здравоохранения РФ, Москва, 123098 Россия

*E-mail: snillario@gmail.com

Поступила в редакцию 21.09.2024

Принята к печати 02.10.2024

DOI: 10.32607/actanaturae.27499

РЕФЕРАТ Боковой амиотрофический склероз (БАС) – тяжелое заболевание центральной нервной системы (ЦНС) с поражением мотонейронов и гибелью пациентов от дыхательных нарушений. Нейродегенеративный процесс при БАС характеризуется накоплением в клетках ЦНС aberrantных белков (TDP-43, SOD1 и др.), трансинаптическое распространение которых посредством экзосом может быть одним из механизмов прогрессирования патологии. Изучали эффект интравентрикулярного введения экзосом, полученных из цереброспинальной жидкости (ЦСЖ) больных БАС, на двигательную активность мышей и патоморфологию ЦНС. Экзосомы получали от двух пациентов с БАС и здорового донора. Суспензию экзосом в высоком и низком разведениях вводили в боковые желудочки мозга мышшей-самцов линии BALB/C ($n = 45$); двигательную активность и физиологические показатели оценивали 2 раза в месяц, морфологическое исследование спинного мозга проводили через 14 месяцев после начала эксперимента. Через 9 месяцев после введения экзосом от пациентов с БАС у животных формировался патологический двигательный фенотип – изменение локомоции с парезом задних конечностей, нарушением координации, нарастанием эпизодов неподвижности. Двигательные симптомы развивались быстрее после введения экзосом в более высокой концентрации. Выявлено значимое снижение плотности мотонейронов в вентральных рогах спинного мозга мышшей опытной группы, а также значимое увеличение числа клеток микроглии и ее активация. Белок TDP-43 у контрольных мышшей локализовался в ядрах мотонейронов, тогда как в опытной группе наблюдали нарушения локализации TDP-43 и его накопление в цитоплазме. Таким образом, показан иницирующий эффект экзосомных белков, полученных из ЦСЖ от пациентов с БАС, в развитии патологии мотонейронов у экспериментальных животных, что подтверждает патогенетическую роль экзосом в распространении нейродегенеративного процесса и открывает возможность определения новых мишеней для таргетной терапии БАС.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА боковой амиотрофический склероз, нейродегенерация, мотонейроны, экзосомы, TDP-43.
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ БАС – боковой амиотрофический склероз (ALS – amyotrophic lateral sclerosis); ЛВД – лобно-височная деменция (FTD – fronto-temporal dementia); ОП – открытое поле (OF – open field); СД – сужающаяся дорожка (NP – narrowing path); СДГ – сукцинатдегидрогеназа (SDH – succinate dehydrogenase); ЦНС – центральная нервная система (CNS – central nervous system); ЦСЖ – цереброспинальная жидкость (CSF – cerebrospinal fluid); IBA1 – аллотрансплантатный воспалительный фактор-1 или адапторная молекула-1, связывающая ионизированный кальций (ionized calcium binding adaptor molecule 1); IL – интерлейкин (interleukin); PGP9.5/UCHL1 – карбоксиконцевая убиквитингидролаза L1 (protein gene product 9.5/ubiquitin carboxy-terminal hydrolase L1).

ВВЕДЕНИЕ

Боковой амиотрофический склероз (БАС) – тяжелое нейродегенеративное заболевание, которое до настоящего времени остается неизлечимым. БАС характеризуется селективным поражением верхнего и нижнего мотонейронов, локализованных соответственно в двигательной коре головного мозга и в периферических ядрах (стволе головного мозга и передних рогах спинного мозга) [1]. Такая локализация патологического процесса при БАС приводит к прогрессирующей нейрогенной мышечной слабости, исходом чего является нарушение жизненно важных функций – дыхания и глотания, с неизбежным развитием дыхательной недостаточности и необходимостью проведения инвазивной вентиляции легких и гастростомии. Заболевание отличается значительной клинической гетерогенностью, обусловленной первичной локализацией нейродегенеративных изменений (бульбарный или спинальный уровень), степенью вовлечения верхнего и/или нижнего мотонейрона, скоростью прогрессирования, различием патогенных мутаций.

БАС относится к группе орфанных болезней, его распространенность составляет около 5 на 100 000 населения в год, а заболеваемость – от 2 до 3 случаев на 100 000 населения в год [2]. Средний возраст развития первых симптомов заболевания варьирует от 55 до 65 лет, но в последние десятилетия отмечается отчетливая тенденция к уменьшению возраста дебюта и возрастанию уровня заболеваемости БАС [3]. У большинства пациентов причина БАС остается неизвестной; эти случаи классифицируются как спорадические, обуславливающие 90% структуры заболевания. На долю генетически обусловленных (семейных) форм БАС, связанных с каузальными мутациями в различных генах, приходится около 10% всех случаев [1]. Среди основных звеньев молекулярного патогенеза БАС называют нарушение протеостаза белков, аберрантный метаболизм РНК, нарушение эндосомного и везикулярного транспорта, митохондриальную дисфункцию, нейровоспаление и др., значение которых требует уточнения [2]. Наличие генетических форм БАС позволило получить репрезентативные клеточные и животные модели этого заболевания на основе экспрессии в модельных организмах мутаций в генах *SOD1*, *TARDBP*, *FUS* и др., при этом в экспериментальных исследованиях чаще всего используются трансгенные мыши линии B6SJL-Tg (*SOD1*-G93A) [3].

Исследования последних лет отводят большую роль одному из механизмов распространения дегенеративного процесса в центральной нервной системе (ЦНС) при помощи внеклеточных везикул, преимущественно представленных экзосомами [4].

Экзосомы – это инкапсулированные частицы, обогащенные различными молекулами, включая мембранные и цитоплазматические белки, липиды и нуклеиновые кислоты [5]. В качестве эффективных транспортных систем экзосомы доставляют молекулярные грузы к клеткам-реципиентам, что позволяет рассматривать их как один из наиболее важных инструментов межклеточной коммуникации как в физиологических, так и в патологических процессах [6]. Экзосомы происходят из внутриклеточных мультивезикулярных телец и имеют диаметр от 30 до 150 нм [7]. В процессе созревания экзосомы экспортируются во внеклеточное пространство, где способны проникать в кровоток, в том числе преодолевать гематоэнцефалический барьер (ГЭБ) [8], в связи с чем их можно обнаружить в различных биологических жидкостях [9, 10]. Многие из белковых продуктов генов, ассоциированных с БАС, обнаружены в экзосомах, посредством которых они способны перемещаться между нейрональными и глиальными клетками в различных областях мозга, способствуя распространению нейродегенерации [11]. Среди этих белков следует в первую очередь упомянуть *SOD1*, *TDP-43*, *FUS* и белки с дипептидными повторами, характерные для внутриклеточных включений при мутациях в гене *C9orf72* [6]. В исследовании Braak и соавт. [12] предложено несколько гипотез распространения нейродегенеративного процесса в ЦНС при БАС, и одной из самых привлекательных считается передача патологических белков между смежными областями ЦНС посредством экзосомного транспорта. Распространение симптоматики на смежные анатомические области, характерное для БАС, по-видимому, клинически отражает передачу патологически агрегированных белков между соседними клетками и внутри взаимосвязанных областей ЦНС.

Цель настоящего исследования состояла в изучении эффекта интравентрикулярного введения экзосомной фракции, полученной из цереброспинальной жидкости (ЦСЖ) пациентов со спорадической формой БАС, а также здорового донора, на двигательную активность модельных животных и патоморфологию ЦНС.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ**Получение суспензии с экзосомами**

Используемые в работе экзосомы получены от двух пациентов с БАС. Пациент БАС110 – мужчина, 48 лет, шейно-грудная форма БАС, стадия 4а, длительность заболевания 8 мес.; пациент БАС111 – мужчина, 67 лет, шейно-грудная форма БАС, стадия 4а, длительность заболевания 26 мес. Материал, обо-

значаемый далее как «контроль», получен от клинически здоровой женщины 57 лет.

Экзосомы из ЦСЖ выделяли согласно инструкции к набору Total Exosome Isolation (from other body fluids) (Invitrogen, ref. 4484456). Все операции проводили в асептических условиях. Перед выделением аликвоту ЦСЖ 0.5 мл последовательно центрифугировали (2000 g, 30 мин, 4°C), очищенный супернатант затем центрифугировали при 10000 g в течение 30 мин и 4°C. Полученный супернатант тщательно смешивали с реагентом Total Exosome Isolation, инкубировали при 2–8°C в течение 1 ч и осаждали экзосомы центрифугированием (10000 g, 1 ч, 2–8°C). Осадок ресуспендировали в 40 мкл фосфатного буфера.

Концентрацию экзосом в суспензии оценивали по одному из его основных маркеров – CD9. Содержание экзосом в очищенной суспензии составило 7×10^8 , эта концентрация обозначена как высокая (В). В свою очередь суспензию с низкой (Н) концентрацией экзосом получали разведением суспензии с высокой концентрацией в 10 раз фосфатным буфером. Указанные два разведения (В, Н) использовали для введения экспериментальным животным.

Животные

Работа проведена на мышах-самцах линии BALB/C ($n = 45$) в возрасте 2.5 мес. (на начало эксперимента), с массой тела 22–25 г, полученных из питомника НЦБМТ ФМБА России филиал «Столбовая». Манипуляции с животными проводили в соответствии с требованиями European Convention for the Protection of Vertebral Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes (CETS No. 170), Приказом МЗ РФ № 119Н от 1 апреля 2016 г. «Об утверждении Правил лабораторной практики», а также руководствуясь «Правилами работы с лабораторными грызунами и кроликами» (ГОСТ 33216-2014). Животных содержали в стандартных условиях вивария со свободным доступом к пище и воде, в режиме 12-часового чередования день/ночь. До начала эксперимента животные находились на 14-дневном карантине. Исследование одобрено этическим комитетом Научного центра неврологии.

Для процедуры введения суспензии экзосом мышей помещали на раму лабораторного стереотаксического прибора (Stoelting, США), затем через просверленные в их черепе отверстия, билатерально, в боковые желудочки мозга вводили по 2 мкл суспензии. Введение осуществляли в соответствии с координатами атласа мозга мышей [13]: AP – -0.22; L – 1.0; V – 2.3. Для анестезии использовали золетил-100 (Virbac Sante Animale, Франция) и ксилу (Interchemie Werken “de Adelaar BV”, Нидерланды). Стандартный раствор золетила-100 (500 мг в 5 мл) разводили фи-

зиологическим раствором в соотношении 1:4 и вводили внутримышечно из расчета 1.5 мг действующего вещества на 25 г веса мыши. Ксилу разводили физиологическим раствором в соотношении 1:2 и вводили внутримышечно из расчета 0.6 мг на 25 г веса мыши.

Все животные были разделены на пять групп (контрольную и экспериментальные, получившие указанные препараты в высокой и низкой дозах) по 9 особей в каждой.

Физиологическое исследование

Наблюдение за состоянием здоровья экспериментальных мышей осуществляли 2 раза в неделю, изменения двигательной активности тестировали 2 раза в месяц. Состояние здоровья животных оценивали по изменению веса, наличию порфириновых выделений из носа и глаз, состоянию шерстного покрова и т.д. Для оценки степени полученных двигательных и неврологических нарушений проводили тесты «открытое поле» (ОП) и «сужающаяся дорожка» (СД).

ОП представляло собой короб 40×40×20 см из поливинилхлорида (мастерские Института мозга Научного центра неврологии). Мышь помещали в центр и в течение 3 мин осуществляли регистрацию двигательной активности с помощью системы видеонаблюдения за животными Any-maze (Stoelting Inc., США).

Установка для изучения двигательных нарушений СД представляла собой две планки, наложенные друг на друга, длиной 100 см (Open Science, Россия). 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» располагается короб (укрытие), имеющий съемную крышку и отверстие в передней панели, через которое животное может проникнуть внутрь. Вся конструкция приподнята над полом на высоту 70 см. Экспериментальное животное должно пройти по верхней планке от начала дорожки до укрытия. Учитывали время прохождения и процент соскальзываний конечностей на нижнюю планку от общего числа шагов по СД.

Поведенческие тесты, результаты которых приведены в статье, проведены через 11 мес. после введения экзосом.

Морфологическое исследование

Для морфологического исследования были взяты образцы спинного мозга мышей из экспериментальной группы BAC111(В). Группу контроля составили четыре мыши из той же поставки, что и участвующие в эксперименте. Помимо этого, для сопоставления использовали препараты трансгенных мышей, моделирующих BAC, линии B6SJL-Tg (SOD1-G93A), полученные нами в предыдущем исследовании [3]. Мышей декапитировали, извлекали позвоночник

и под бинокулярным микроскопом выделяли спинной мозг. Люмбальные отделы спинного мозга фиксировали в 4% формалине. После фиксации образцы пропитывали 30% сахарозой, помещали в среду О.С.Т., после чего на криостате Sakura TissueTek готовили срезы толщиной 12 мкм. Для иммуногистохимического исследования использовали антитела к нейрональному белку PGP9.5 / UCHL1 (карбоксиконцевая убиквитингидролаза L1), к маркеру микроглии IBA1 (аллотрансплантатный воспалительный фактор-1 или адапторная молекула-1, связывающая ионизированный кальций), а также к белкам, участвующим в патогенезе БАС – SOD1 и TDP-43. Для тепловой демаскировки антигенов срезы нагревали в пароварке в течение 15 мин в буфере Трис-EDTA (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, США). Реакцию проводили в соответствии с рекомендациями производителя антител. Помимо этого, на свежемороженых срезах передней большеберцовой мышцы двух экспериментальных животных после введения экзосом и двух трансгенных мышей с SOD1-G93A-моделью БАС выявляли активность сукцинатдегидрогеназы (СДГ) по образованию формаза [14], используя классический гистохимический метод.

Препараты исследовали под микроскопом Nikon Eclipse Ni-u. Нейроны подсчитывали согласно описанному ранее [15] протоколу. Интенсивность иммунофлуоресценции при окрашивании на IBA1 оценивали с использованием программы NIS Elements. Оценку проводили не менее чем на 12 срезах с уровня L1-L5 на правой стороне спинного мозга от каждого животного и усредняли полученные данные.

Статистическая обработка данных

Полученные данные 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 статистической значимости различий между сравниваемыми группами по изучаемым показателям. Статистически значимыми считали различия при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Первые признаки двигательных нарушений у отдельных животных отмечены через 9 мес. после

введения экзосом. К 10–11-му мес. нарастало число мышей с признаками заболевания (рис. 1), причем в большей степени это касалось животных групп БАС111(В) и БАС110(В), то есть получавших большую дозу вводимого препарата. При осмотре наблюдалось поредение шерстного покрова, незначительные порфириновые выделения из глаз и носа, снижение массы тела (рис. 2Б).

Тестирование поведения таких животных выявило значительное снижение двигательной активности, увеличение времени и эпизодов неподвижности в ОП (рис. 2Г, Д), нарушение координации и увеличение времени выполнения теста СД (рис. 2Е), частичный парез задних конечностей. В тесте ОП показано уменьшение величины пройденного пути ($p = 0.0276$) и увеличение времени неподвижности в группе БАС111(В) ($p = 0.0466$) по сравнению с группой контроля. Также отмечено снижение пройденной дистанции ($p = 0.0035$) и увеличение времени неподвижности ($p = 0.0045$) в группе БАС111(В) по сравнению с группой БАС110(В). Тест СД (рис. 2Е) показал выраженные изменения в работе задних конечностей у мышей. Число соскальзываний задними лапами статистически значимо увеличивалось в группе БАС111(Н) ($p = 0.0101$) и БАС111(В) ($p = 0.0119$) по сравнению с контролем. Также отмечено уменьшение числа оступаний передними лапами в группе БАС111(В) по сравнению с группой БАС110(В) ($p = 0.04$). У мышей БАС110(Н) и БАС110(В) не выявлено нарушений работы передних и задних конечностей.

Наблюдавшиеся изменения внешнего вида, походки и локомоции мышей после введения экзосом отличаются от изменений, характерных для возрастной нормы, и сходны с признаками БАС на трансгенной модели данного заболевания B6SJL-Tg (SOD1-G93A) (см. рис. 2А–В).

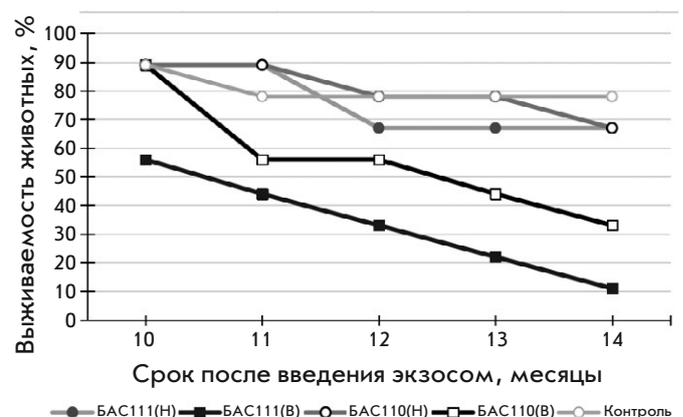


Рис. 1. Динамика выживаемости экспериментальных мышей в группах

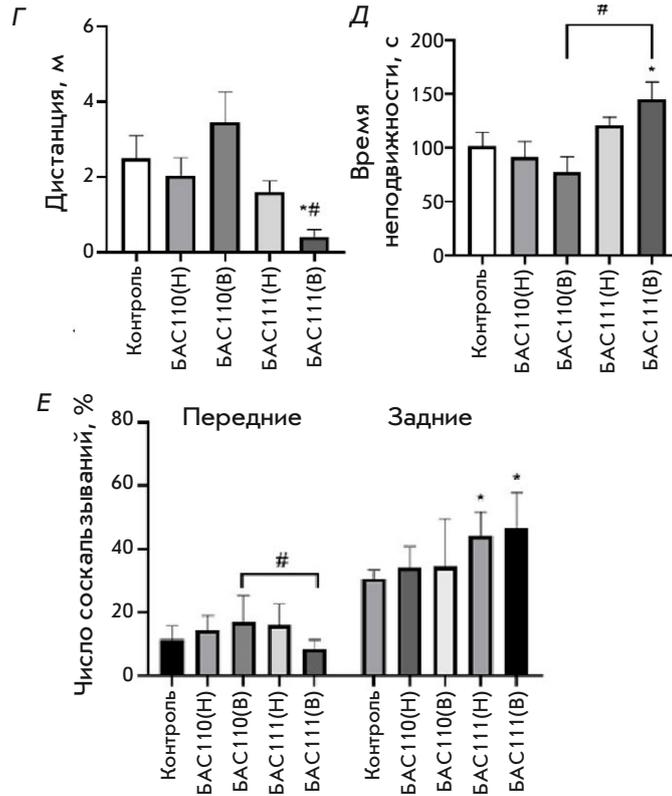
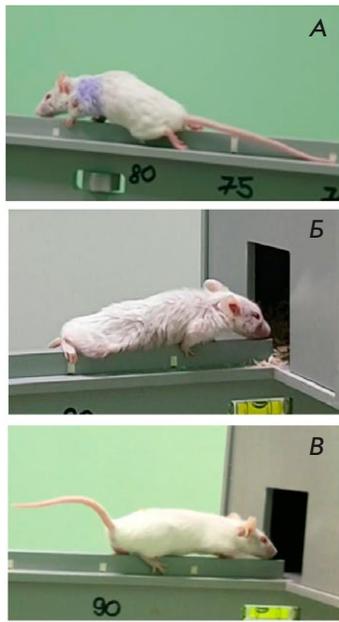


Рис. 2. Внешний вид мышей G93A (А) и мышей группы БАС111 (Б) после развития симптомов БАС. В – контрольное животное; пройденный путь (Г) и время неподвижности (Д) при тестировании в ОП; количество соскальзываний с верхней планки (в %) на СД (Е). * $p < 0.05$ по сравнению с группой «контроль». # $p < 0.05$ по сравнению с группой БАС110(В). Данные представлены в виде среднего \pm ошибка среднего

Животные с наиболее выраженными двигательными нарушениями (поджимание задних конечностей, нарушение походки, снижение двигательной активности) были взяты для гистологического исследования через 14 мес. после начала эксперимента. Проведение поведенческих тестов на этом сроке было невозможно в силу развившихся тяжелых неврологических нарушений.

Подсчет числа мотонейронов выявил значимое снижение их плотности в вентральных рогах спинного мозга после введения препарата БАС111 в высокой дозе по сравнению с контролем. Помимо этого, отмечено и значимое увеличение числа клеток микроглии и ее активацию в экспериментальной группе, а также статистически значимое увеличение интенсивности окрашивания на маркерный белок микроглии IBA1 (рис. 3А,Д).

Исследование белка TDP-43 в цитоплазме нейронов показало, что у контрольных мышей TDP-43 локализован преимущественно в ядрах. В экспериментальной группе в отдельных нейронах наблюдали нарушения локализации TDP-43 и его накопление в цитоплазме (рис. 3Б).

В контроле агрегированная форма белка SOD1 в спинальных мотонейронах не выявлялась. У экспериментальных мышей нами обнаружены единичные включения агрегированного белка SOD1 (рис. 3В), выраженной гибели нейронов при этом не наблюдали. Позитивным контролем служили

трансгенные мыши SOD1-G93A, в спинном мозге которых выявляли множественные агрегаты SOD1 и снижение числа мотонейронов.

Гистохимическая реакция на активность СДГ в скелетной мускулатуре животных выявила в экспериментальной группе тенденцию к повышению активности фермента. Этот процесс характерен для перестройки метаболической активности мышц при БАС (рис. 3Г), его наблюдали ранее также у мышей линии B6SJL-Tg (SOD1-G93A) [3].

ОБСУЖДЕНИЕ

Общей чертой нейродегенеративных заболеваний является прогрессирующая гибель нейронов (с избирательной уязвимостью определенного их подтипа при конкретных патологиях) и aberrantная агрегация ключевых белков [16]. При БАС патологический процесс начинается локально с гибели двигательных нейронов и распространяется предсказуемым образом по ЦНС вдоль определенных трактов, соответствующих нейроанатомическим связям [17]. В нашей работе показано, что уже через 9 мес. после интравентрикулярного введения экзосом, полученных из ЦСЖ пациентов с БАС, животные начинали приобретать характерный для данного заболевания двигательный фенотип – изменение локомоции с парезом задних конечностей, нарушением координации и увеличением времени и числа эпизодов неподвижности по данным физиологического исследования.

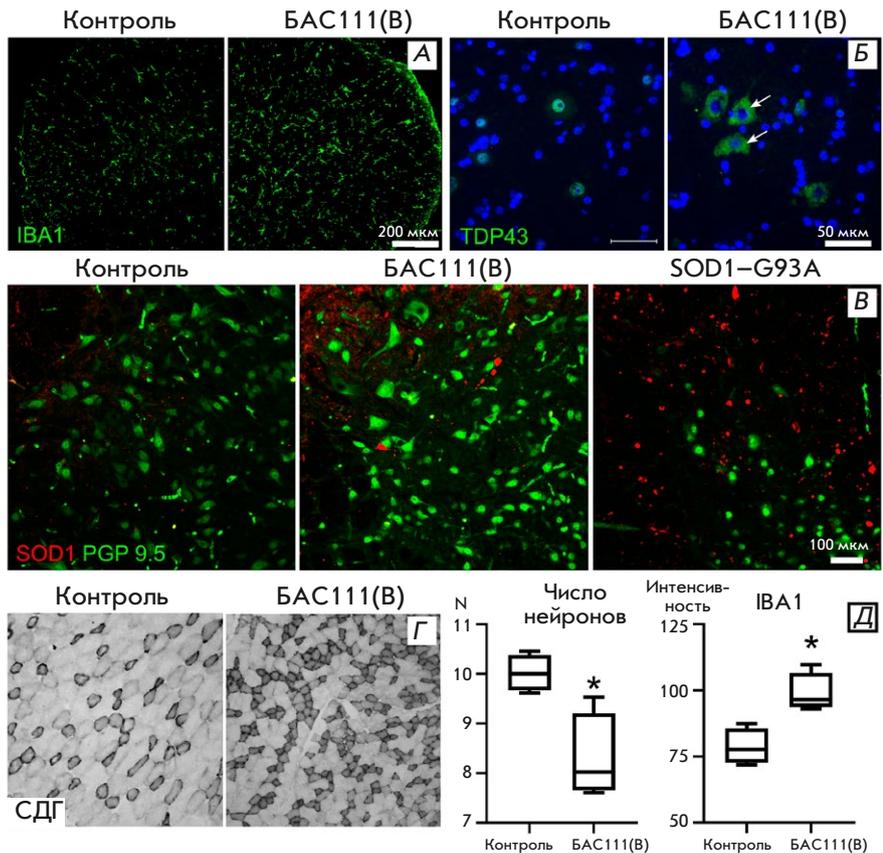


Рис. 3. Результаты морфологического исследования. **А** – активация микроглии. Окрашивание на маркерный белок микроглии IBA1. Вентральный рог спинного мозга, поясничный отдел. **Б** – выявление TDP-43 (зеленый цвет) в мотонейронах. Стрелками обозначено накопление TDP-43 в цитоплазме. Вентральный рог спинного мозга, поясничный отдел. **В** – накопление SOD1 у экспериментальных животных. Выявление SOD1 (красным), PGP9.5 (зеленым). Вентральный рог спинного мозга, поясничный отдел. **Г** – увеличение количества СДГ-позитивных волокон. Передняя большеберцовая мышца. **Д** – изменения мотонейронов и нейроглии. Снижение числа мотонейронов вентральных рогов спинного мозга (клеток в поле зрения), увеличение интенсивности окрашивания на маркерный белок микроглии IBA1. * $p < 0.05$, тест Манна–Уитни. Данные представлены в виде медианы и интерквартильного размаха

Указанный фенотип был сходен с фенотипом трансгенных животных, экспрессирующих мутацию G93A в гене *SOD1* [3]. Важно отметить, что на скорость развития двигательных симптомов влияла концентрация вводимой суспензии экзосом. Это согласуется с представлением о необходимом «инкубационном» периоде, когда белку с прионоподобным доменом (например, TDP-43 или SOD1) необходимо время для конверсии нормальных форм белка в патологические [16, 18], а в случае большей концентрации суспензии экзосом, «инициирующих» нейродегенеративный процесс, это время сокращается.

Одним из механизмов, наблюдаемых при различных нейродегенеративных заболеваниях, является секреция во внеклеточное пространство патологического белка – либо нативного, либо связанного с мембраной в составе внеклеточных везикул (экзосом), с последующим поглощением соседними клетками посредством рецептор-опосредованного эндоцитоза или пиноцитоза [18–20]. Другим механизмом является трансинаптическая передача путем anterograde и/или retrograde транспорта [21, 22].

Одна из главных патоморфологических особенностей БАС – наличие убиквитин-положительных цитоплазматических включений (стресс-гранул) в нейронах, содержащих агрегаты белка TDP-43, что показано на аутопсийном материале от паци-

ентов с БАС [23, 24]. Выявление каузальных мутаций в гене *TARDBP*, кодирующем белок TDP-43, подтвердило важность этого белка в патогенезе БАС [25] и лобно-височной деменции (ЛВД) [26]. Приблизительно в 97% всех случаев БАС и почти в половине случаев ЛВД отмечена агрегация TDP-43 в нейронах [27]. TDP-43 – это высококонсервативный ДНК/РНК-связывающий белок с многочисленными клеточными функциями, одна из которых связана с регуляцией транскрипции и альтернативного сплайсинга РНК [28]. Структурно TDP-43 содержит четыре домена: аминоконцевой домен, два мотива распознавания РНК и карбоксиконцевой домен, который и обладает прионоподобными свойствами [29]. В нормальных условиях TDP-43 находится преимущественно в ядре [30]. У пациентов с БАС белок приобретает патологическую конформацию и после трансинаптического захвата клеткой-реципиентом он взаимодействует с эндогенным TDP-43, провоцируя (подобно прионам) агрегацию собственного TDP-43 и тем самым распространяя патологию на другие структуры ЦНС [31, 32]. Показано, что ЦСЖ и ткань ЦНС от пациентов с БАС и ЛВД вызывают агрегацию TDP-43 и индуцируют распространение протеинопатии TDP-43 на клеточных культурах и *in vivo* [32–34]. В условиях патологии, например при БАС или ЛВД, отмечается нарушение клеточ-

ной локализации данного белка и увеличение уровня цитоплазматического TDP-43 с формированием его включений в цитоплазме и недостаточностью функциональной активности TDP-43 в ядре клетки [35]. В нашей работе для иммуногистохимического исследования использовали образцы спинного мозга мышей, имеющих наиболее выраженные двигательные нарушения (14 мес. после начала эксперимента), на которых показано нарушение локализации белка TDP-43 с его преимущественным накоплением в цитоплазме нейронов, что согласуется с данными других исследователей.

Опубликованы данные о межклеточном транспорте агрегатов TDP-43 посредством экзосом [36]. Экзосомная секреция патологических белков, таких, как β -амилоид, тау, прионный белок и α -синуклеин, показана и при других нейродегенеративных заболеваниях [16, 20]. Экзосомный транспорт TDP-43 имеет важное значение в патогенезе БАС, поскольку в биоптатах мозга [37] и ЦСЖ [33] пациентов с данным заболеванием обнаруживаются значительно более высокие уровни экзосомного TDP-43 по сравнению с контролем.

Помимо передачи между нейронами, также описано распространение патологических белков между нейронами и глией (астроцитами, микроглией и/или олигодендроцитами) [20]. Например, тау-белок может попадать в астроциты [38] и микроглию, которые играют ключевую роль в распространении патологического тау-белка посредством экзосомного транспорта [38, 39]. В нашем исследовании окрашивание образцов спинного мозга от экспериментальных животных на маркер микроглии IBA1 выявило увеличение числа клеток микроглии и ее активацию, что говорит о непосредственном участии врожденного иммунитета в молекулярных механизмах гибели мотонейронов. Воспалительный ответ, возникающий в условиях патологии, имеет определенные благоприятные эффекты, способствуя восстановлению целостности и гомеостаза тканей, однако хроническое нейровоспаление приводит к истощению регенеративного потенциала микроглии [40]. Активация микроглии осуществляется через инфламмосомы, которые представляют собой высокомолекулярный комплекс в цитозоле иммунных клеток, опосредующих активацию провоспалительных каспаз [41]. Важнейшим внутриклеточным фактором, на который реагируют инфламмосомы при БАС, является накопление в нейронах токсичных агрегатов TDP-43, SOD1 и других белков, вызывающих нейровоспаление [42]. Каскад активации инфламмосом инициирует высвобождение интерлейкина (IL)-1 β и IL-18 и вызывает пироптоз – запрограммированную гибель клеток, опосредуемую газдермином-D и притоком

ионов натрия и воды, что приводит к набуханию клеток с разрывом мембраны и выбросом содержимого цитозоля во внеклеточное пространство, что также способствует дальнейшему распространению патологических белков в клетках ЦНС [43].

В отличие от спорадических форм БАС, где основным компонентом внутриклеточных включений является TDP-43 [24], семейные формы с верифицированной мутацией в гене *SOD1* характеризуются преимущественным отложением мутантного белка SOD1 [44]. Важно отметить, что клеточные агрегаты белка SOD1 дикого типа обнаружены и при некоторых случаях других семейных форм БАС, а также в отдельных случаях спорадических форм, при которых мутации *SOD1* отсутствуют [45]. Это может объяснить найденные нами депозиты агрегированного белка SOD1 у экспериментальных животных без мутации в гене *SOD1*, причем их минимальное количество объясняет относительную сохранность мотонейронов. В то же время при оценке позитивного контроля (трансгенные мыши SOD1-G93A) мы обнаружили множественные агрегаты SOD1 и снижение числа мотонейронов, которые погибают в результате токсического воздействия белка SOD1 на клетку по механизму приобретения функции.

В последние годы предложено несколько инновационных методов лечения БАС с использованием экзосом и внеклеточных везикул [46], причем в большинстве своем они касались использования экзосом в качестве таргетного пути доставки различных нейротрофических факторов и микроРНК через гематоэнцефалический барьер с целью замедлить гибель мотонейронов. Учитывая, что в патогенезе БАС экзосомы предположительно опосредуют один из основных механизмов распространения патологического процесса в ЦНС, что показано и в настоящей экспериментальной работе, можно предположить возможность модуляции нейродегенеративного процесса посредством ингибирования экзосомного транспорта на разных его этапах. Одним из таких перспективных методов, направленных на замедление распространения нейродегенеративного процесса экзосомами, является иммунное блокирование слияния экзосом с мембраной мотонейронов посредством анти-CD63-антител и, вероятно, других основных маркеров экзосом [47]. Помимо такого воздействия на экзосомы, важным вопросом в ингибировании экзосомного пути распространения патологического процесса при БАС остается разработка препаратов, селективно блокирующих передачу белков с измененной конформацией и прионоподобными свойствами.

Таким образом, в проведенном нами исследовании показан инициирующий эффект экзосомных белков, полученных из ЦСЖ пациентов с БАС, в развитии

гибели мотонейронов у экспериментальных животных. Это подтверждает патогенетическую роль экзосом в распространении нейродегенеративного процесса при данном заболевании и открывает возможность определения новых мишеней для таргетной терапии БАС. ●

*Работа выполнена при поддержке гранта
Министерства высшего образования
и науки РФ на проведение крупных научных
проектов по приоритетным направлениям
научно-технологического развития
(проект № 075-15-2024-638).*

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Feldman E.L., Goutman S.A., Petri S., Mazzini L., Savelieff M.G., Shaw P.J., Sobue G. // *Lancet*. 2022. V. 400. № 10360. P. 1363–1380.
2. Hardiman O., Al-Chalabi A., Chio A., Corr E.M., Logroscino G., Robberecht W., Shaw P.J., Simmons Z., van den Berg L.H. // *Nat. Rev. Dis. Primers*. 2017. V. 5. P. 17071.
3. Ставровская А.В., Воронков Д.Н., Артемова Э.А., Белугин Б.В., Шмаров М.М., Ямщикова Н.Г., Гущина А.С., Ольшанский А.С., Народицкий Б.С., Иллариошкин С.Н. // *Нервно-мышечные болезни*. 2020. № 3. С. 63–73.
4. Иванова М.В., Чеканова Е.О., Белугин Б.В., Тутыхина И.Л., Должикова И.В., Закройщикова И.В., Васильев А.В., Захарова М.Н. // *Нейрохимия*. 2019. Т. 36. № 3. С. 195–207.
5. Иванова М.В., Чеканова Е.О., Белугин Б.В., Должикова И.В., Тутыхина И.Л., Захарова М.Н. // *Нейрохимия*. 2020. Т. 37. № 3. С. 271–279.
6. Gagliardi D., Bresolin N., Comi G.P., Corti S. // *Cell Mol. Life Sci*. 2021. V. 78. № 2. P. 561–572.
7. Cocucci E., Meldolesi J. // *Trends Cell Biol*. 2015. V. 25. P. 364–372.
8. Matsumoto J., Stewart T., Banks W.A., Zhang J. // *Curr. Pharm. Des*. 2017. V. 23. P. 6206–6214.
9. Kourembanas S. // *Annu. Rev. Physiol*. 2015. V. 77. P. 13–27.
10. Théry C., Amigorena S., Raposo G., Clayton A. // *Curr. Protoc. Cell Biol*. 2006. V. 30. P. 3.22.1–3.22.29.
11. Silverman J.M., Fernando S.M., Grad L.I., Hill A.F., Turner B.J., Yerbury J.J., Cashman N.R. // *Cell Mol. Neurobiol*. 2016. V. 36. P. 377–381.
12. Braak H., Brettschneider J., Ludolph A.C., Lee V.M., Trojanowski J.Q., Del Tredici K. // *Nat. Rev. Neurol*. 2013. V. 9. № 12. P. 708–714.
13. Paxinos G., Franklin K.B.J. *The mouse brain in stereotaxic coordinates*. San Diego etc.: Acad. Press, 2001.
14. Берстон М. *Гистохимия ферментов*. М.: Мир, 1965. 464 с.
15. Austin A., Beresford L., Price G., Cunningham T., Kalmar B., Yon M. // *Curr. Protocols*. 2022. V. 2. e428.
16. Peng C., Trojanowski J.Q., Lee V.M.-Y. // *Nat. Rev. Neurol*. 2020. V. 16. P. 199–212.
17. Ravits J.M., La Spada A.R. // *Neurology*. 2009. V. 73. P. 805–811.
18. Goedert M., Clavaguera F., Tolnay M. // *Trends Neurosci*. 2020. V. 33. P. 317–325.
19. Saman S., Kim W., Raya M., Visnick Y., Miro S., Saman S., Jackson B., McKee A.C., Alvarez V.E., Lee N.C.Y., Hall G.F. // *J. Biol. Chem*. 2012. V. 287. P. 3842–3849.
20. Uemura N., Uemura M.T., Luk K.C., Lee V.M.-Y., Trojanowski J.Q. // *Trends Mol. Med*. 2020. V. 26. № 10. P. 936–952.
21. Meziat C., Rey N., Brundin P., Raj A. // *Neurobiol. Dis*. 2020. V. 134. P. 104623.
22. Schaser A.J., Stackhouse T.L., Weston L.J., Kerstein P.C., Osterberg V.R., López C.S., Dickson D.W., Luk K.C., Meshul C.K., Woltjer R.L., et al. // *Acta Neuropathol. Commun*. 2020. V. 8. P. 150.
23. Arai T., Hasegawa M., Akiyama H., Ikeda K., Nonaka T., Mori H., Mann D., Tsuchiya K., Yoshida M., Hashizume Y., Oda T. // *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 2006. V. 351. P. 602–611.
24. Neumann M., Sampathu D.M., Kwong L.K., Truax A.C., Micsenyi M.C., Chou T.T., Bruce J., Schuck T., Grossman M., Clark C.M., et al. // *Science*. 2006. V. 314. № 5796. P. 130–133.
25. Sreedharan J., Blair I.P., Tripathi V.B., Hu X., Vance C., Rogelj B., Ackerley S., Durnall J.C., Williams K.L., Buratti E., et al. // *Science*. 2008. V. 319. № 5870. P. 1668–1672.
26. Borroni B., Bonvicini C., Alberici A., Buratti E., Agosti C., Archetti S., Papetti A., Stuani C., Di Luca M., Gennarelli M., Padovani A. // *Hum. Mutat*. 2009. V. 30. № 11. P. 974–983.
27. Tan R.H., Yang Y., Kim W.S., Dobson-Stone C., Kwok J.B., Kiernan M.C., Halliday G.M. // *Acta Neuropathol. Commun*. 2017. V. 5. № 1. P. 76.
28. Buratti E., Baralle F.E. // *J. Biol. Chem*. 2001. V. 276. P. 36337–36343.
29. Cohen T.J., Lee V.M.Y., Trojanowski J.Q. // *Trends Mol. Med*. 2011. V. 17. № 11. P. 659–667.
30. Ayala Y.M., Zago P., D'Ambrogio A., Xu Y.-F., Petrucelli L., Buratti E., Baralle F.E. // *J. Cell Sci*. 2008. V. 121. P. 3778–3785.
31. Smethurst P., Newcombe J., Troakes C., Simone R., Chen Y.-R., Patani R., Sidle K. // *Neurobiol. Dis*. 2016. V. 96. P. 236–247.
32. Tamaki Y., Ross J.P., Alipour P., Castonguay C.-É., Li B., Catoire H., Rochefort D., Urushitani M., Takahashi R., Sonnen J.A., et al. // *PLoS Genet*. 2023. V. 19. № 2. e1010606.
33. Ding X., Ma M., Teng J., Teng R.K.F., Zhou S., Yin J., Fonkem E., Huang J.H., Wu E., Wang X. // *Oncotarget*. 2015. V. 6. № 27. P. 24178–24191.
34. Nonaka T., Masuda-Suzukake M., Arai T., Hasegawa Y., Akatsu H., Obi T., Yoshida M., Murayama S., Mann D.M.A., Akiyama H., Hasegawa M. // *Cell Rep*. 2013. V. 4. № 1. P. 124–134.
35. Gambino C.M., Ciaccio A.M., Lo Sasso B., Giglio R.V., Vidali M., Agnello L., Ciaccio M. // *Diagnostics*. 2023. V. 13. P. 416.
36. Doyle L.M., Wang M.Z. // *Cells*. 2019. V. 8. № 7. P. 727.
37. Iguchi Y., Eid L., Parent M., Soucy G., Bareil C., Riku Y., Kawai K., Takagi S., Yoshida M., Katsuno M., et al. // *Brain*. 2016. V. 139. P. 3187–3201.
38. Perea J.R., López E., Carlos Díez-Ballesteros J., Ávila J., Hernández F., Bolós M. // *Front. Neurosci*. 2019. V. 13. P. 442.
39. Asai H., Ikezu S., Tsunoda S., Medalla M., Luebke J., Haydar T., Wolozin B., Butovsky O., Kügler S., Ikezu T. // *Nat. Neurosci*. 2015. P. 18. № 11. C. 1584–1593.
40. Kempuraj D., Thangavel R., Natteru P.A., Selvakumar G.P., Saeed D., Zahoor H., Zaheer S., Iyer S.S., Zaheer A. // *J. Neurol. Neurosurg. Spine*. 2016. V. 1. № 1. P. 1003.
41. Martinon F., Burns K., Tschopp J. // *Mol. Cell*. 2002. V. 10. № 2. P. 417–426.
42. Komine O., Yamanaka K. // *Nagoya J. Med. Sci*. 2015. V. 77. № 4. P. 537–549.
43. Lieberman J., Wu H., Kagan J.P. // *Sci. Immunol*. 2019. V. 4. № 39. eaav144.
44. Valentine J.S., Doucette P.A., Zittin Potter S. // *Annu. Rev. Biochem*. 2005. V. 74. P. 563–593.
45. Rotunno M.S., Bosco D.A. // *Front. Cell. Neurosci*. 2013. V. 7. P. 253.
46. Bobis-Wozowicz S., Marbán E. // *Front. Cell. Dev. Biol*. 2022. V. 10. P. 919426.
47. Afonso G.J.M., Cavaleiro C., Valero J., Mota S.I., Ferreira E. // *Cells*. 2023. V. 12. P. 1763.