

ХАБИБРАХМАНОВ АЙДАР НАЗИМОВИЧ

**КЛИНИКО-МОЛЕКУЛЯРНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ДИСФУНКЦИИ
НЕРВНО-МЫШЕЧНЫХ СИНАПСОВ И АКТИВНОСТИ
АЦЕТИЛХОЛИНЭСТЕРАЗЫ ПРИ БОКОВОМ АМИОТРОФИЧЕСКОМ
СКЛЕРОЗЕ У ЧЕЛОВЕКА И В МОДЕЛИ НА ЖИВОТНЫХ**

3.1.24 – Неврология

1.5.5 – Физиология человека и животных

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Казань – 2024

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Казанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научные руководители:

доктор медицинских наук, профессор Богданов Энвер Ибрагимович;
доктор медицинских наук, доцент Мухамедьяров Марат Александрович.

Официальные оппоненты:

Кутлубаев Мансур Амирович - доктор медицинских наук, доцент, заведующий кафедрой неврологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Башкирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Маслюков Петр Михайлович - доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой нормальной физиологии с биофизикой Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Ярославский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научный центр неврологии» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации.

Защита состоится «17» сентября 2024 года в 09.00 часов на заседании объединенного диссертационного совета 99.2.058.02 при ФГБОУ ВО Казанский ГМУ Минздрава России и ФГБОУ ВО «ПИМУ» Минздрава России по адресу: 420012, г. Казань, ул. Бутлерова, 49.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке ФГБОУ ВО Казанский ГМУ Минздрава России (420012, г. Казань, ул. Бутлерова, д. 49 Б) и на сайте организации (<https://kazangmu.ru>).

Автореферат разослан « ____ » _____ 2024 года.

Ученый секретарь
диссертационного совета
канд. мед. наук, доцент

Лапшина Светлана Анатольевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Боковой амиотрофический склероз (БАС) представляет собой прогрессирующее нейродегенеративное заболевание, характеризующееся гибелью мотонейронов головного и спинного мозга, проявляющееся в виде мышечной слабости и амиотрофий (Хондкариан О.А., 1977; Абабков В.А. и др., 2018). Для БАС характерна высокая степень variability клинических характеристик (Ковражкина Е.А. и др., 2017), а фенотипическое разнообразие делает БАС исключительно трудным для ранней диагностики заболеванием (Singh N. et al., 2019). Как следствие, поздняя диагностика БАС препятствует не только своевременному началу терапии, но и эффективному поиску возможных методов лечения (Anderse P.M. et al., 2012). Изучение специфичных биомаркеров может помочь в решении данных проблем.

Одним из таких биомаркеров может выступать ацетилхолинэстераза (АХЭ) (Campanari M.L. et al., 2016). При денервации отмечается снижение экспрессии АХЭ в мышце, а также усиливается высвобождение АХЭ из нервно-мышечного синапса (НМС) (Fernandez H.L. et al., 1986; Decker M.M., Bermann H.A., 1990). При этом считается, что поражение НМС является самостоятельным и ранним событием в патогенезе БАС (Мухамедьяров М.А. и др., 2015; Alhindi A. et al., 2021; Ding Q. et al., 2022; Verma S. et al., 2022). Таким образом, имеются теоретические и экспериментальные предпосылки считать АХЭ плазмы крови возможным маркером БАС, отражающим денервацию НМС скелетных мышц.

Степень разработанности темы исследования

Высвобождение АХЭ из НМС в результате денервации считается возможным механизмом повышения активности АХЭ в плазме крови при БАС (Cater J.L., Brimijoin S., 1981; Decker M.M., Bermann H.A., 1990). Ранее было показано, что у пациентов с БАС может отмечаться повышение активности АХЭ в плазме крови (Festoff B.W., Fernandez H.L., 1981; Rasool C.G. et al., 1983; Niebroj-Dobosz I. et al., 1989). Однако, данные работы имеют некоторые ограничения: отсутствие использования диагностических критериев БАС, а

также некоторые статистические ограничения (использование t-критерия Стьюдента без определения нормальности распределения данных). Также несмотря на то, что установлена важная роль НМС в патогенезе БАС, молекулярные механизмы развития дисфункции НМС до конца не изучены (Verma S. et al., 2022). Таким образом, актуальным является оценка диагностической ценности исследования АХЭ плазмы крови с комплексным изучением экспрессии ряда синаптических белков в НМС при БАС. АХЭ может быть обнаружена в слюне, подобные исследования ранее были проведены у пациентов с болезнями Альцгеймера и Паркинсона (Sayer R. et al., 2004; Fedorova T. et al., 2015). Однако при БАС подобных исследований не проводилось.

Цель исследования

Изучить клинико-молекулярные характеристики НМС и активность АХЭ у человека с БАС и в моделях заболевания для оптимизации диагностических критериев клинических вариантов БАС.

Задачи исследования

1. Исследовать активность АХЭ слюны у пациентов с БАС и оценить ее корреляцию с клиническими характеристиками заболевания.
2. Провести измерение активности АХЭ плазмы крови пациентов с БАС и оценить ее корреляцию с клиническими характеристиками заболевания.
3. Провести измерение активности АХЭ плазмы крови в трансгенной модели БАС на досимптомной и симптомной стадии заболевания.
4. Изучить экспрессию синаптических белков, участвующих в механизмах секреции (синаптофизин, SNAP-25, синапсин I), рецепции (н-холинорецепторы), гидролиза (ацетилхолинэстераза) ацетилхолина в НМС в mSOD1- и FUS-трансгенных моделях БАС на досимптомной и симптомной стадии заболевания.

Научная новизна

Впервые было проведено измерение активности АХЭ слюны у пациентов с БАС. Установлено, что у пациентов с бульбарной формой БАС отмечается

достоверное повышение активности АХЭ слюны в сравнении с пациентами со спинальной формой БАС и здоровыми лицами.

Установлено, что, несмотря на теоретические и экспериментальные предпосылки, исследование активности АХЭ плазмы крови не обладает доказанной диагностической ценностью в верификации БАС.

Впервые в ходе комплексного исследования экспрессии синаптических белков в двух трансгенных моделях было показано, что развитие патологии на уровне НМС носит гетерогенный характер. В трансгенных моделях по мере развития признаков патологии отмечается усиление экспрессии АХЭ в НМС, что вносит вклад в патогенез заболевания.

Теоретическая и практическая значимость работы

Установленный факт достоверного повышения активности АХЭ слюны у пациентов с бульбарной формой БАС позволяет предложить измерение активности АХЭ слюны в качестве дополнительного метода подтверждения диагноза БАС у пациентов с изолированными бульбарными нарушениями, а также для дифференциальной диагностики с другими заболеваниями, со схожими проявлениями в дебюте. Также, измерение активности АХЭ слюны может быть использовано в клинических и фундаментальных исследованиях в качестве маркера стволовой дисфункции при БАС и, соответственно, для стратификации пациентов, а также оценки течения заболевания и/или эффективности терапии.

Учитывая, что развитие дисфункции НМС при БАС принято считать одним из первичных и ранних механизмов развития заболевания, установленный гетерогенный характер молекулярных изменений на уровне НМС следует учитывать при разработке патогенетической терапии БАС, направленной на стабилизацию НМС. Синаптические белки, подверженные наиболее значимым изменениям на досимптомной стадии (синапсин I и SNAP-25) могут рассматриваться в качестве потенциальных мишеней при разработке генно-клеточных подходов к терапии и профилактике болезни.

Данные об экспрессии синаптических белков объясняют электрофизиологические данные о нарушении синаптической передачи при БАС, наблюдаемые у некоторых пациентов и в трансгенных моделях заболевания.

Полученные данные об активности АХЭ слюны в двух клинически разных подгруппах БАС, а также данные об экспрессии синаптических белков в двух трансгенных моделях дополняют представления о гетерогенности БАС.

Методология и методы исследования

В работе использовался клинический метод обследования пациентов с применением современных диагностических критериев, шкал функционального дефицита и стадирования БАС. Активность АХЭ измерялась спектрофотометрическим методом Элмана. Экспрессия синаптических белков оценивалась иммунофлуоресцентным методом с использованием конфокальной микроскопии.

Положения, выносимые на защиту

1. У пациентов с бульбарной формой БАС отмечается достоверное повышение активности АХЭ в слюне в сравнении с пациентами со спинальной формой БАС и здоровыми лицами, что делает данный метод приемлемым для использования в диагностических и прогностических целях.

2. У пациентов с БАС активность АХЭ плазмы крови достоверно не отличается от таковой у контрольных групп пациентов, таким образом измерение активности АХЭ плазмы не имеет подтвержденной диагностической значимости.

3. У трансгенных мышей с моделью БАС по мере развития признаков патологии отмечается достоверное повышение экспрессии АХЭ в НМС при отсутствии значимых изменений активности АХЭ в плазме крови.

4. В mSOD1- и FUS-трансгенных моделях БАС на досимптомной стадии патологии наблюдаются разнонаправленные достоверные изменения экспрессии пресинаптических белков НМС – снижение экспрессии SNAP-25 и

синапсина I у mSOD1-мышей и повышение экспрессии указанных белков у FUS-мышей в сравнении с мышами дикого типа. На симптомной стадии патологии наблюдаются однонаправленные изменения экспрессии пресинаптических белков НМС – снижение экспрессии SNAP-25, синапсина I и синаптофизина в обеих моделях.

Степень достоверности и апробация результатов работы

Достоверность выполненной работы определяется протоколом исследования, размером выборок, критериями включения пациентов в исследование. Методы, которые были использованы в эксперименте, технические варианты их разрешения, а также методы статистического анализа можно считать современными, соответствующими мировому уровню и поставленным задачам. Диссертационная работа была одобрена локальным этическим комитетом ФГБОУ ВО Казанский ГМУ Минздрава России (протокол № 5 от 28.05.2019 и протокол №3 от 23.03.2021 г.).

Материалы диссертации были публично представлены на Международной конференции «Актуальные проблемы нейробиологии» (Казань, 2019 г.), IV Всероссийской научной конференции молодых ученых «Будущее неврологии» (Казань, 2020 г.), V Всероссийской (с международным участием) научной конференции молодых ученых «Будущее нейронаук» (Казань, 2022 г.), VI и VII Международном молодежном научном медицинском форуме «Белые цветы» (Казань, 2019 и 2020 гг.), VI Поволжском неврологическом форуме «Достижения клинической неврологии» (Казань, 2022 г.), 1-м виртуальном конгрессе Европейской Академии Неврологии (European Academy of Neurology 1st Virtual Congress, 2020 г.), 9-м конгрессе Европейской Академии Неврологии (9th Congress of the European Academy of Neurology 2023 г., Будапешт, Венгрия).

Публикации

По теме диссертационного исследования опубликовано 16 научных работ, из них 7 статей в журналах, рекомендованных Высшей аттестационной

комиссией при Министерстве науки и высшего образования Российской Федерации.

Личный вклад автора

Автором разработан протокол исследования, определены цель и задачи данной работы, обоснованы выводы и практические рекомендации по результатам исследования, написан текст диссертации и автореферата. Все эксперименты с трансгенными мышами персонально выполнены автором. Самостоятельно сформированы группы исследованных пациентов, выполнен сбор анамнеза, неврологический осмотр, сбор образцов крови и слюны пациентов, заполнены клинические шкалы. Автором выполнен статистический анализ всех полученных данных. Были подготовлены публикации, публично представлены результаты научно-исследовательской работы на научных конференциях.

Внедрение результатов исследования в практику

Результаты исследования внедрены в учебный процесс кафедры неврологии и кафедры нормальной физиологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Казанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, а также используются в клинической практике ГАУЗ «РКБ МЗ РТ».

Объем и структура диссертационной работы

Диссертация изложена на 164 листах машинописного текста, содержит 12 таблиц и иллюстрирована 15 рисунками. Диссертация содержит следующие разделы: введение, обзор литературы, материалы, методология и методы исследования, результаты исследования, обсуждение результатов, заключение, выводы, практические рекомендации, перспективы дальнейшей разработки темы, благодарности, список сокращений и условных обозначений, список литературы, список иллюстративного материала, приложения. Библиографический указатель содержит 23 отечественных и 320 зарубежных источников литературы.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы

Исследования проводились на базе кафедры неврологии, кафедры нормальной физиологии и Института нейронаук ФГБОУ ВО Казанский ГМУ Минздрава России.

Объектом исследования настоящей работы были пациенты с диагностированным БАС (Brooks V.R. et al., 2000; de Carvalho M. et al., 2008). Набор пациентов осуществлялся в ГАУЗ «РКБ МЗ РТ» в период с февраля 2021 года по март 2022 года. Всего в исследовании принял участие 41 субъект. Из участников исследования была сформирована исследуемая группа, включавшая 17 пациентов с подтвержденным БАС без другой сопутствующей неврологической патологии. Группа неврологического контроля включала 9 пациентов, у которых в ходе обследования были диагностированы альтернативные заболевания, имитирующие БАС: спондилогенная шейная миелопатия, сирингомиелия, атипичная хроническая воспалительная демиелинизирующая полинейропатия, спиноцеребеллярная дегенерация с сенсорно-моторной полинейропатией. Группа здорового контроля включала 15 добровольцев без органического поражения нервной системы.

Обследование пациентов с БАС включало неврологический осмотр, электрофизиологическое исследование методом игольчатой электромиографии (ЭМГ), магнитно-резонансной томографии (МРТ) головного и спинного мозга для исключения заболеваний центральной нервной системы, имитирующих БАС. Тяжесть заболевания определялась с помощью пересмотренной Шкалы нарушений функций при БАС ALSFRS-R (Cedarbaum J.M. et al., 1999), а стадия заболевания – с помощью шкалы Королевского колледжа Лондона (King's staging system, далее по тексту King's) (Roche J.C. et al., 2012). У всех участников исследования производился забор венозной крови и слюны (методом «сплевывания»). Активности АХЭ в образцах измерялась с помощью метода Элмана (для плазмы крови) и модернизированного метода Элмана (для слюны) (Ellman G.L. et al., 1961; Triphom S. et al., 2013). Активность АХЭ определялась

как количество ацетилтиохолина, гидролизованного за 1 мин ферментом АХЭ в 1 мл образца плазмы крови, нормированное на концентрацию белка (U/мг белка). Все участники подписали информированное добровольное согласие.

В качестве моделей БАС использовались mSOD1(G93A)- и FUS¹⁻³⁵⁹-трансгенные мыши (mSOD1- и FUS-мыши), экспрессирующие человеческие мутантные гены SOD1 и FUS, приводящие к развитию БАС у человека (Rosen D.R. et al., 1993; Kwiatkowski T.J. et al., 2009). Данные трансгенные модели воспроизводят ключевые патогенетические механизмы БАС у человека (Bonifacino T. et al., 2021). Всего было использовано 129 мышей: 20 трансгенных mSOD1-мышей и 20 мышей дикого типа соответствующего генотипа и возраста; 44 трансгенных FUS-мыши и 45 мышей дикого типа соответствующего генотипа и возраста. В каждой трансгенной модели было сформировано две группы – мыши на досимптомной стадии (без каких-либо признаков болезни) и мыши на симптомной стадии (мыши с парезом задних конечностей). В качестве контроля использовались мыши дикого типа той же генетической основы соответствующего возраста. Исследование на мышях включало в себя оценку экспрессии синаптических белков синаптофизина, синапсина I, SNAP-25, АХЭ и н-холинорецепторов в НМС диафрагмальной мышцы иммунофлуоресцентным методом. Применялись первичные и вторичные антитела к пресинаптическим белкам, альфа-бунгаротоксин (связывается с н-холинорецепторами) и фасцикулин-2 (связывается с АХЭ). Визуализация НМС проводилась при помощи конфокального микроскопа Leica TCS SP5 MP (Leica, Germany). Изображения фиксировались при помощи программы LAS (Leica Application Suite). Полученные изображения анализировались в программе ImageJ Fiji (Schindelin J. et al., 2019), в которой производился расчет интенсивности и площади светимости, а также ко-локализация пре- и постсинаптической мембраны с помощью плагина JACoP (Manders E.M.M. et al., 1993). В FUS-трансгенной модели было проведено измерение активности АХЭ плазмы крови при помощи метода Элмана (Ellman G.L. et al., 1961). Кровь была получена путем пункции левого желудочка.

Статистическая обработка результатов

Статистическая обработка результатов исследований проводилась с применением программы «OriginPro 8» (OriginLab Corporation). С помощью критерия Шапиро-Уилка проверялась нормальность распределения количественных значений. Полученные данные экспрессии синаптических белков, а также активности АХЭ не подчинялись нормальному распределению. Значимость различий между независимыми выборками оценивалась с помощью непараметрических U-критерия Манна-Уитни и H-критерия Краскела-Уоллиса. Клинико-демографические данные участников исследования и данные активности АХЭ представлены в виде медианы, 1-го и 3-го квартилей (Me [Q1; Q3]). Корреляционная связь рассчитывалась с помощью коэффициента Спирмена. Различия считались статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение

Проведено клинико-неврологическое исследование пациентов с БАС (Таблица 1).

Таблица 1 – Клиническая характеристика пациентов с БАС

Клинические данные	Значения
Клинические формы (по Хондкариан), n (%)	
Бульбарная форма БАС	- 6 (35,3)
Спинальная форма БАС (шейно-грудная и пояснично-крестцовая формы)	- 11 (64,7)
Вариант БАС, n (%)	
Классическая вариант БАС	- 12 (70,6)
Преимущественное поражение ВМН/ПБС	- 2 (11,8)
Преимущественное поражение НМН/ПМА	- 3 (17,6)
Возраст, г. Me [Q1; Q3]	65 [61; 66]
Мужчины, n (%)	6 (35,3)
Длительность болезни от первых симптомов, мес. Me [Q1; Q3]	10 мес. [6; 18]

Продолжение Таблицы 1

Клинические данные	Значения
ALSFRS-R, Me [Q1; Q3]	40 [34; 43]
Темп прогрессирования БАС балл/мес. Me [Q1; Q3]	0,83 [0,45; 1,22]
Стадия БАС по King's, n (%)	
1	4 (23,5)
2В	6 (35,3)
3	7 (41,2)

Примечание. ВМН – верхний мотонейрон. НМН – нижний мотонейрон. ПБС – первичный боковой склероз. ПМА – прогрессирующая мышечная атрофия.

У трети пациентов заболевание дебютировало с бульбарных симптомов. Большинство пациентов имело классический вариант БАС с клиническими признаками поражения верхнего и нижнего мотонейрона (ВМН и НМН соответственно) на разных уровнях цереброспинальной оси. Почти половина пациентов была включена в исследование на 3 стадии БАС по King's. У пациентов отмечался разный паттерн распространения симптомов во времени и комбинации признаков поражения ВМН и НМН (Рисунок 1).

Выраженность проявлений НМН варьировала от признаков переднерогового поражения исключительно по данным игольчатой ЭМГ до выраженных амиотрофий, гипотонии и арефлексии. Выраженность ВМН варьировала от оживления сухожильных рефлексов с появлением патологических рефлексов до выраженной спастичности и клонуса стоп, грубого псевдобульбарного синдрома.

Ни один пациент с БАС на момент включения в исследование не получал лечение рилузолем или эдаравоном, а также не принимал лекарства, влияющие на саливацию. Всем пациентам с БАС была выполнена МРТ головного мозга и спинного мозга для исключения заболеваний, имитирующих БАС.

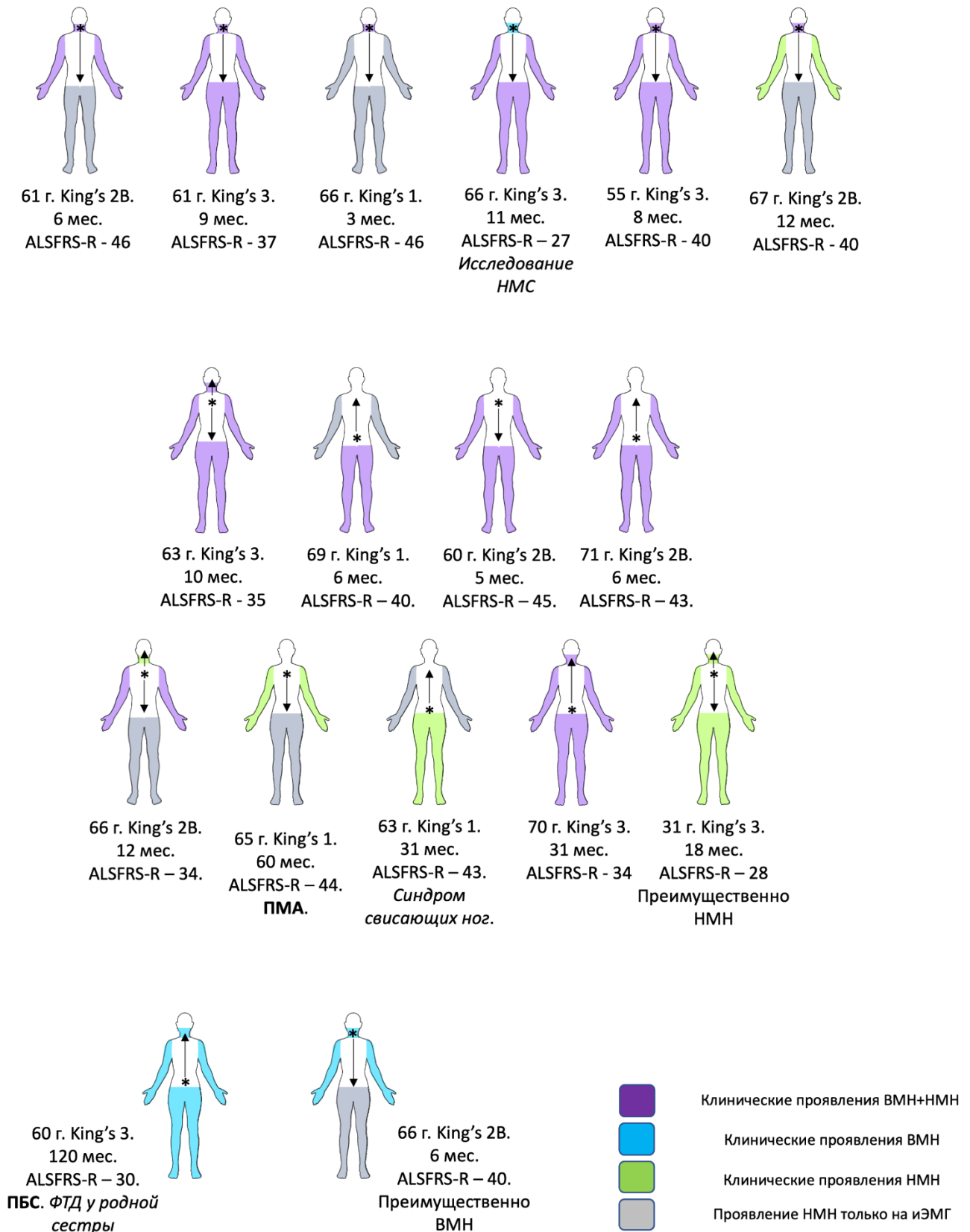


Рисунок 1 – Фенотипическая вариабельность пациентов с БАС. Отмечены возраст пациентов, стадия по King's, длительность болезни, тяжесть заболевания по ALSFRS-R. * - уровень дебюта заболевания. Верхний ряд – пациенты с

бульбарной формой БАС, средний ряд – пациенты со спинальной формой БАС, нижний ряд – отдельно выделены пациенты с преимущественным поражением ВМН. ВМН – верхний мотонейрон, НМН – нижний мотонейрон, ПМА – прогрессирующая мышечная атрофия, ПБС – первичный боковой склероз, ФТД – фронто-темпоральная дегенерация.

У двух пациентов с классическим вариантом БАС было выявлено расширение центрального канала спинного мозга. Клинически у данных пациентов выявлялись признаки поражения ВМН и НМН. Признаки НМН включали выраженные амиотрофии и фасцикуляции. У пациентов не было выявлено каких-либо проводниковых нарушений на уровне расширения канала и ниже, а также сегментарных нарушений на этом уровне (за исключением признаков поражения НМН, характерные для БАС). При этом признаки НМН выходили за границы сегментов с расширенным центральным каналом. Таким образом расширение центрального канала может быть расценено как радиологический феномен – признак атрофии спинного мозга вследствие дегенерации мотонейронов передних рогов.

Впервые с момента внедрения современных диагностических критериев (критерии El-Escorial revisited) было проведено измерение активности АХЭ плазмы крови и слюны у пациентов с БАС (Таблица 2).

Таблица 2 – Активность АХЭ в плазме крови и слюне в группе БАС и контролях

Группа	Активность АХЭ в плазме крови, U/мг белка плазмы	Активность АХЭ в слюне, U/мг белка слюны
Группа БАС	0,589 [0,284; 0,807]	0,0306 [0,013; 0,077]*
Здоровый контроль	0,607 [0,264; 0,96]	0,0022 [0,0008; 0,071]
Неврологический контроль	0,706 [0,28; 0,767]	0,047 [0,0265; 0,0694]

Примечание. * - $p < 0,05$ при сравнении группы БАС со здоровым контролем

При исследовании активности АХЭ плазмы крови достоверных различий между группой БАС и группами контроля выявлено не было. Корреляционной связи между значениями активности АХЭ плазмы и клиническими показателями заболевания, такими как стадия, скорость прогрессирования, длительность и тяжесть заболевания, также выявлено не было.

При исследовании активности АХЭ в слюне у пациентов с БАС отмечалось достоверное повышение активности фермента в сравнении со здоровыми лицами ($p=0,0305$). Различия между группой БАС и группой неврологического контроля, а также между группами контроля были статистически незначимыми. Значимой корреляционной связи между значениями активности АХЭ слюны у пациентов с БАС и клиническими параметрами заболевания также выявлено не было.

Далее из группы пациентов с БАС была сформирована подгруппа пациентов с бульбарной формой (6 пациентов) и подгруппа со спинальной формой (9 пациентов), куда вошли пациенты с шейно-грудной и пояснично-крестцовой формами БАС. При таком подходе было установлено, что у пациентов с бульбарной формой БАС медиана активности АХЭ в слюне составила 0,073 [0,042; 0,253] U/мг белка слюны и оказалась достоверно выше, чем у пациентов со спинальной формой БАС (0,0171 [0,0114; 0,0297], $p=0,022$) и здоровыми лицами ($p=0,035$) (Рисунок 2). У пациентов с бульбарной формой БАС активность АХЭ также была выше, чем у группы неврологического контроля, однако не было достигнуто статистической значимости.

Полученные данные раскрывают перспективы исследования активности АХЭ слюны в ранней диагностике БАС у пациентов с бульбарным синдромом в дебюте. Однако, возможные механизмы повышения активности АХЭ в слюне в литературе точно не описаны. Возможной причиной повышения активности АХЭ слюны в данном случае может быть распространение дегенеративного процесса на автономные структуры ствола мозга, что согласуется с результатами предыдущих работ (Charchafli R.J. et al., 1974; Giess R. et al., 2002; Merico A., Cavinato M., 2011).

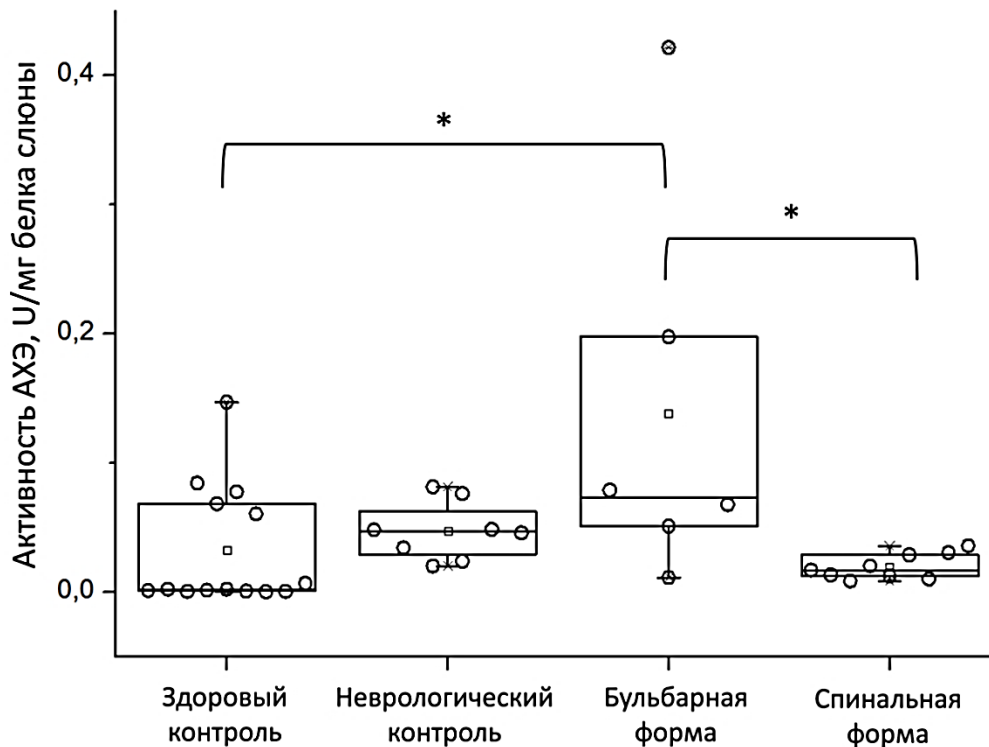


Рисунок 2 – Активность АХЭ слюны в зависимости от формы БАС. * - $p < 0,05$

Проведено измерение активности АХЭ плазмы крови у FUS-трансгенных мышей с моделью БАС, у которых в сравнении с мышами дикого типа не было выявлено достоверных различий, независимо от стадии заболевания (Рисунок 3). Вероятно, это связано с тем, что усиленное высвобождение фермента из синаптической щели может нивелироваться общим снижением экспрессии АХЭ в НМС (Inestrosa N.C. et al., 1977; Cater J.L., Virmijoin S. 1981).

Также удалось провести исследование иммунофлуоресценции синаптических белков НМС у одного пациента (женщина, 66 лет, БАС бульбарная форма, 3 стадия) (Рисунок 4). Было получено добровольное информированное согласие на биопсию локтевой мышцы малоинвазивным и безопасным способом (Maselli R.A. et al., 1993). У пациента отмечалась слабая флуоресценция синапсина и еще более слабая флуоресценция SNAP-25. Также отмечена фрагментация, не характерная для здорового НМС человека (Slater C.R., 2017).

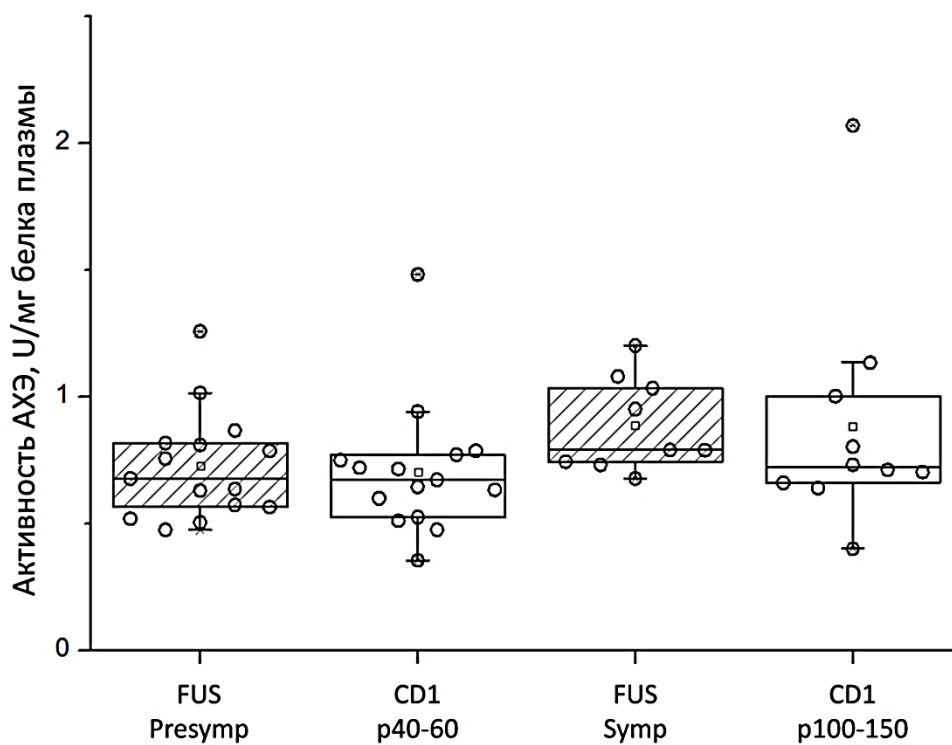


Рисунок 3 – Активность АХЭ плазмы крови трансгенных FUS-мышей и их контроля

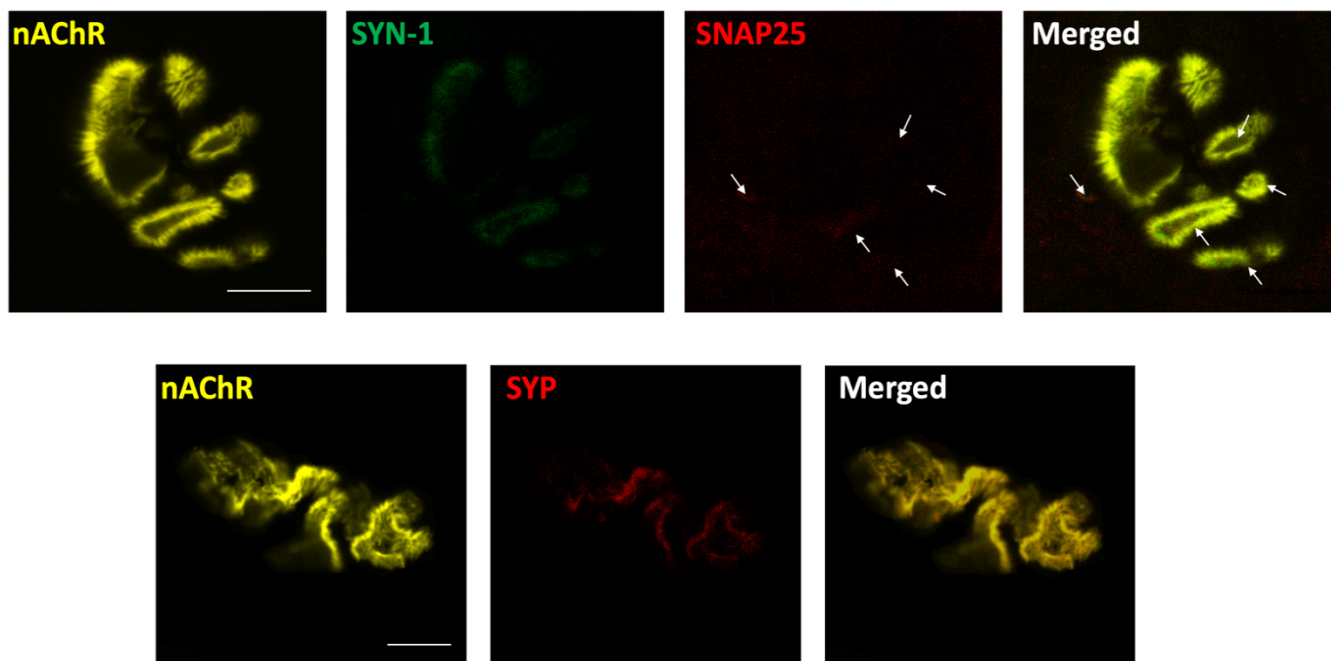


Рисунок 4 – НМС пациента с БАС. nAChR – н-холинорецепторы, SYN-1 – синапсин I, SYP – синаптофизин, Merged – объединенное изображение.

Стрелками указаны области экспрессии SNAP-25. Отмечается фрагментация НМС. Слабый уровень сигнала из каналов SYN-1, SYP, почти полное отсутствие сигнала в канале SNAP25. Шкала – 10 мкм.

Была исследована экспрессия синаптических белков АХЭ, синаптофизина, синапсина I, SNAP-25 и н-холинорецепторов в НМС диафрагмы в mSOD1- и FUS-трансгенных моделях БАС на разных стадиях развития болезни. В двух трансгенных моделях было установлено, что экспрессия АХЭ в НМС отличается друг от друга. В трансгенной mSOD1-модели на досимптомной и симптомной стадии площадь и интенсивность экспрессии АХЭ была достоверно ниже, чем у мышей дикого типа (Рисунок 5А). В FUS-трансгенной модели только на симптомной стадии было выявлено достоверное повышение площади экспрессии АХЭ (Рисунок 5Б).

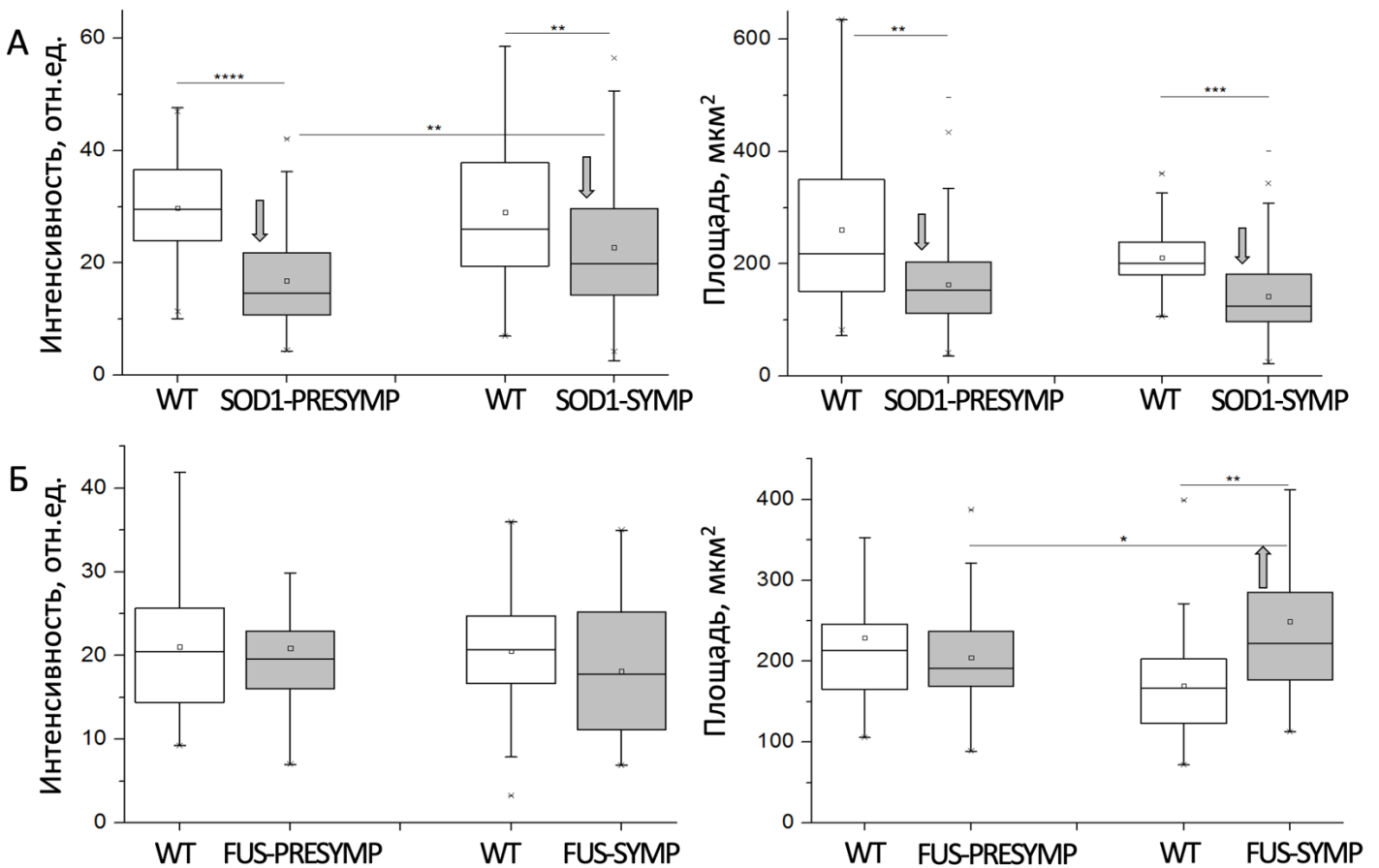


Рисунок 5 – Площадь и интенсивность флуоресценции АХЭ в НМС трансгенных моделей. А - mSOD1-модель. Б – FUS-модель. * - $p < 0,05$. ** - $p < 0,01$. *** - $p < 0,001$, **** - $p < 0,0001$.

Однако, для двух трансгенных моделей отмечался общий паттерн изменения экспрессии АХЭ в виде достоверно более высоких ее показателей на симптомной стадии в сравнении с досимптомной стадией (см. Рисунок 5).

Также установлено, что в трансгенной mSOD1-модели на досимптомной стадии отмечается достоверное снижение иммуноэкспрессии синаптических белков SNAP-25 и синапсина I (Рисунок 6).

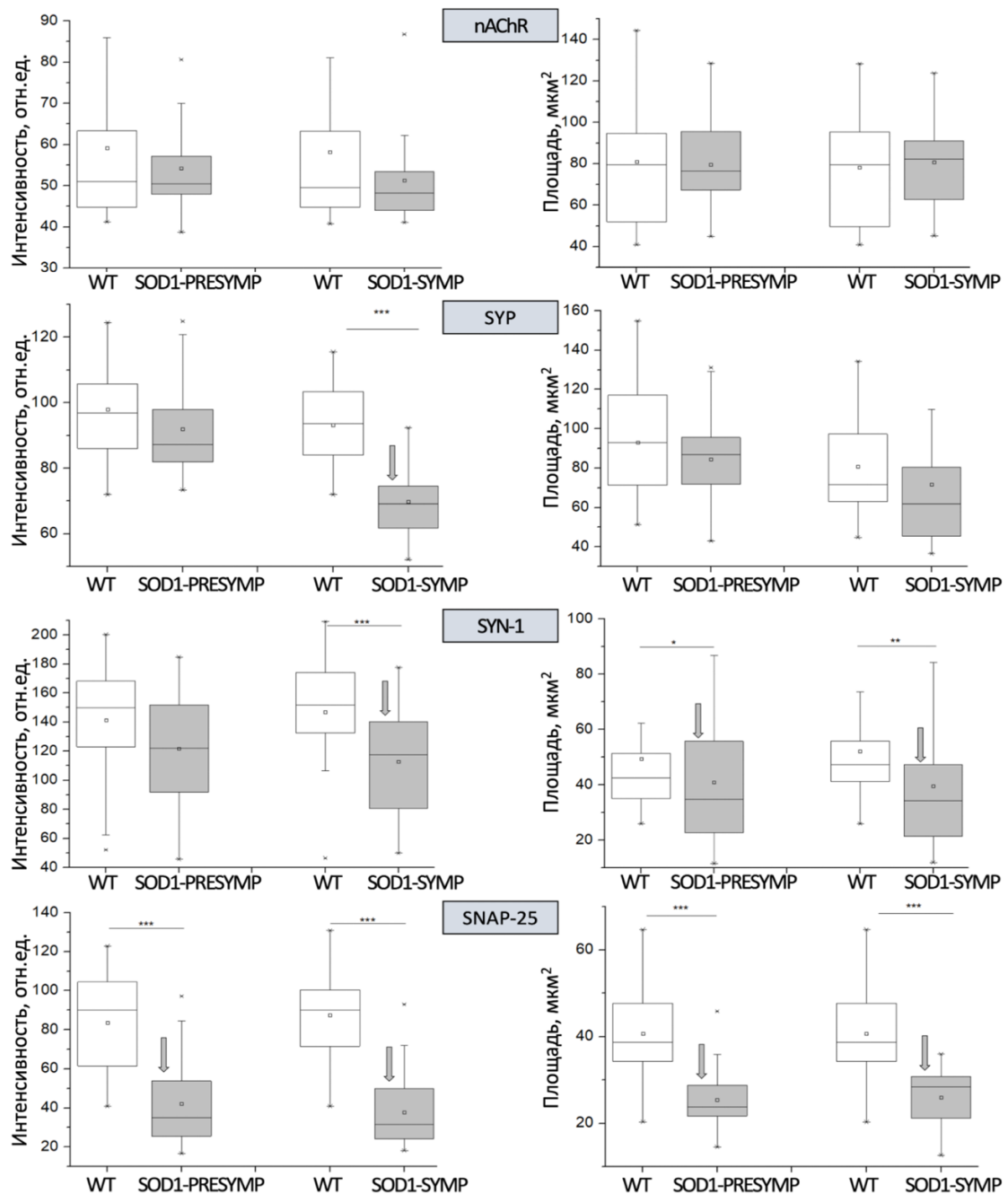


Рисунок 6 – Площадь и интенсивность флуоресценции синаптических белков в НМС mSOD1-трансгенной модели. * - $p < 0,01$. ** - $p < 0,001$. *** - $p < 0,0001$. nAChR – н-холинорецепторы, SYP - синаптофизин, SYN-1 – синапсин I, SNAP25.

Presymp – трансгенная модель на досимптомной стадии. Symp – трансгенная модель на симптомной стадии. WT – контроль, мыши дикого типа соответствующего возраста.

В FUS-трансгенной модели на досимптомной стадии показано значимое повышение экспрессии пресинаптических белков синапсина I и SNAP-25 (Рисунок 7). На симптомной стадии в FUS-трансгенной модели отмечено достоверное снижение экспрессии пресинаптических белков синаптофизина, синапсина I и SNAP-25. Также в трансгенной FUS-модели на симптомной стадии отмечалось достоверное снижение площади флуоресценции nAChR.

Таким образом, клинико-экспериментальный характер настоящего исследования позволил установить некоторые звенья патогенеза, согласующиеся с «восходящей» гипотезой патогенеза БАС. В экспериментальной части было установлено нарушение экспрессии пресинаптических белков синапсина I и SNAP-25 на досимптомной стадии. Согласно теоретическим и экспериментальным данным, подобное нарушение приводит к дисфункции НМС и способствует его денервации (Verma S. et al., 2022). В следствие начинающегося денервационного процесса на досимптомной стадии отмечается нарушение экспрессии АХЭ в НМС. При дальнейшем прогрессировании заболевания и гибели мотонейронов развивается симптоматическая стадия, что отражается в едином для двух трансгенных моделей грубом нарушении экспрессии пресинаптических белков и АХЭ. Выявленные изменения экспрессии пресинаптических белков в трансгенных моделях согласуются с иммунофлуоресцентной картиной НМС пациента с БАС в биопсийном материале.

Эти экспериментальные данные позволяют предположить возможную роль АХЭ как маркера прогрессирующего денервационного процесса при БАС. У пациентов с бульбарной формой БАС регистрируется достоверное изменение активности АХЭ в слюне. Однако, при рутинном исследовании активности АХЭ

в плазме крови достоверные изменения не выявляются. Возможные причины подобного наблюдения были изложены выше.

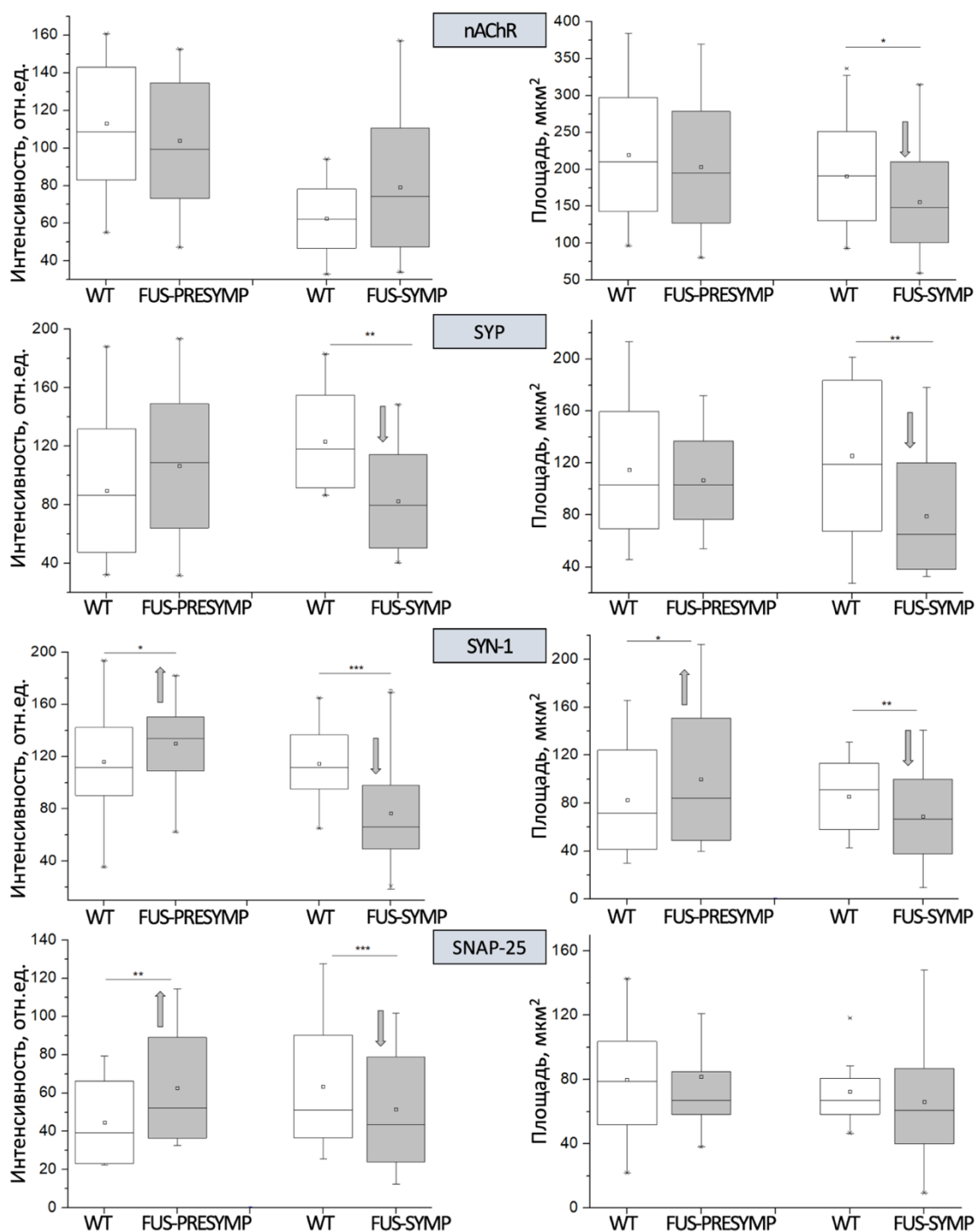


Рисунок 7 – Площадь и интенсивность флуоресценции синаптических белков в НМС FUS-трансгенной модели. * - $p < 0,05$. ** - $p < 0,01$. *** - $p < 0,001$. nAChR – н-холинорецепторы, SYP - синаптофизин, SYN-1 – синапсин I, SNAP25. Presymp – трансгенная модель на досимптомной стадии. Symp – трансгенная модель на

симптомной стадии. WT – контроль, мыши дикого типа соответствующего возраста.

Изменение экспрессии синаптических белков может объяснить электрофизиологические данные о нарушении синаптической передачи в НМС, наблюдаемые в трансгенных моделях и у пациентов с БАС, в том числе незначительный декремент М-ответов при ритмической стимуляции, описанный в литературе (Zhang D. et al., 2019). Также в клинической части настоящего исследования был установлен радиологический феномен атрофии спинного мозга вследствие дегенерации мотонейронов передних рогов в виде расширения центрального канала. Вышеописанные результаты настоящего исследования определяют научную новизну, теоретическую и практическую значимость работы (Рисунок 8).

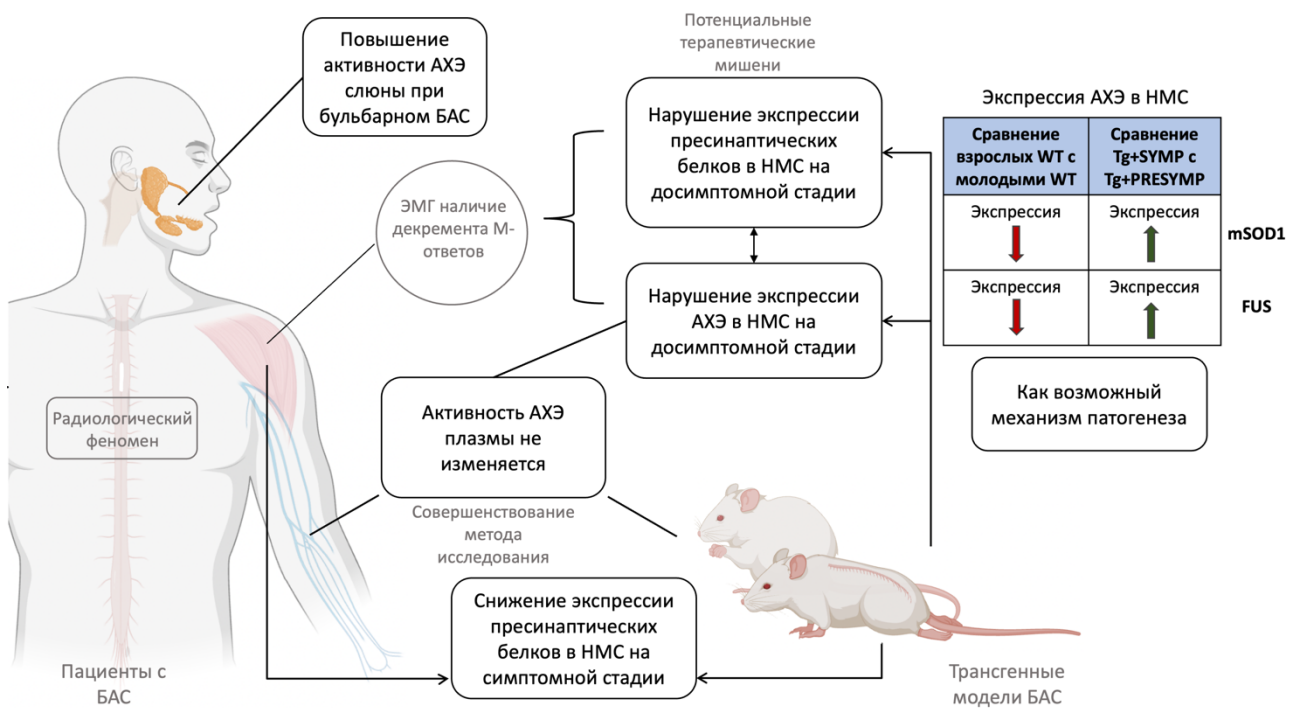


Рисунок 8 - Схематичное изображение установленных и предполагаемых на основании результатов настоящего исследования звеньев патогенеза и фенотипических характеристик БАС

ВЫВОДЫ

1. Активность АХЭ слюны статистически значимо выше у пациентов с бульбарной формой БАС по сравнению с пациентами со спинальной формой БАС ($p=0,022$) и здоровыми лицами ($p=0,035$), что позволяет рассматривать данный показатель в качестве диагностического маркера для подтверждения БАС у пациентов с бульбарными нарушениями.

2. Активность АХЭ плазмы крови у пациентов с БАС достоверно не изменяется ($p>0,05$), соответственно, рутинное определение данного показателя не может рассматриваться в качестве диагностического маркера заболевания.

3. В трансгенной модели БАС активность АХЭ плазмы крови не отличается в сравнении с мышами дикого типа ($p>0,05$), независимо от стадии заболевания.

4. На досимптомной стадии в mSOD1-трансгенной модели выявлено достоверное снижение экспрессии пресинаптических белков SNAP-25 ($p<0,001$) и синапсина I ($p<0,01$), в то время как в FUS-трансгенной модели – достоверное повышение экспрессии SNAP-25 ($p<0,01$) и синапсина I ($p<0,05$). На симптомной стадии в двух трансгенных mSOD1- и FUS-моделях выявлено достоверное снижение экспрессии SNAP-25, синапсина I и синаптофизина ($p<0,01$).

5. С развитием симптомной стадии в обеих трансгенных моделях отмечается повышение экспрессии АХЭ в НМС ($p<0,05$).

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Измерение активности АХЭ слюны при БАС может быть предложено для подтверждения диагноза у пациентов с бульбарным синдромом в дебюте заболевания, а также для дифференциальной диагностики бульбарных параличей другой этиологии.

2. Для диагностики БАС измерение активности АХЭ плазмы крови не следует рассматривать в качестве диагностического биомаркера вследствие отсутствия достоверных изменений.

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Перспективой дальнейших исследований может являться разработка терапевтических подходов коррекции НМС при БАС в зависимости от характера нарушения экспрессии синаптических белков.

Перспективными видятся исследования по более широкому изучению холинергической системы при БАС, которые могут включать изучение изоформ АХЭ, а также других участников холинергической системы в биологических жидкостях совместно с морфологическими и функциональными исследованиями слюнных желез, а также головного и спинного мозга, в частности структуры вегетативной нервной системы.

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор выражает благодарность и признательность Самигуллину Д.В., Нуруллину Л.Ф., Сибгатуллиной Г.В. (лаборатория биофизики синаптических процессов Казанского института биохимии и биофизики, обособленное структурное подразделение ФИЦ КазНЦ РАН) за оказанную помощь и содействие в проведении иммунофлуоресцентного исследования; Зуевой И.В. и Петрову К.А. (лаборатория «Нейрофизиология» Института органической и физической химии им. А.Е. Арбузова, обособленное структурное подразделение ФИЦ КазНЦ РАН) за оказанную помощь и содействие в проведении спектрофотометрического исследования.

Исследования выполнены при поддержке гранта Российского научного фонда № 19-15-00329, гранта Президента РФ МД-6877.2018.4, гранта ФГБОУ ВО Казанский ГМУ Минздрава России по договору № 1/22-3 о предоставлении гранта от 13.07.2022 г. в рамках Программы развития университета, гранта Российского научного фонда № 23-15-00438, с использованием оборудования ЦКП-САЦ ФИЦ КазНЦ РАН.

СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ

- 1. Dysfunction of neuromuscular synaptic transmission and synaptic vesicle recycling in motor nerve terminals of mSOD1 transgenic mice with model**

of amyotrophic lateral sclerosis / M. A. Mukhamedyarov, P. N. Grigoryev, A. N. Khabibrakhmanov [et al.] // BioNanoScience. – 2019. – Vol. 9. – Pp. 66-73.

2. Оценка экспрессии белков нервно-мышечного синапса диафрагмы трансгенных mSOD1-мышей с моделью бокового амиотрофического склероза / А. Н. Хабибрахманов, Л. Ф. Нуруллин, М. А. Мухамедьяров, Э. И. Богданов // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. Материалы XI всероссийского съезда неврологов и IV конгресса национальной ассоциации по борьбе с инсультом. – Москва, 2019. – С. 527-528.

3. Оценка экспрессии белков нервно-мышечного синапса скелетных мышц трансгенных мышей с моделью бокового амиотрофического склероза / А. Н. Хабибрахманов, Л. Ф. Нуруллин, М. А. Мухамедьяров, Э. И. Богданов // Международная конференция «Актуальные проблемы нейробиологии». Тезисы докладов. – Казань, 2019. – С. 43.

4. Анализ иммуноэкспрессии синаптических белков нервно-мышечных синапсов трансгенных мышей с моделью бокового амиотрофического склероза / А. Н. Хабибрахманов, Л. Ф. Нуруллин, А.Л. Зефилов, М. А. Мухамедьяров // II объединенный научный форум, VI съезд физиологов СНГ, VI съезд биохимиков России, IX Российский симпозиум «Белки и пептиды». Тезисы докладов. – Сочи-Дагомыс, 2019. – С. 119-120.

5. **Analysis of immunoeexpression of synaptic proteins in neuromuscular junctions of symptomatic and presymptomatic mSOD1 transgenic mice with model of amyotrophic lateral sclerosis / A. N. Khabibrakhmanov, L. F. Nurullin, E. I. Bogdanov [et al.] // BioNanoScience. – 2020. – Vol. 10. – Pp. 375-380.**

6. **Мухамедьяров М. А. Ранние дисфункции при боковом амиотрофическом склерозе: патогенетические механизмы и роль в инициации заболевания / М. А. Мухамедьяров, А. Н. Хабибрахманов, А. Л. Зефилов // Биологические мембраны. – 2020. – Т. 37, № 47 – С. 264-270.**

7. Synaptic proteins in neuromuscular synapses at the presymptomatic and symptomatic stages of pathology in ALS model / A. Khabibrakhmanov, L. Nurullin,

E. Bogdanov, M. Mukhamedyarov // *European Journal of Neurology*, 27 (Suppl. 1). – 2020. – P. 867.

8. Хабибрахманов А. Н. Иммуноэкспрессия синаптических белков в нервно-мышечном синапсе трансгенных mSOD1-мышей с моделью бокового амиотрофического склероза на разных стадиях заболевания / А. Н. Хабибрахманов, М. А. Мухамедьяров // VII международный молодежный научно-медицинский форум «Белые Цветы». Сборник тезисов. – Казань, 2020. – С. 167.

9. Анализ иммуноэкспрессии ключевых синаптических белков в нервно-мышечном синапсе на досимптомной и симптоматической стадии патологии в модели бокового амиотрофического склероза / А. Н. Хабибрахманов, Л. Ф. Нуруллин, М. А. Мухамедьяров, Э. И. Богданов // XXII Давиденковские чтения. Сборник тезисов. – Санкт-Петербург, 2020. – С. 405-407.

10. **Clinical cases of amyotrophic lateral sclerosis concurrent with hydromyelia / E. I. Bogdanov, E. G. Mendelevich, A. N. Khabibrakhmanov [et al.] // *Clinical Case Reports*. – 2021. – Vol. 9, No 6. – Pp. 1571-1576.**

11. Хабибрахманов А. Н. Экспрессия синаптических белков в нервно-мышечных синапсах FUS-трансгенных мышей с моделью бокового амиотрофического склероза / А. Н. Хабибрахманов, Э. И. Богданов, М. А. Мухамедьяров // VIII Международный молодежный научный медицинский форум «Белые Цветы», посвященный 120-летию студенческого научного общества имени Ирины Андреевны Студенцовой. Сборник статей по итогам конференции. – Казань, 2021. – С. 1119-1120.

12. **Хабибрахманов А. Н. Биомаркеры бокового амиотрофического склероза / А. Н. Хабибрахманов, М. А. Мухамедьяров, Э. И. Богданов // *Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова*. – 2022. – Т. 122, №5. – С. 30-35.**

13. Acetylcholinesterase activity does not change in the plasma of patients with amyotrophic lateral sclerosis / A. Khabibrakhmanov, I. Zueva, M.

Mukhamedyarov, E. Bogdanov // European Journal of Neurology. – 2022. – Vol. 29, Suppl. 1. – Pp. 604-605.

14. **Early alterations in structural and functional properties in the neuromuscular junctions of mutant FUS mice / M. A. Mukhamedyarov, A. N. Khabibrakhmanov, V. F. Khuzakhmetova [et al.] // International Journal of Molecular Science. – 2023. – Vol. 24, No 10. – 9022.**

15. Ранние нарушения структурно-функциональных свойств нервно-мышечных синапсов трансгенных FUS-мышей с моделью бокового амиотрофического склероза / М. А. Мухамедьяров, А. М. Петров, А. Н. Хабибрахманов [и др.] // Сборник тезисов XXIV съезда физиологического общества им. И. П. Павлова. – Санкт-Петербург, 2023. – С. 19.

16. **Активность ацетилхолинэстеразы крови и слюны при боковом амиотрофическом склерозе / А. Н. Хабибрахманов, И. В. Зуева, К. А. Петров [и др.] // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. – 2024. – Т. 124, №1. – С. 128-134.**

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- АХЭ – ацетилхолинэстераза
 БАС – боковой амиотрофический склероз
 ВМН – верхний мотонейрон
 МРТ – магнитно-резонансная томография
 НМН – нижний мотонейрон
 НМС – нервно-мышечный синапс
 ПБС – первичный боковой склероз
 ПМА – прогрессирующая мышечная атрофия
 ФТД – фронто-темпоральная дегенерация
 ЭМГ – электромиография
 ALSFRS-R – Amyotrophic lateral sclerosis functional rating scale revised, пересмотренная шкала нарушений функций при БАС
 FUS – fused in sarcoma protein
 FUS-PRESYMP – трансгенные FUS-мышцы на досимптомной стадии
 FUS-SYMP - трансгенные FUS-мышцы на симптомной стадии
 King's – шкала стадирования БАС Королевского Колледжа Лондона
 Me – медиана
 Mean±SE – среднее значение ± стандартная ошибка
 Merged – объединенное изображение
 mSOD1(G93A) – mutated superoxide dismutase 1, мутированный ген супероксиддисмутазы 1, глицин замещён на аланин в позиции 93

mSOD1-PRESYMP – трансгенные mSOD1-мышы на досимптомной стадии

mSOD1-SYMP - трансгенные mSOD1-мышы на симптомной стадии

nAChR – н-холинорецепторы

SNAP-25 – synaptosomal-associated protein 25-kD, один из главных компонентов белкового комплекса SNARE

SOD1 – superoxide dismutase 1, супероксиддисмутаза-1

SYN-I – синапсин-1

SYP – синаптофизин

WT – мышы дикого типа