

УДК 577.29

НАРУШЕНИЯ СИНАПТИЧЕСКОЙ ПЕРЕДАЧИ ПРИ БОЛЕЗНИ ХАНТИНГТОНА НА КОРТИКОСТРИАТНОЙ МОДЕЛИ КУЛЬТУРЫ НЕЙРОНОВ

© 2013 г. Д. Н. Артамонов^{1*}, В. В. Коржова¹, Д. Ву², П. Д. Рыбальченко¹, К. Им²,
В. А. Красноборова¹, О. Л. Власова¹, И. Б. Безпрозванный^{1,2}

¹Санкт-Петербургский государственный политехнический университет, лаборатория молекулярной нейродегенерации, 195251, Санкт-Петербург, ул. Политехническая, 29, Россия;

*электронная почта: artdmitrii@gmail.com

²Department of Physiology, University of Texas Southwestern Medical Center,
5323 Harry Hines Blvd., Dallas, Texas, 75390 USA

Поступила в редакцию 20.03.2013 г.

Болезнь Хантингтона (БХ) — тяжелое наследственное нейродегенеративное заболевание, неизлечимое в настоящее время. Одной из основных причин развития этого заболевания считается нарушение кортикостриатных связей, приводящее к характерным моторным нарушениям. В данной работе синаптическая передача между нейронами коры и стриатума изучена на смешанной кортикостриатной культуре нейронов, использованной в качестве модели БХ. Культура нейронов получена из головного мозга мышей линии YAC128 с генетической мутацией, вызывающей болезнь Хантингтона. Первые нарушения отмечены уже на 14 день культивирования: нейроны коры культуры YAC128 отличаются повышенной спонтанной активностью по сравнению с культурой нейронов дикого типа. В то же время на 14 день морфологическое состояние дендритного дерева стриатных нейронов в модели БХ было нормальным, однако применение оптогенетического подхода показало, что уже в это время нарушаются синаптические контакты. К 19 дню культивирования активность кортикальных нейронов YAC128 опускается ниже нормы, что приводит к нарушениям на постсинаптической стороне — элиминации и морфологическим изменениям дендритных шипиков, которые, вероятно, приводят к нейродегенеративным процессам в ходе развития БХ.

Ключевые слова: синаптическая передача, болезнь Хантингтона, оптогенетика, дендритные шипики, культура нейронов.

DOI: 10.7868/S0233475513040026

Болезнь Хантингтона (БХ) — аутосомно-доминантное наследственное заболевание, вызываемое мутацией в гене, кодирующем белок хантингтин (Htt). В первом экзоне мутантного гена увеличено число тринуклеотидных повторов CAG, кодирующих глутамин [1]. Если длина полиглутаминового участка превышает 40 аминокислотных остатков, то болезнь проявляется со 100% пенетрантностью и приводит к летальному исходу. К симптомам заболевания относятся как моторные нарушения — неконтролируемые отрывистые движения (хорея), так и нарушение когнитивных функций и психического состояния (депрессия), часто проявляющиеся раньше моторных расстройств [2]. В настоящее время отсутствуют методы лечения больных БХ, применяется только симптоматическая терапия, в основном для подавления произвольных моторных актов.

БХ рассматривают как болезнь, поражающую главным образом стриатум, так как гибели наиболее подвержены нейроны именно этой области — ГАМКергические средние шипиковые нейроны (СШН) [3], которые составляют 95% нейронов стриатума. Позже в ходе развития заболевания наблюдается нейродегенерация коры (третий, пятый и шестой слои), бледного шара, таламуса, гипоталамуса, черной субстанции и мозжечка [4–8].

Стриатум является одним из основных элементов сложной системы контроля поведения, он обеспечивает взаимодействие и регуляцию сенсорной и когнитивной информации и мотивации [9]. Стриатум получает афферентные входы со стороны коры, специфических ядер таламуса и компактной части черной субстанции [10] и имеет два эфферентных пути — прямой и непрямой, связывающих стриатум с нейронами бледного шара и черной субстанции [11]. Согласно совре-

менным представлением о работе стриопаллидарной системы прямой и не прямой пути противоположны по своему физиологическому эффекту: активация прямого пути вызывает растормаживание таламокортикальных связей и обеспечивает двигательную активность, а активация не прямой — торможение этих связей и подавление моторных сигналов [12]. Таким образом, нарушения в работе любого из этих путей могут приводить к патофизиологическим изменениям моторного поведения.

К настоящему времени большое количество экспериментальных данных свидетельствует в пользу гипотезы о ключевой роли изменений кортикостриатных связей в развитии БХ [13]. Потеря скоординированной активности нейронов коры и стриатума обнаружена во всех животных моделях БХ еще до проявления ярких симптомов болезни и гибели нейронов [14, 15]. При этом нарушения, вероятно, происходят главным образом на уровне синаптической передачи — ряд исследований показал, что нарушение работы синапсов является одним из первых эффектов присутствия в нейронах мутантного хантингина. К этим эффектам относится увеличение сопротивления мембраны СШН [16] и изменение ряда других характеристик мембраны (в том числе, кинетических характеристик калиевых каналов и кальциевых токов) как у СШН, так и у пирамидных клеток коры [17]. Таким образом, считается, что один из основных патологических процессов при БХ — нарушение кортикостриатной системы [18].

Целью настоящей работы было изучение синаптической передачи в разработанной модельной кортикостриатной *in vitro* системе БХ. Важно отметить, что в монокультуре, без воздействия нейронов коры, СШН стриатума характеризуются отсутствием как шипиков, так и спонтанной активности [19]. Модель БХ на кортикостриатной культуре позволяет изучать синаптическую передачу, так как нейроны коры и стриатума функционально связаны и проявляют спонтанную активность. Важную роль в нормальной синаптической передаче играют дендритные шипики. Поскольку считается, что они претерпевают изменения во время приобретения нового опыта, при формировании памяти и старении [20], подобные процессы могут происходить и при развитии различных нейродегенеративных заболеваний. Однако мало известно о роли морфологических изменений дендритного дерева СШН при БХ, поэтому большое внимание в работе уделено исследованию дендритных шипиков. Регистрация электрической активности на СШН стриатума с одновременной оптогенетической стимуляцией нейрона коры для возбуждения пресинаптического потенциала действия позволяет моделировать функциональные связи, формируемые *in vivo*, и дает воз-

можность непосредственно изучать нарушения синаптических контактов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Кортикостриатные первичные культуры нейронов. Для приготовления культур использовали головной мозг новорожденных трансгенных мышшей линии YAC128 (Jackson Labs, 004938), несущих мутантный аллель *HTT* человека [21]. Гетерозиготные самцы YAC128 скрещивались с самками дикого типа, и их потомство, состоящее из мышат дикого типа и YAC128, использовали на 1–2 день после рождения. Мышат генотипировали с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР), используя праймеры к экзонам 44 и 45 гена *HTT* человека, после чего извлекали мозг и изготавливали смешанные культуры коры и стриатума мышшей YAC128 и дикого типа (WT). Первичные культуры нейронов готовили по методике, описанной ранее [22]. Клетки культивировали на покрытых поли-L-лизинем (Sigma) 12 мм стеклах (Assistent) в среде Neurobasal-A (Invitrogen) с добавлением 2% B-27 (Gibco), 5% фетальной сыворотки крупного рогатого скота (Gibco) и 1 ммоль/L L-глутамин (Invitrogen). Культуры инкубировали 14–20 дней при температуре 37°C и 5% CO₂.

Трансфекция нейронов плазмидами для экспрессии каналородопсина. Для экспрессии опинов в нейронах использовали плазмиды, кодирующие каналородопсин ChR2 и галородопсин NpHR, слитые с геном белка GFP, под контролем промотора CMV (Addgene plasmids 15814, 14750) [23]. Трансфекцию проводили по описанной ранее методике [24]: культуру нейронов инкубировали с Ca-содержащим раствором плазмиды (1 мкг) до появления четко различимого осадка, после чего осадок растворяли в закисленной среде Neurobasal-A (Invitrogen) в течение 30 мин, культуру промывали средой для инкубации без добавления FBS. Трансфицированную культуру нейронов инкубировали в течение 14–19 дней при температуре 37°C и 5% CO₂ и использовали для электрофизиологических экспериментов через 2–7 дней.

Регистрация электрической активности нейронов. Спонтанную и индуцированную электрическую активность нейронов в смешанной кортикостриатной культуре регистрировали с помощью метода локальной фиксации потенциала (пэтч-кламп) в конфигурации “cell-attached”. Пипетки готовили из 10 см боросиликатных стеклянных капилляров с филаментом (Sutter), сопротивление пипеток составляло 3–5 МОм. Для инкубации клеток в течение эксперимента и заполнения пипетки использовали раствор следующего состава: 140 ммоль NaCl, 2.4 ммоль KCl, 10 ммоль HEPES, 10 ммоль глюкозы, 4 ммоль CaCl₂, 4 ммоль MgCl₂, pH 7.2–7.4. Регистрация

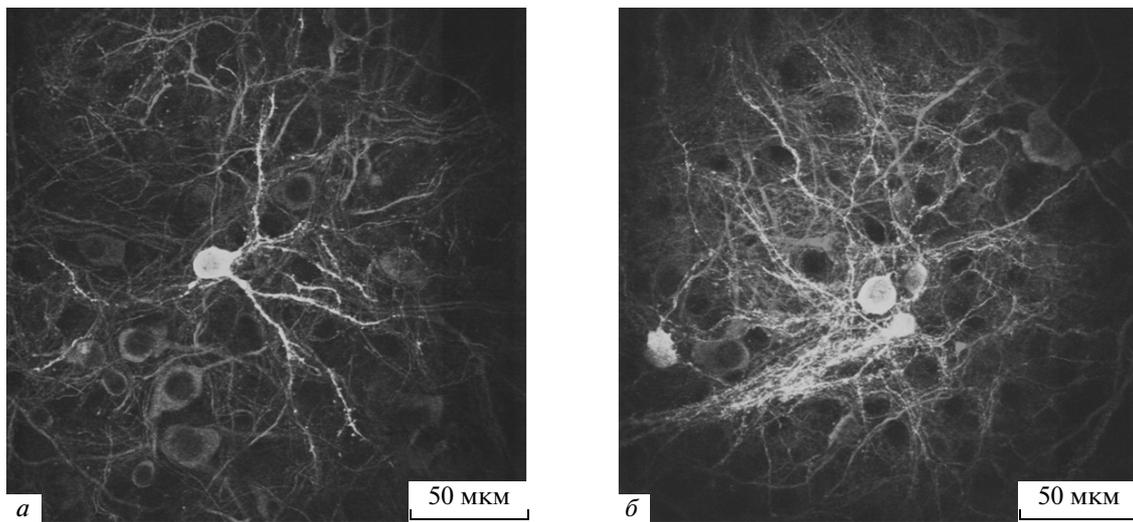


Рис. 1. Иммуноцитохимическое окрашивание смешанной культуры нейронов коры и стриатума мышей дикого типа (а) и YAC128 (б). DARPP-32 (на рисунке светло-серый,) и MAP2 (на рисунке темно-серый) на 14 день культивирования.

токов проводилась при фиксированном напряжении – 70 мВ. Данные анализировали и обрабатывали в программном обеспечении pClamp 9.0 (Molecular devices).

Для регистрации индуцированной активности нейронов применяли оптогенетическую стимуляцию. С этой целью использовали трансфицированные культуры нейронов, в которых с помощью флуоресцентного сигнала GFP находили кортикальные нейроны, экспрессирующие плазмиду с каналородопсином. После этого нейрон возбуждался с помощью оптогенетической стимуляции синим светом (фильтр 450–490 нм), быстрый затвор Sutter Instruments применяли для создания кратковременных импульсов света при различной длительности экспозиции. Индуцированную электрическую активность регистрировали на этом же кортикальном нейроне либо на находящемся рядом СШН.

Иммуноцитохимическое окрашивание. Для иммуноцитохимического окрашивания применяли первичные антитела – кролика к нейрональному маркеру MAP2 (Cell Signalling Technology) и мыши к маркеру СШН DARPP32 (Cell Signalling Technology), вторичные антитела – к антителам кролика и мыши, слитые с флуорофорами (Alexa Fluor 488 и Cy5, Invitrogen). После окраски готовили микроскопические препараты, которые анализировали на конфокальном микроскопе Zeiss LSM 700. Для последующего анализа морфологии шипиков получали последовательные микрофотографии нейронов с интервалом 0.15 мкм по глубине, формирующие трехмерное изображение нейронов (рис. 1). Использовали иммерсионный объектив со 100-кратным увеличением, разрешение полученного изображения 1024 × 1024 пикселей.

Морфологический анализ шипиков. Для морфологического анализа шипиков использовали программное обеспечение Neuron Studio [25], позволяющее автоматически реконструировать трехмерное изображение шипиков и распределять их на три группы (грибовидные, тонкие, пеньковые) по заданным параметрам. Были использованы следующие параметры: min stubby size (минимальный размер пенькового) – 50, non-stubby (непенькового) – 20, neck ratio (отношение шейки) – 1.1, thin ratio (отношение тонкого) – 1.5, mushroom size (размер грибовидного) – 0.35. Плотность распределения шипиков определяли как среднее количество шипиков на 10 мкм.

Статистический анализ. Данные приведены как среднее ± стандартное отклонение. Статистическую обработку экспериментальных результатов проводили с помощью критерия Манна–Уитни–Вилкоксона.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Спонтанная активность кортикальных нейронов. Прежде всего была изучена спонтанная активность кортикальных нейронов в интактной культуре YAC. Контролем служила культура дикого типа, приготовленная в тот же день. Спонтанную активность определяли методом локальной фиксации потенциала в конфигурации “cell-attached”. Эта методика позволяет фиксировать быстрые мембранные токи, соответствующие потенциалам действия, оставаясь при этом нечувствительной к индуцированным постсинаптическим токам [26]. Запись спонтанной активности дает представление об общей активности нейронных цепей и синаптической интеграции нейро-

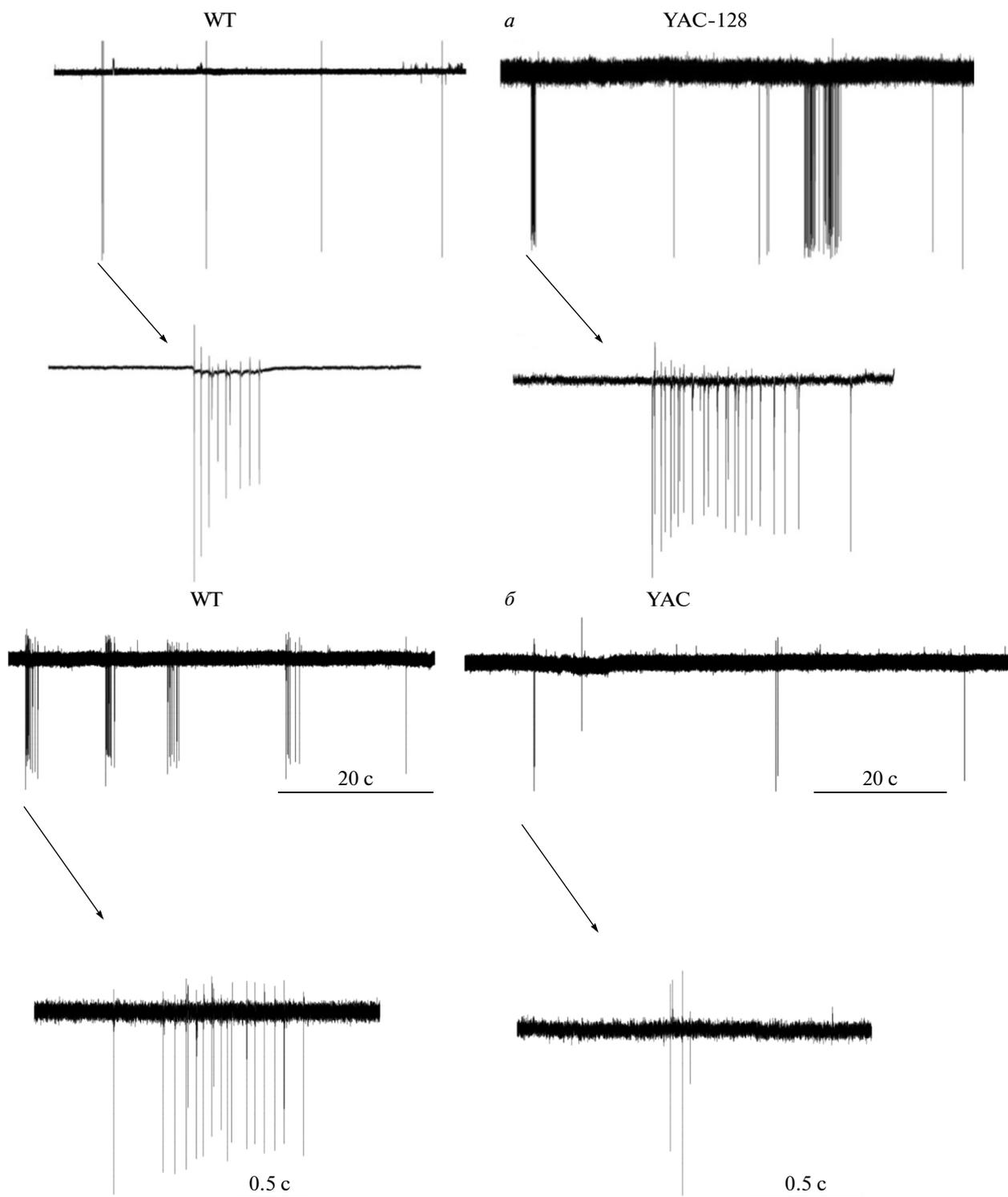


Рис. 2. Спонтанная активность кортикальных нейронов в смешанной культуре на 14–19 день культивирования. *a* – 14 день; *б* – 19 день; *в* – Зависимость среднего количества потенциалов действия (ПД) в пачке от возраста культуры мышей WT и YAC128.

нов. Были проанализированы долговременные записи (10 мин) активности клеток. На 14 день культивирования нейронов (рис. 2*a*) общие паттерны активности в культурах из мозга мышей

WT и YAC128, не имели ярко выраженных отличий. Не выявлено разницы в частоте пачек спонтанной активности и амплитуде сигнала. Единственным параметром, в котором отличия прояв-

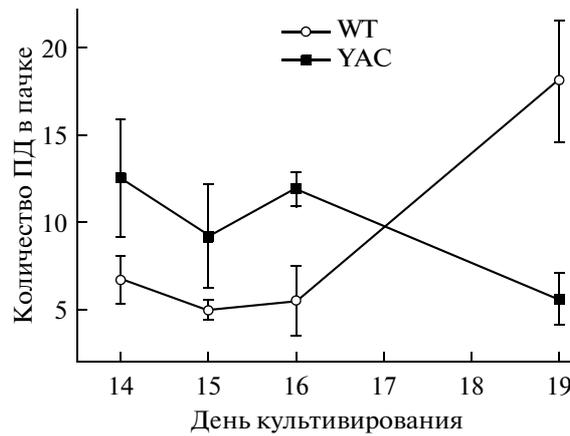


Рис. 2. Окончание.

лялись уже на 14 день в культуре, было количество потенциалов действия в одной пачке. На рис. 2а представлены типичные паттерны активности кортикальных нейронов на 14 день в смешанной культуре дикого типа и YAC128. Дополнительно приведены структуры отдельных пачек в увеличенном масштабе. К 19-му дню культивирования структура пачек претерпевает изменения как в культуре дикого типа, так и в культуре YAC128 (рис. 2б). На рис. 2в представлена временная зависимость активности кортикальных нейронов от дня культивирования. По оси ординат приведено среднее количество потенциалов действия в пачке для каждой клетки в культуре дикого типа и YAC128. Как видно из представленных данных, на 14–16 день культивирования нейроны коры в культуре YAC128 отличаются повышенной спонтанной активностью, но к 19-му дню их активность снижается. В то же время в культуре нейронов дикого типа спонтанная активность изменяется противоположным образом.

Морфология шипиков средних шипиковых нейронов стриатума. Дендритные шипики определяли согласно морфологическим критериям по общепринятой классификации [27]. Шипики подразделяют на три группы по соотношению размеров головки и шейки шипика – грибовидные, тонкие и пеньковые.

В нашей работе исследованы шипики СШН стриатума в смешанной кортикостриатной культуре YAC128. Контролем служила культура, приготовленная в тот же день, из мозга новорожденных мышей дикого типа. На конфокальном микроскопе получали микрофотографии иммуноцитохимически окрашенных нейронов, после чего по ним восстанавливали трехмерное изображение. Проекция данных изображений представлены на рис. 3. Анализ изображения позволяет различить шипики трех типов согласно заданной классификации. Распределение шипиков по разным типам пред-

ставлены на диаграммах. Относительное количество грибовидных шипиков отмечено светло-серым цветом, тонких – темно-серым, пеньковых – черным. Данные приведены для взрослых культур (14 дней) и для старых культур (20 дней). Из рис. 3 видно, что культуры, полученные из мозга мышей дикого типа и мышей YAC128, не различаются существенно по соотношению числа грибовидных шипиков и тонких или пеньковых. В старой культуре дикого типа распределение шипиков по типам было таким же, как во взрослой. Однако в старой культуре, полученной из YAC128 мышей, заметно снижено общее количество шипиков и изменено относительное количество шипиков разного типа: грибовидные шипики исчезают с возрастом, в то время как доля тонких шипиков увеличивается. Подобный эффект не наблюдается в культуре дикого типа. Таким образом, показано, что YAC-культуры характеризуются элиминацией шипиков. Можно предположить, что происходит трансформация грибовидных шипиков в тонкие. Поскольку большие грибовидные шипики являются сайтами, где образуются наиболее сильные синапсы, то потеря этих нейрональных контактов считается одной из основных причин нарушения синаптической передачи в кортикостриатной культуре YAC128.

Исходя из вышеприведенных электрофизиологических данных, можно предположить, что для поддержания нормального распределения шипиков по типам и функционирования СШН стриатума в культуре необходимо большее количество потенциалов действия в одной пачке нейрона коры в культурах YAC128 по сравнению с культурами дикого типа. Действительно, в старых YAC-культурах при снижении спонтанной активности кортикальных нейронов происходит элиминация грибовидных шипиков СШН стриатума. Подобный эффект отсутствует в культурах дикого типа. Для выяснения деталей нарушения

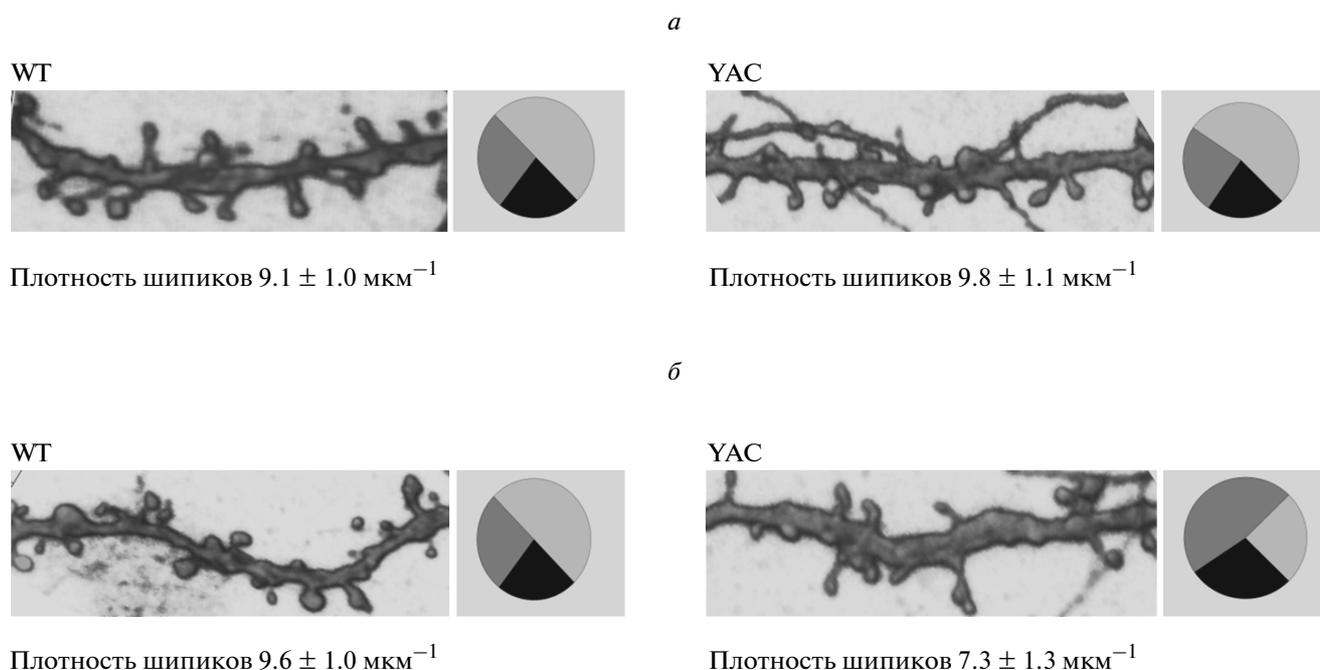


Рис. 3. Морфология шипиков СШН стриатума на 14 (*a*) и 20 (*б*) дни культивирования. Иммуноцитохимическое окрашивание DARPP-32. На диаграмме грибовидные шипики – светло-серые, тонкие – темно-серые, пеньковые – черные.

синаптических связей между нейронами коры и стриатума применяли оптогенетические методы.

Нарушения синаптической передачи между нейронами коры и стриатума в модельной культуре болезни Хантингтона. Для модулирования активности кортикальных нейронов в культуре на 14–15 день применили оптогенетический подход [28]. Культуру трансфицировали на 8–10 день. Во время эксперимента регистрировали активность GFP-меченого нейрона, экспрессирующего каналородопсин ChR2. Применение импульсов синего света разной длительности дало возможность модулировать пачки потенциалов действия кортикальных нейронов. На рис. 4*a* представлены паттерны активности при воздействии импульсами света различной длительности. В ответ на облучение на кортикальном нейроне регистрировались потенциалы действия. Как видно из представленных данных, высокое временное разрешение метода оптогенетики дает возможность моделировать любое заданное количество потенциалов действия в одной пачке путем подбора необходимой длительности импульса света. Пример такой зависимости приведен на рис. 4*б*.

Далее исследовали функциональные связи между нейронами коры и стриатума в культуре. Для изучения синаптической передачи кортикальный нейрон возбуждали синим светом, в то время как электрическую активность регистрировали на соседнем СШН, в котором не экспрессировался каналородопсин. Если между СШН и

нейроном коры существует функциональная синаптическая связь, то такой подход позволяет оценить эффективность синаптической передачи. В культуре дикого типа нашли четыре пары клеток, связанных синаптическими контактами, и пять – в культуре YAC128. Примеры записи ответов СШН на активацию кортикальных нейронов различными по длительности импульсами синего света приведены на рис. 5*a,б*. Зависимость вероятности возникновения потенциала действия от длительности импульса в СШН стриатума в культурах YAC128 и WT показана на рис. 5*в*. Минимальное время, необходимое для возникновения ответа СШН, сильно различалось в разных клетках и культурах. Например, у СШН дикого типа временной промежуток составлял от 2 до 80 мс. Если сравнивать только нейроны из культур, приготовленных одновременно, то порог 50% активации СШН в ответ на облучение кортикального нейрона у YAC128 в 2.3 ± 0.8 раза выше. Представленные данные указывают на нарушения в синаптической передаче в культуре YAC128 по сравнению с культурой дикого типа. Можно предположить, что в культуре YAC128 для ответного возбуждения СШН стриатума при активации синим светом кортикального нейрона необходимо более длительное воздействие светом, т.е. более длительная деполяризация нейрона коры и генерация большего количества потенциалов действия.

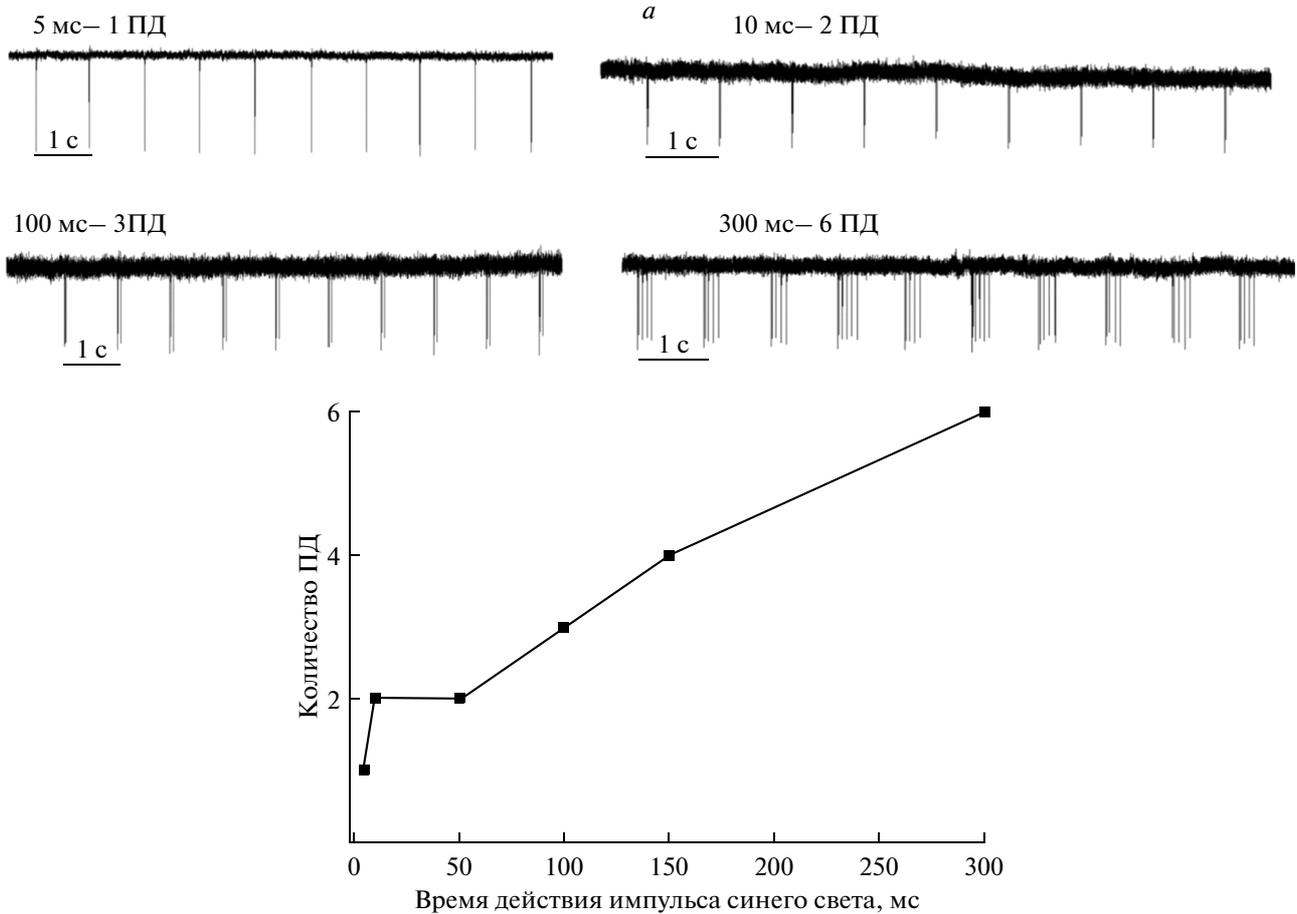


Рис. 4. Модуляция активности кортикальных нейронов методами оптогенетики. *a* – Использовали импульсы света различной длительности. *б* – Зависимость количества потенциалов действия (ПД) в пакете от длины импульса.

Изменения морфологии шипиков СШН в результате оптогенетического контроля активности кортикальных нейронов. В серии опытов установлена возможность изменения синаптических связей между нейронами – синапсов – при воздействии светом определенной длины волны. Морфологию дендритных шипиков, где и локализована большая часть синапсов, изучали на конфокальном микроскопе после иммуноцитохимического окрашивания нейронов стриатума на белок DARPP-32. Изображения анализировали с помощью программы Neuron Studio.

В данном случае культуру получали следующим образом. В первый день была приготовлена диссоциированная культура нейронов из коры головного мозга новорожденных мышей дикого типа. На второй день клетки трансфицировали лентивирусной конструкцией, содержащей ген галородопсина и слитый с ним ген *GFP*. На третий день поверх кортикальной культуры высаживали интактную культуру стриатных нейронов. Таким образом, галородопсин экспрессировался только в нейронах коры.

Смешанную культуру нейронов подвергали воздействию оранжевым светом в течение 45 мин, после этого клетки немедленно фиксировали в 4% растворе формальдегида. Показано, что во время облучения оранжевым светом электрическая активность пропадает как у кортикальных нейронов [28], так и на постсинаптической стороне (СШН стриатума, рис. 6*a*).

СШН стриатума на 15 день характеризовались одинаковой плотностью шипиков в культурах дикого типа (WT) и YAC. Тем не менее, после 45 мин облучения оранжевым светом плотность шипиков в культуре YAC128 значительно снижалась (рис. 6). Подобный эффект не был обнаружен в культурах дикого типа. Полученные данные свидетельствуют о том, что СШН стриатума в культуре, моделирующей синаптические связи при БХ, более чувствительны к изменениям в активности нейронов коры. При длительном ингибировании спонтанной активности нейронов коры в СШН стриатума в культуре YAC происходят значительные изменения – исчезновение шипиков и морфологические модификации. Поскольку большая

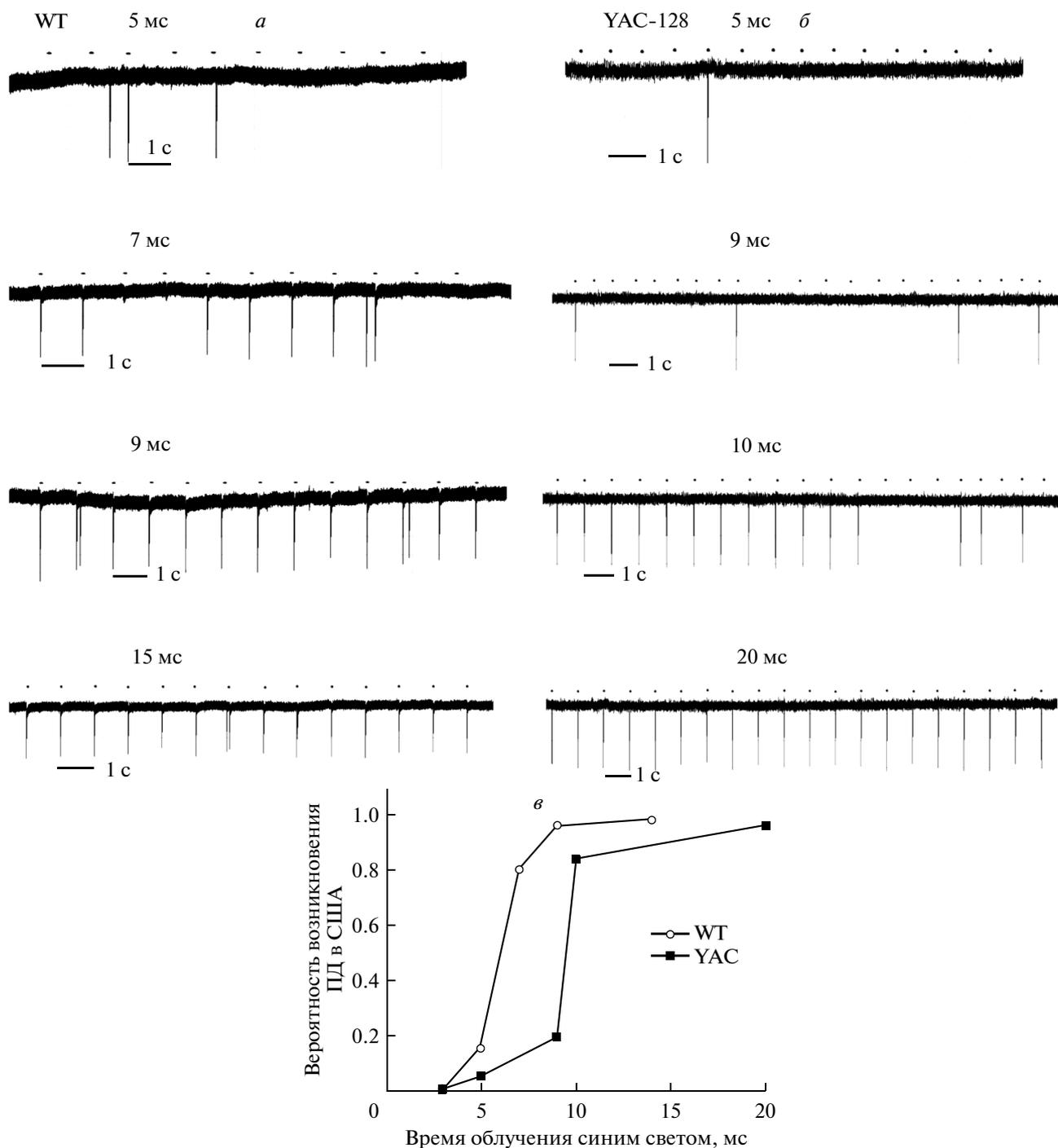


Рис. 5. Ответы СШН стриатума на оптогенетическую активацию кортикальных нейронов. 14 день культивирования. Представлены паттерны активности при разной длительности облучения синим светом. *a* – WT; *б* – YAC128; *в* – зависимость вероятности возникновения АД от времени облучения для культур WT и YAC128.

часть синапсов располагается как раз на шипиках, предполагается, что нейродегенерация нейронов стриатума при БХ может быть связана с нарушениями синапсов, которые, в свою очередь, вызываются измененной активностью нейронов коры.

Таким образом, показано, что в смешанной культуре образуются функциональные синаптические связи между нейронами коры и СШН. При помощи оптогенетических методов можно осуществлять контроль над отдельными популяциями клеток в культуре.

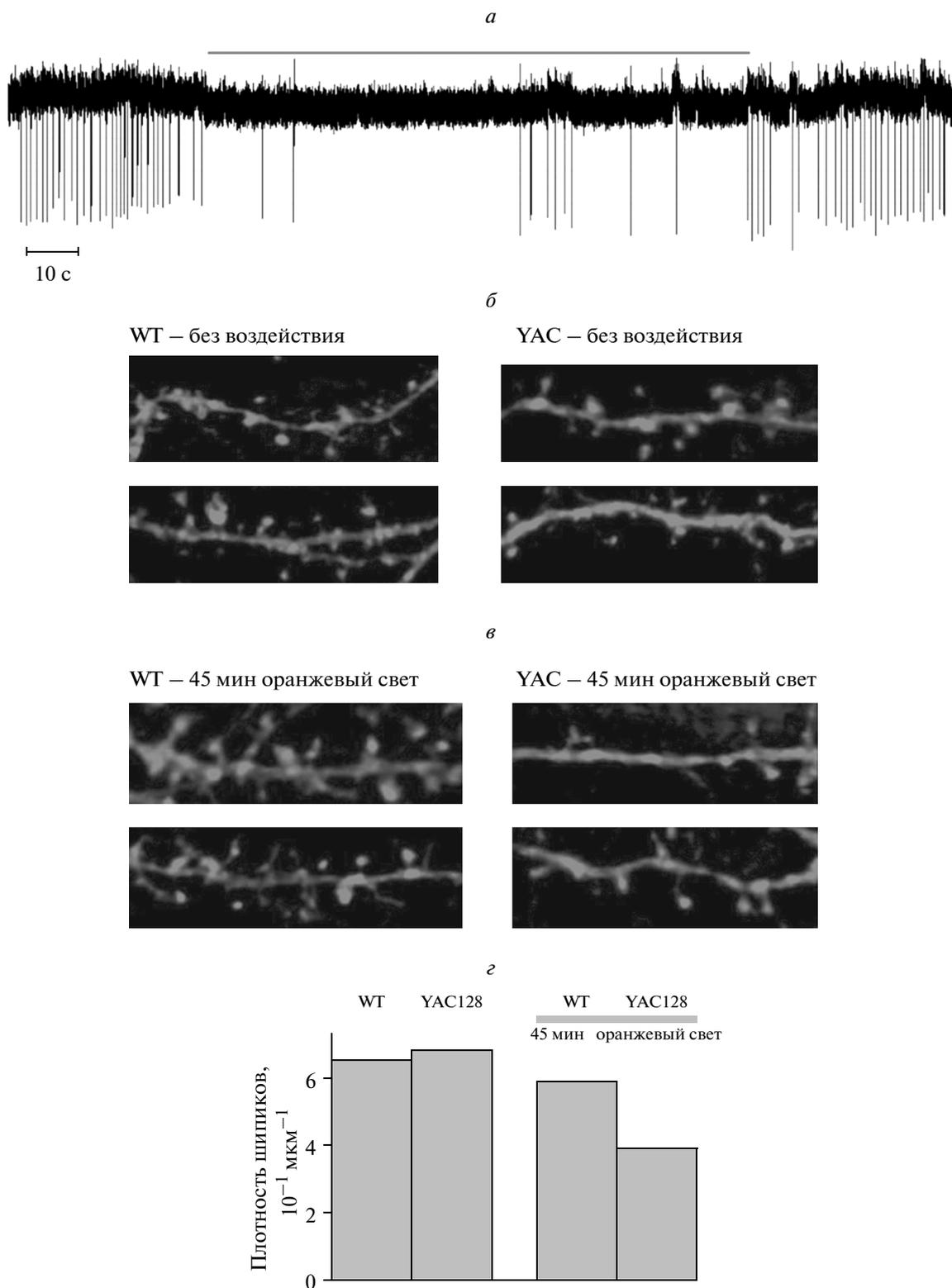


Рис. 6. Морфология шипиков СШН стриатума до и после облучения оранжевым светом. 15 день культивирования. *a* – Ингибирование активности СШН стриатума в результате воздействия оранжевым светом на нейроны коры. *б* – Морфология шипиков СШН стриатума (иммуноцитохимия анти-DARP3-32). *в* – Морфология шипиков СШН стриатума после 45 мин облучения оранжевым светом. *г* – Плотность шипиков.

ОБСУЖДЕНИЕ

БХ вызывается мутацией в гене, кодирующем белок хантингтин. Несмотря на то, что ген *Htt* экспрессируется повсеместно, нейродегенеративные изменения при БХ проявляются прежде всего в стриатуме и – в несколько меньшей степени – в коре. Мы исследовали нарушения кортикостриатных связей в культуре. До настоящего времени не установлено, как именно нарушение активности нейронов коры влияет на дисфункцию и нейродегенерацию СШН стриатума. В настоящей работе мы изучали данное воздействие в созданной смешанной модельной культуре синаптической передачи при БХ. Разработанная *in vitro* модель хорошо подходит для изучения молекулярных механизмов, которые приводят к нарушению синаптической активности при БХ. Данную модель можно рассматривать как удобную систему для определения и валидации мишенной потенциальной терапии при БХ. В такой модели легко использовать какие-либо фармакологические или молекулярные методы для восстановления нарушенных функций.

Показано, что даже при отсутствии какого-либо воздействия на культуру уже на 14–15 день культивирования в кортикальных нейронах в YAC-культурах нарушается спонтанная активность. При этом как в нейронах коры так и в СШН стриатума не выявлено каких-либо морфологических изменений и симптомов нейродегенерации.

Основные симптомы БХ проявляются только в 35–40 лет, что, вероятно, связано с возрастными изменениями в нейронах. В модельной системе в кортикостриатных более длительно культивируемых культурах (19–22 дня) также наблюдаются функциональные нарушения. Действительно, исходная повышенная активность нейронов коры в культуре приводит, по-видимому, к истощению энергетических ресурсов клеток. Начиная с 19 дня культивирования, активность кортикальных нейронов в культуре YAC128 уже понижена по сравнению с культурой дикого типа. Эта измененная активность, в свою очередь, приводит к морфологическим изменениям шипиков СШН стриатума в культуре YAC128. Электрофизиологические данные по спонтанной активности в зависимости от возраста согласуются с аналогичными данными, полученными на срезах мозга модельных животных [29], тогда как изменение соотношения типов шипиков СШН в связи с нарушенной активностью нейронов в кортикостриатной модельной системе БХ описано впервые.

Формирование дендритов является важным этапом в процессе нейрогенеза, обеспечивающим связь нейронов друг с другом и нормальное функционирование нейронных сетей. Дендритное де-

рево представляет собой очень динамичную структуру, с одной стороны, изменяющуюся под действием афферентных сигналов, а с другой, – поддерживаемую постсинаптическими сигналами [30–32]. Морфология шипиков достаточно разнообразна, однако по соотношению размера головки и шейки их можно разделить на три типа: тонкие, грибовидные и пеньковые [33]. Различия в морфологии в настоящее время связывают с силой и зрелостью синапса, формируемого шипиком. Например, показано, что количество AMPA-рецепторов положительно коррелирует с размером головки шипика [34], а при активной работе синапса шипики преимущественно переходят в наиболее стабильную форму – грибовидную [35]. Таким образом, относительное количество грибовидных шипиков характеризует эффективные синаптические связи, а поддержание шипиков этого типа необходимо для нормальной работы нейронных связей. В большом количестве научных работ показано нарушение морфологии дендритов, включая изменения количества шипиков, при развитии различных нейродегенеративных и психических заболеваний [36]. Подобные нарушения наблюдаются и при БХ как в мозге больных, так и при моделировании болезни на животных [37, 38]. Результаты нашей работы позволяют предположить, что повышенная активность кортикальных нейронов приводит к изменению шипиков стриатных нейронов и их элиминации. Таким образом, функциональные нарушения синаптической передачи приводят к трансформации стабильных грибовидных шипиков в тонкие, тем самым показывая, что данное явление может быть одним из проявлений нарушения кортикостриатных связей при БХ.

Методы оптогенетики в последние годы активно используются как для детального выяснения механизмов обучения, формирования памяти, так и для изучения некоторых нейродегенеративных заболеваний [28, 39, 40]. Мы применяли оптогенетическую активацию для точного контроля активности кортикальных нейронов. Подобные эксперименты с электрической стимуляцией, проведенные на живых срезах мозга модельных мышей БХ, показали асинхронность и задержку в ответе нейронов стриатума на стимуляцию коры [41]. В настоящей работе при регистрации ответа на постсинаптической стороне показано, что порог активации СШН в ответ на облучение кортикального нейрона почти в 2 раза выше в YAC128, т.е. необходимо более длительное воздействие светом, или, что то же самое, как видно из рис. 4@б, нужно большее количество потенциалов действия внутри одной пачки в кортикальном нейроне. Интересно, что именно этот параметр раньше всего претерпевает изменения в

культуре YAC (рис. 2), еще до появления каких-либо морфологических признаков дегенерации.

Нарушения синаптической передачи отмечаются задолго до клинических симптомов БХ, поэтому возможность воздействия на механизмы развития этой патологии может иметь большое значение в клинической практике. Вероятными причинами изменений синаптической связи в кортикостриатной системе могут быть нарушения глутаматергических и дофаминергических механизмов передачи сигналов. Действительно, подобные нарушения проявляются достаточно рано и коррелируют с тяжестью симптомов в животных моделях БХ [13]. При этом особенное значение может иметь накопление внутриклеточного кальция в ходе развития заболевания. Показано, что мутантный белок Htt может связываться с InsP3R1, вызывая повышение его активности и приводя к увеличению концентрации кальция внутри нейронов [42]. Накопление кальция может приводить к эксайтотоксичности, причем измененные глутаматергический (от коры) и дофаминергический (от черной субстанции) входы усиливают нейротоксичность. Опираясь на полученные нами данные, можно предположить, что в таких условиях уменьшение площади синаптических связей СШН с нейронами коры (в том числе при преобразовании грибовидных шипиков в тонкие) является адаптивным ответом, снижающим возбуждающее действие глутамата и позволяющим избежать клеточной гибели. На ранних стадиях развития БХ этому препятствует гиперактивность кортикальных нейронов. Однако по мере прогрессирования патологии их спонтанная активность снижается, СШН теряют значительное количество сильных грибовидных шипиков, переводя их в слабые тонкие, что приводит к нарушению синаптической передачи, а значит, и к моторным, и когнитивным нарушениям, характерным для патогенеза БХ.

Таким образом, в нашей работе обнаружены нарушения в синаптической передаче в кортикостриатной культуре модели БХ. Выявлены эффекты воздействия мутантного Htt на активность синаптических связей между нейронами коры и стриатума.

Работа выполнена при поддержке программы “Научные и научно-педагогические кадры инновационной России” на 2009–2013 годы (2012-1.1-12-000-1002-1101 и 2012-1.2.2-12-000-1014-5674), гранта Правительства Российской Федерации для государственной поддержки научных исследований, проводимых под руководством ведущих ученых в российских образовательных учреждениях высшего профессионального образования (№11.G34.31.0056), а также грантов Националь-

ного Института Здоровья США (R01NS056224, R01NS38082 и R01NS074376).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. The Huntington's Disease Collaborative Research Group. 1993. A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosomes. *Cell*. **72** (6), 971–983.
2. Paulsen J.S., Langbehn D.R., Stout J.C., Aylward E., Ross C.A., Nance M., Guttman M., Johnson S., MacDonald M., Beglinger L.J., Duff K., Kayson E., Biglan K., Shoulson I., Oakes D., Hayden M., 2008. Detection of Huntington's disease decades before diagnosis: the Predict-HD study. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*. **79** (8), 874–880.
3. Han I., You Y., Kordower J.H., Brady S.T., Morfini G.A. 2010. Differential vulnerability of neurons in Huntington's disease: the role of cell type-specific features. *J. Neurochem.* **113** (5), 1073–1091.
4. Kremer H.P., Roos R.A., Dingjan G., Marani E., Bots G.T. 1990. Atrophy of the hypothalamic lateral tuberal nucleus in Huntington's disease. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **49** (4), 371–382.
5. Heinsen H., Rüb U., Gangnus D., Jungkunz G., Bauer M., Ulmar G., Bethke B., Schüler M., Böcker F., Eisenmenger W., Götz M., Strik M. 1996. Nerve cell loss in the thalamic centromedian-parafascicular complex in patients with Huntington's disease. *Acta Neuropathologica*. **91** (2), 161–168.
6. Petersen A., Chase K., Puschban Z., DiFiglia M., Brundin P., Aronin N. 2002. Maintenance of susceptibility to neurodegeneration following intrastriatal injections of quinolinic acid in a new transgenic mouse model of Huntington's disease. *Exp. Neurol.* **175** (0014), 297–300.
7. Kassubek J., Landwehrmeyer G.B., Ecker D., Jüengling F.D., Muche R., Schuller S., Weindl A., Peinemann A. 2004. Global cerebral atrophy in early stages of Huntington's disease: quantitative MRI study. *NeuroRept.* **15** (2), 363–365.
8. Petersén A., Gil J., Maat-Schieman M.L.C., Björkqvist M., Tanila H., Araújo I.M., Smith R., Popovic N., Wierup N., Norlén P., Li J.-Y., Roos R.A.C., Sundler F., Mulder H., Brundin P. 2005. Orexin loss in Huntington's disease. *Hum. Mol. Genet.* **14** (1), 39–47.
9. Graybiel A.M., Aosaki T., Flaherty A.W., Kimura M. 1994. The basal ganglia and adaptive motor control. *Science*. **265** (5180), 1826–1831.
10. Bolam J.P., Hanley J.J., Booth P.A., Bevan M.D. 2000. Synaptic organisation of the basal ganglia. *J. Anatomy*. **196** (4), 527–552.
11. Gerfen C.R. 1992. The neostriatal mosaic: multiple levels of compartmental organization in the basal ganglia. *Annu. Rev. Neurosci.* **15** (1), 285–320.
12. Groenewegen H.J. 2003. The basal ganglia and motor control. *Neural Plasticity*. **10** (1–2), 107–120.
13. Miller B.R., Bezprozvanny I. 2010. Corticostriatal circuit dysfunction in Huntington's disease: intersection of glutamate, dopamine and calcium. *Future Neurol.* **5** (5), 735–756.

14. Miller B.R., Walker A.G., Fowler S.C., Von Hörsten S., Riess O., Johnson M.A., Rebec G.V. 2010. Dysregulation of coordinated neuronal firing patterns in striatum of freely behaving transgenic rats that model Huntington's disease. *Neurobiol. Disease*. **37** (1), 106–113.
15. Miller B.R., Walker A.G., Barton S.J., Rebec G.V. 2011. Dysregulated neuronal activity patterns implicate corticostriatal circuit dysfunction in multiple rodent models of Huntington's disease. *Front. Systems Neurosci.* **5** (26). doi: 10.3389/fnsys.2011.00026.
16. Klapstein G.J., Fisher R.S., Zanjani H., Cepeda C., Jokel E.S., Chesselet M.F., Levine M. S. 2001. Electrophysiological and morphological changes in striatal spiny neurons in R6/2 Huntington's disease transgenic mice. *J. Neurophysiol.* **86** (6), 2667–2677.
17. Cepeda C., Wu N., André V.M., Cummings D.M., Levine M.S. 2007. The corticostriatal pathway in Huntington's disease. *Progr. Neurobiol.* **81** (5–6), 253–271.
18. Unschuld P.G., Joel S.E., Liu X., Shanahan M., Margolis R.L., Biglan K.M., Bassett S.S., Schretlen D.J., Redgrave G.W., van Zijl P.C., Pekar J.J., Ross C.A. 2012. Impaired cortico-striatal functional connectivity in prodromal Huntington's Disease. *Neurosci. Lett.* **514** (2), 204–209. doi: 0.1016/j.neulet.2012.02.095.
19. Kaufman A.M., Milnerwood A.J., Sepers M.D., Coquinco A., She K., Wang L., Lee H., Craig A.M., Cynader M., Raymond L.A. 2012. Opposing roles of synaptic and extrasynaptic NMDA receptor signaling in cocultured striatal and cortical neurons. *J. Neurosci.* **32** (12), 3992–4003.
20. Rochefort N.L., Konnerth A. 2012. Dendritic spines: from structure to *in vivo* function. *EMBO Repts.* **13** (8), 699–708.
21. Slow E.J., van Raamsdonk J., Rogers D., Coleman S.H., Graham R.K., Deng Y., Oh R., Bissada N., Hossain S.M., Yang Y.Z. 2003. Selective striatal neuronal loss in a YAC128 mouse model of Huntington disease. *Hum. Mol. Genet.* **12** (13), 1555–1567.
22. Chen X., Wu J., Lvovskaya S., Herndon E., Supnet C., Bezprozvanny I. 2011. Dantrolene is neuroprotective in Huntington's disease transgenic mouse model. *Mol. Neurodegeneration.* **6** (81). doi:10.1186/1750-1326-6-81.
23. Boyden E.S., Zhang F., Bamberg E., Nagel G., Deisseroth K. 2005. *Nat. Neurosci. Millisecond-timescale, genetically targeted optical control of neural activity.* **8** (9), 1263–1268.
24. Jiang M., Chen G. 2006. High Ca²⁺-phosphate transfection efficiency in low-density neuronal cultures. *Nat. Protocols.* **1** (2), 695–700.
25. Rodriguez A., Ehlenberger D.B., Dickstein D.L., Hof P.R., Wearne S.L. 2008. Automated three-dimensional detection and shape classification of dendritic spines from fluorescence microscopy images. *PLoS One.* **3** (4), e1997. doi:10.1371/journal.pone.0001997.
26. Perkins K.L. 2006. Cell-attached voltage-clamp and current-clamp recording and stimulation techniques in brain slices. *J. Neurosci. Meth.* **154** (1–2), 1–18.
27. Peters A., Kaiserman-Abramof I.R. 1970. The small pyramidal neuron of the rat cerebral cortex. The perikaryon, dendrites and spines. *Am. J. Anat.* **127** (4), 321–355.
28. Артамонов Д.Н., Коржова В.В., Власова О.Л., Безprozvanny И.Б. 2013. Оптогенетический подход в исследовании синаптической передачи. *Бюлл. эксп. биологии и медицины* (в печати).
29. Joshi P.R., Wu N.P., André V.M., Cummings D.M., Cepeda C., Joyce J.A., Carroll J.B., Leavitt B.R., Hayden M.R., Levine M.S., Bamford N.S. 2009. Age-dependent alterations of corticostriatal activity in the YAC128 mouse model of Huntington disease. *J. Neurosci.* **29** (8), 2414–2427.
30. Cline H.T. 2001. Dendritic arbor development and synaptogenesis. *Curr. Opin. Neurobiol.* **11** (1), 118–126.
31. Dailey M.E., Smith S.J. 1996. The dynamics of dendritic structure in developing hippocampal slices. *J. Neurosci.* **16** (9), 2983–2994.
32. Niell C.M., Meyer M.P., Smith S.J. 2004. *In vivo* imaging of synapse formation on a growing dendritic arbor. *Nat. Neurosci.* **7** (3), 254–260.
33. Yuste R. 2011. Dendritic spines and distributed circuits. *Neuron.* **71** (5), 772–781.
34. Matsuzaki M., Ellis-Davies G.C., Nemoto T., Miyashita Y., Iino M., Kasai H. 2001. Dendritic spine geometry is critical for AMPA receptor expression in hippocampal CA1 pyramidal neurons. *Nat. Neurosci.* **4** (11), 1086–1092.
35. De Roo M., Klauser P., Mendez P., Poglia L., Muller D. 2008. Activity-dependent PSD formation and stabilization of newly formed spines in hippocampal slice cultures. *Cerebral Cortex.* **18** (1), 151–161.
36. Eiland L., McEwen B. S. 2010. Early life stress followed by subsequent adult chronic stress potentiates anxiety and blunts hippocampal structural remodeling. *Hippocampus.* **22** (1), 82–91.
37. Kaufmann W.E. 1999. Cytoskeletal determinants of dendritic development and function: Implications for mental retardation. *Developmental Neuropsychol.* **16** (3), 341–346.
38. Kulkarni V., Firestein B.L. 2012. The dendritic tree and brain disorders. *Mol. Cell. Neurosci.* **50** (1), 10–20.
39. Covington H.E. 3rd, Lobo M.K., Maze I., Vialou V., Hyman J.M., Zaman S., LaPlant Q., Mouzon E., Ghose S., Tamminga C.A., Neve R.L., Deisseroth K., Nestler E.J. 2010. Antidepressant effect of optogenetic stimulation of the medial prefrontal cortex. *J. Neurosci.* **30** (48), 16082–16090.
40. Gradinaru V., Mogri M., Thompson K.R., Henderson J.M., Deisseroth K. 2009. Optical deconstruction of parkinsonian neural circuitry. *Science.* **324** (5925), 354–359.
41. Nithianantharajah J., Hannan J. 2012. Dysregulation of synaptic proteins, dendritic spine abnormalities and pathological plasticity of synapses as experience-dependent mediators of cognitive and psychiatric symptoms in Huntington's disease. *Neuroscience.* doi: 10.1016/j.neuroscience.2012.05.043.
42. Tang T.S., Tu H., Chan E.Y.W., Maximov A., Wang Z., Wellington C.L., Hayden M.R., Bezprozvanny I. 2003. Huntingtin and huntingtin-associated protein 1 influence neuronal calcium signaling mediated by inositol-(1,4,5) triphosphate receptor type 1. *Neuron.* **39** (2), 227–239.

Characterization of Synaptic Dysfunction in an *In Vitro* Corticostriatal Model System of Huntington's Disease

D. N. Artamonov^{1*}, V. V. Korzhova¹, J. Wu², P. D. Rybalchenko¹, C. Im²,
V. A. Krasnoborova¹, O. L. Vlasova¹, I. B. Bezprozvanny^{1,2}

¹Laboratory of Molecular Neurodegeneration, St. Petersburg Polytechnic University,
ul. Politekhnicheskaya, 29, St. Petersburg, 195251 Russia;

* e-mail: artdmitrii@gmail.com

²Department of Physiology, University of Texas Southwestern Medical Center,
5323 Harry Hines Blvd., Dallas, Texas, 75390 USA

Huntington's disease (HD) is an autosomal-dominant inherited neurodegenerative disease resulting from expanded amino acid (CAG) repeat in the gene that encodes protein huntingtin (Htt). HD remains incurable for now. A lot of evidence implicates aberrant synaptic connection between cortical and striatal neurons, a key component of HD pathophysiology, which also leads to cognitive decline and motor disorders. In the present work synaptic activity between cortical and striatal neurons was studied on the corticostriatal co-culture model system of HD. Culture was prepared from HD mouse model YAC128. It was shown that first impairment appears on day 14 *in vitro*. Interestingly, these alterations occur in cortical neurons. Their activity in YAC128 cultures was higher than in cultures of wild-type neurons. At the same time, there were no differences in morphology of spines in striatal neurons. However, using novel optogenetic approach, we demonstrated that synaptic connections are already dysfunctional in YAC128 cultures. On day 19 *in vitro* the activity of cortical neurons in YAC128 cultures was reduced, which led to alterations on the post-synaptic side. Dendritic spines of medium spiny neurons transformed and disappeared, which is possibly the main reason of neurodegenerative mechanisms during the HD development.