

УДК 577.175.722:612.396.2:612.82:616.894-053.8-092.9

DOI: 10.20538/1682-0363-2017-4-106–115

Для цитирования: Горина Я.В., Комлева Ю.К., Лопатина О.Л., Черных А.И., Салмина А.Б. Влияние инсулинорезистентности на нарушение метаболизма глюкозы в миндалине головного мозга при экспериментальной болезни Альцгеймера. *Бюллетень сибирской медицины*. 2017; 16 (4): 106–115.

## Влияние инсулинорезистентности на нарушение метаболизма глюкозы в миндалине головного мозга при экспериментальной болезни Альцгеймера

Горина Я.В.<sup>1</sup>, Комлева Ю.К.<sup>1</sup>, Лопатина О.Л.<sup>1</sup>, Черных А.И.<sup>2</sup>, Салмина А.Б.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Красноярский государственный медицинский университет (КГМУ) имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого Россия, 660022, г. Красноярск, ул. Партизана Железняка, 1

<sup>2</sup> Красноярская межрайонная клиническая больница № 20 им. И.С. Берзона Россия, 660123, г. Красноярск, ул. Инструментальная, 12А

### РЕЗЮМЕ

**Цель.** В головном мозге метаболизм глюкозы четко регулируется, поэтому его нарушение является важной особенностью нейродегенеративных заболеваний, в частности болезни Альцгеймера. Транспорт глюкозы в мембрану клетки реализуется за счет активности инсулин-регулируемой аминопептидазы (IRAP), которая влияет на память и обучение, и рассматривается как один из ключевых маркеров инсулинорезистентности при болезни Альцгеймера. Однако вопрос о механизме действия IRAP остается открытым. Цель исследования – изучение влияния экспрессии IRAP на клетках нейрональной и глиальной природы, а также совместно с инсулинзависимым глюкозным транспортером (GLUT4) в миндалине головного мозга на эмоциональную память у животных с экспериментальной болезнью Альцгеймера.

**Материал и методы.** Исследование проводили на животных с использованием двух экспериментальных моделей болезни Альцгеймера – инъекционной и генетической. Опытная группа – мыши линии CD1, самцы в возрасте 4 мес, которым билатерально вводили бета-амилоид 1-42 в зону гиппокампа CA1 (*cornu ammonis*) по 1 мкл. Контрольная группа – мыши линии CD1, самцы в возрасте 4 мес, которым билатерально вводили растворитель для бета-амилоида – фосфатно-солевой буфер в зону CA1 по 1 мкл.

Генетическая модель болезни Альцгеймера – мыши линии B6SLJ – Tg(APP<sup>SweFlon</sup>, PSEN1<sup>\*M146L</sup>\*L286V)6799Vas, самцы в возрасте 4 мес. Контрольная группа – мыши линии C57BL/6xSJL, самцы в возрасте 4 мес. Оценку эмоциональной памяти проводили с использованием нейроповеденческого тестирования Fear conditioning. Экспрессию молекул-маркеров инсулинорезистентности в миндалине изучали методом иммуногистохимии с последующей конфокальной микроскопией.

**Результаты.** У животных с экспериментальной моделью болезни Альцгеймера выявлено нарушение ассоциативного обучения и эмоциональной памяти. Выявлено снижение ( $p \leq 0,05$ ) экспрессии IRAP на клетках нейрональной и глиальной природы, а также (совместно с GLUT4) в миндалине головного мозга у животных с экспериментальной болезнью Альцгеймера.

**Заключение.** Уменьшение числа IRAP-иммунопозитивных нейрональных и астроглиальных клеток, а также экспрессии IRAP/GLUT4 в клетках миндалины у животных с экспериментальной моделью болезни Альцгеймера указывает на развитие инсулинорезистентности в миндалине головного мозга, находящейся во взаимосвязи с гиппокампом при осуществлении когнитивных функций и запоминания, сопряженных с эмоционально окрашенными событиями.

**Ключевые слова:** IRAP, GLUT4, эмоциональная память, болезнь Альцгеймера.

✉ Горина Яна Валерьевна, e-mail: yana\_20@bk.ru.

## ВВЕДЕНИЕ

Болезнь Альцгеймера (БА) характеризуется постепенно прогрессирующими деструктивными изменениями в поведении, психическим расстройством и необратимой потерей памяти [1]. Кроме того, наблюдается дисбаланс между провоспалительными и репаративными функциями нейроиммунных клеток микроглии и астроцитов, который влияет на активацию инфламмосом (в частности NLRP3), высвобождение провоспалительных цитокинов и активных форм кислорода, что в свою очередь вызывает повреждение нейронов, синаптическую дисфункцию, в конечном итоге приводя к потере синапсов и гибели нейронов [2].

Известно, что метаболизм глюкозы в головном мозге четко регулируется, поэтому его нарушение является важной особенностью нейродегенеративных заболеваний. Стоит отметить, что гипометаболизм глюкозы наблюдается как у здоровых пожилых людей [3], так и в результате прогрессирования нейродегенеративных расстройств, проявляющихся в снижении когнитивных функций, в частности при БА [4]. При этом развитие гипометаболизма глюкозы предшествует наступлению дефицита памяти, что может служить ранним маркером для прогнозирования прогрессирования заболевания [5].

Стоит отметить, что в последние несколько десятилетий внимание ученых привлекает один из ключевых маркеров инсулинорезистентности при БА – инсулин-регулируемая аминопептидаза (IRAP), однако вопрос о механизме ее действия остается открытым [6, 7]. IRAP локализуется в специализированных везикулах, содержащих чувствительный к инсулину транспортер глюкозы (GLUT4), в нейронах гиппокампа, а также в других областях мозга, таких как гипоталамус, грушевидная извилина, энторинальная кора, гипофиз, обонятельная луковица, неокортекс и миндалина [8], при этом последняя ответственна за реализацию эмоциональной памяти, которая нарушается при БА [9, 10].

Как IRAP, так и GLUT4 транспортируются из везикул к поверхности клетки в ответ на определенные стимулы, в том числе инсулин [11, 12]. Вместе с тем транспорт GLUT4 в мембрану клетки реализуется за счет активности IRAP [13]. GLUT4 вносит существенный вклад в поглощение глюкозы клетками, что необходимо для памяти и реализации когнитивных функций [14]. Аналогичным образом ангиотензин IV влияет на обучение и память, ингибируя активность IRAP

[15]. Так, было показано, что синтезированные 13-членные макроциклические конкурентные ингибиторы IRAP, разработанные путем имитации N-конца окситоцина и вазопрессина, увеличивали синаптическую пластичность при исследовании гиппокампа у крыс [16].

Кроме того установлено, что IRAP присутствует в окситоцин- и вазопрессинергических нейронах гиппокампа, коры головного мозга, таламуса, миндалины и гипоталамуса у пациентов с шизофренией. При этом численная плотность нейронов, экспрессирующих IRAP, в паравентрикулярном и супрахиазматическом ядрах гипоталамуса у больных с данной патологией значительно снижается, что может быть связано с уменьшением числа нейрофизин-содержащих нейронов [17].

Также выявлено, что у животных, дефицитных по IRAP, не наблюдалось проявлений антидепрессивного эффекта после введения окситоцина [18]. В связи с этим актуальным является детальное изучение новых потенциальных молекул-мишеней (IRAP) для фармакологической коррекции хронических нейродегенеративных заболеваний, в частности БА.

Исходя из изложенного, целью настоящей работы явилось изучение влияния экспрессии IRAP на клетках нейрональной и глиальной природы и (совместно с GLUT4) в миндалине головного мозга на эмоциональную память у животных с экспериментальной БА.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Мыши линии CD1, самцы в возрасте 4 мес. Опытная группа (CD1-БА) – введение бета-амилоида 1-42 (Sigma Aldrich, USA) в зону гиппокампа CA1 билатерально по 1 мкл по стереотаксическим координатам согласно атласу [19]: ML  $\pm$  1,3 мм, AP – 2,0 мм, DV – 1,9 мм ( $n = 10$ ). Контрольная группа (ложно-оперированные животные – CD1-ЛО) – введение растворителя для бета-амилоида – фосфатно-солевого буфера (Sigma Aldrich, USA) ( $n = 10$ ).

Животных содержали в клетках при регулярном световом цикле 12 ч день / 12 ч ночь и свободным доступом к воде и корму при постоянной температуре ( $21 \pm 1$ ) °C. Исследования на животных проводили в соответствии с соблюдением принципов гуманности, изложенных в Директиве Европейского сообщества (2010/63/ЕС).

Моделирование болезни Альцгеймера осуществляли интрагиппокампальным введением бета-амилоида по стереотаксическим координатам мозга в зону CA1 по 1 мкл. Бета-амилоид 1-42

растворяли в фосфатно-солевом буфере до концентрации 50 мМ с последующей агрегацией в термостате при 37 °С в течение 7 дней [20]. Оценку признаков и верификацию модели БА осуществляли согласно методике, представленной нами ранее [21].

Генетическая модель БА – мыши линии B6SLJ – Tg(APPSwFlLon, PSEN1\**M146L*\**L286V*)6799Vas, самцы в возрасте 4 мес ( $n = 10$ ). Контрольная группа – мыши линии C57BL/6xSjL, самцы в возрасте 4 мес ( $n = 10$ ). Данные линии мышей получены из The Jackson Laboratory (USA).

Тест Fear conditioning (FC) использовали для исследования консолидации памяти страха и способности животных к ассоциативному обучению [22]. Тестирование осуществляли согласно ранее представленной методике [23]. В каждой сессии оценивали время замирания. Для оценки процесса запоминания нами были введены следующие коэффициенты запоминания (КЗ): в условиях контекста (КЗ<sub>к</sub>) и в присутствии одного из стимулов (ассоциативное запоминание, КЗ<sub>а</sub>), которые рассчитывались по формулам:

$KZ_k = \text{время замирания во 2-й день} / \text{время замирания в 1-й день}$ ,

$KZ_a = \text{время замирания в 3-й день} / \text{время замирания в 1-й день}$ .

Показатель  $KZ \geq 1,0$  свидетельствовал об отсутствии нарушений ассоциативного обучения и эмоциональной памяти у животных.

На 8-й день через 60 мин после тестирования FC осуществляли транскардиальную перфузию 4-м% параформальдегидом (PFA) с последующим забором головного мозга. Мозг фиксировали в 10%-м нейтральном забуференном формалине, после чего погружали в 20%-й раствор сахарозы. С помощью микротомы Thermo Scientific Microm HM 650 изготавливали срезы толщиной 50 мкм. Изучали экспрессию маркеров методом непрямой иммуногистохимии для свободно плавающих срезов [24].

После промывки в PBS срезы блокировали 3-м козьем сывороточным альбумином (GSA) в PBS и 1%-м Triton X-100 в течение 1 ч при комнатной температуре с последующим инкубированием в течение ночи с первичными антителами IRAP (Santa cruz, sc-8481, goat monoclonal) 1:1000, GLUT4 (Abcam, ab654, rabbit monoclonal) 1:1000, NeuN (Abcam, ab90, guinea pig polyclonal) 1:1000, GFAP (Santa cruz, sc-58766, mouse monoclonal) 1:1000 с 3%-м BSA в PBS и 0,2%-м Triton X-100 при 4 °С. После инкубации с первичными антителами срезы промывали и инкубировали со вторичными антителами Alexa Conjugated antibody в

разведении 1:1000 в течение 2 ч при комнатной температуре.

Изображения были получены с помощью конфокального микроскопа Olympus FV 10i. В срезах головного мозга подсчитывали количество экспрессирующих IRAP и GLUT4 клеток нейрональной и астроглиальной природы и на различных уровнях в миндалине. Оценивали пять полей зрения.

Статистическая обработка полученных результатов проводилась с помощью программы Statplus Professional, сборка 5.9.8.5/Core v.5.9.33 методами непараметрической статистики. Сравнение средних осуществляли с помощью *t*-критерия Стьюдента. Различия принимали значимыми при  $p \leq 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ

В ходе исследования особенностей совместной экспрессии маркеров IRAP и GLUT4 в норме и при экспериментальной БА в миндалине головного мозга нами было определено количество нейронов, в которых IRAP колокализован с GLUT4.

Так, у животных с генетической моделью БА (линия Tg 6799) выявлено статистически значимое ( $p = 0,029$ ) сокращение количества клеток IRAP+/GLUT4+ в миндалине ( $13,20 \pm 2,35$ ) по сравнению с животными контрольной группы (линия C57BL/6) ( $29,75 \pm 3,18$ ) (рис. 1, *a* и *b*). Кроме того, при моделировании нейродегенерации (интрагиппокампальное введение бета-амилоида) отмечалось статистически значимое ( $p = 0,031$ ) снижение количества клеток IRAP+/GLUT4+ в миндалине ( $9,34 \pm 1,03$ ) по сравнению с ложно-оперированными животными ( $23,09 \pm 2,01$ ) (рис. 1, *c* и *d*).

При исследовании особенностей экспрессии IRAP на клетках нейрональной и глиальной природы в миндалине головного мозга в норме и при экспериментальной БА было определено количество нейронов и астроцитов, экспрессирующих IRAP. Так, в GFAP-иммунопозитивных астроцитах миндалины головного мозга зафиксированы значимые различия в экспрессии IRAP у животных с генетической моделью БА ( $8,38 \pm 1,05$ ) и контрольной группы ( $13,60 \pm 2,16$ ) ( $p = 0,043$ ) (рис. 2, *a* и *b*). Кроме того, моделирование нейродегенерации вызывало статистически значимое сокращение количества клеток IRAP+/GFAP+ в миндалине ( $5,17 \pm 0,98$ ) по сравнению с ложно-оперированными животными ( $20,09 \pm 3,01$ ) ( $p < 0,001$ ) (рис. 2, *c* и *d*).

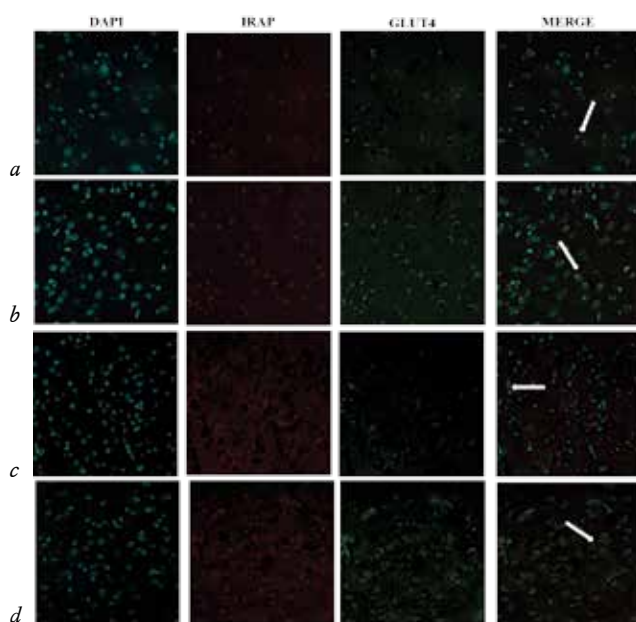


Рис. 1. Двойное иммунофлуоресцентное окрашивание. Экспрессия клеток IRAP+ (красный), клеток GLUT4+ (зеленый), DAPI-ядра (голубой); стрелки в Merge показывают колоколизацию IRAP с GLUT4 в миндалине головного мозга в экспериментальных группах: *a* – животные с генетической моделью болезни Альцгеймера (линия Tg 6799), *b* – контрольная группа (линия C57BL/6), *c* – животные с интрагиппокампулярным введением бета-амилоида, *d* – ложно-оперированные животные. Увеличение  $\times 10$

Fig. 1. Dual immunofluorescence staining. IRAP + cell expression (red), GLUT4 + cells (green), DAPI nucleus (blue), arrows in Merge show the colocalization of IRAP with GLUT4 in the brain amygdala in experimental groups: *a* – animals with a genetic model of Alzheimer's disease (line Tg 6799), *b* – control group (line C57BL/6), *c* – animals with intrahippocampal administration of beta-amyloid, *d* – false-operated animals. Magnification  $\times 10$

Изучая уровень экспрессии IRAP после моделирования БА, нами выявлено статистически значимое снижение экспрессии IRAP в зрелых гранулярных нейронах в миндалине головного мозга ( $9,63 \pm 1,15$ ) по сравнению с ложно-оперированными животными ( $21,75 \pm 3,25$ ) ( $p = 0,019$ ) (рис. 3, *c* и *d*). Вместе с тем у животных с генетической моделью БА также отмечалось статистически значимое снижение экспрессии IRAP в зрелых гранулярных нейронах в миндалине ( $15,05 \pm 3,05$ ) по сравнению с контрольной группой ( $28,25 \pm 4,10$ ) ( $p < 0,001$ ) (рис. 3, *a* и *b*).

Анализ результатов теста Fear conditioning показал, что на протяжении всего периода тестирования у животных с генетической моделью БА наблюдался пролонгированный ответ на неприятные стимулы (звук, ток) и смену обстановки, о чем свидетельствовало статистически значимо более длительное время замирания по сравнению с жи-

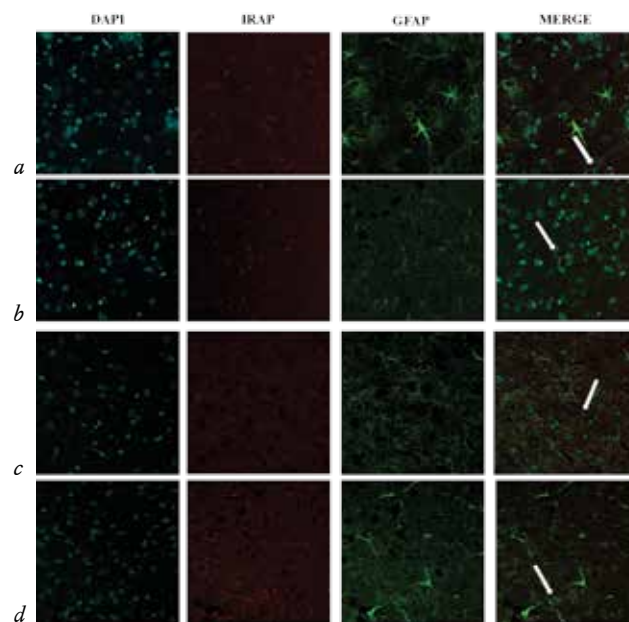


Рис. 2. Двойное иммунофлуоресцентное окрашивание. Экспрессия клеток IRAP+ (красный), клеток GFAP+ (зеленый), DAPI-ядра (голубой); стрелки в Merge показывают колоколизацию IRAP с GFAP в миндалине головного мозга в экспериментальных группах: *a* – животные с генетической моделью болезни Альцгеймера (линия Tg 6799), *b* – контрольная группа (линия C57BL/6), *c* – животные с интрагиппокампулярным введением бета-амилоида, *d* – ложно-оперированные животные. Увеличение  $\times 10$

Fig. 2. Dual immunofluorescence staining. The expression of IRAP + cells (red), GFAP + cells (green), DAPI-nucleus (blue), arrows in Merge show the colocalization of IRAP with GFAP in brain amygdala in experimental groups: *a* – animals with genetic model of Alzheimer's disease (line Tg 6799), *b* – control group (line C57BL / 6), *c* – animals with intrahippocampal administration of beta-amyloid, *d* – false-operated animals. Magnification  $\times 10$

вотными контрольной группы (рис. 4, *a*). При этом на 2-й день тестирования (отсутствие звукового и электрического стимула) у животных с генетической моделью БА время замирания ( $251,67 \pm 8,95$ ) с статистически значимо ( $p < 0,001$ ) снижалось по сравнению с 1-м днем тестирования ( $359,90 \pm 20,16$ ) с, тогда как у животных контрольной группы время замирания за указанный период статистически значимо не изменялось ( $p = 0,225$ ) (рис. 4, *a*), а показатель КЗ<sub>к</sub> у животных контрольной и опытной групп составил  $1,01 \pm 0,10$  и  $0,72 \pm 0,04$  соответственно ( $p = 0,045$ ). Кроме того, время замирания на 3-й день тестирования ( $244,78 \pm 5,21$ ) с у животных с генетической моделью БА в ответ на смену обстановки и подачу звукового сигнала статистически значимо не изменялось ( $p = 0,557$ ) по сравнению с таковым на 2-й день ( $251,67 \pm 8,95$ ). У животных контрольной группы наблюдалась тенденция ( $p =$

0,091) к повышению времени замирания ( $199,50 \pm 17,89$  против  $161,76 \pm 14,46$  на 2-й день) и возвращение его к исходному уровню в 1-й день тестирования ( $195,52 \pm 17,88$ ) с (рис. 4, а). При этом показатель  $KZ_a$  в опытной и контрольной группах составил  $0,70 \pm 0,05$  и  $1,23 \pm 0,18$  соответственно ( $p = 0,035$ ) (рис. 4, а).

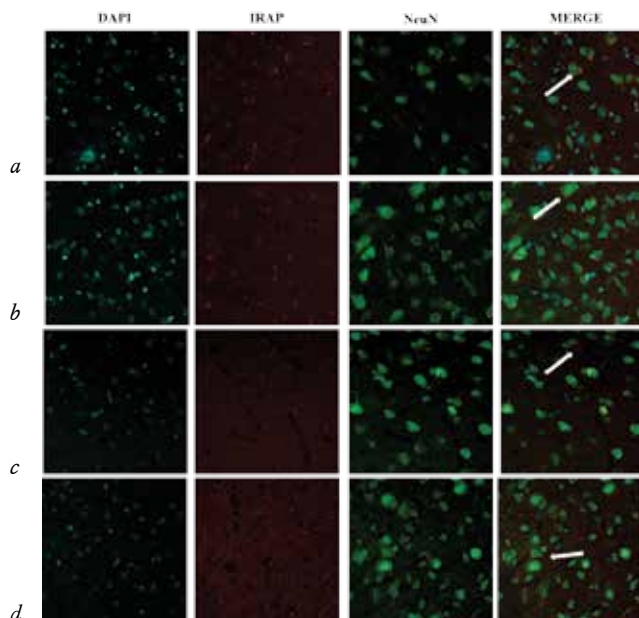


Рис. 3. Двойное иммунофлуоресцентное окрашивание. Экспрессия клеток IRAP+ (красный), клеток NeuN+ (зеленый), DAPI-ядра (голубой); стрелки в Merge показывают колоколлизацию IRAP с NeuN в миндалинах головного мозга в экспериментальных группах: а – животные с генетической моделью болезни Альцгеймера (линия Tg 6799), б – контрольная группа (линия C57BL/6), с – животные с интрагиппокампулярным введением бета-амилоида, д – ложно-оперированные животные. Увеличение  $\times 10$

Fig. 3. Dual immunofluorescence staining. IRAP + cell expression (red), NeuN + cells (green), DAPI nucleus (blue), arrows in Merge show the colocalization of IRAP with NeuN in the brain amygdala in experimental groups: а – animals with a genetic model of Alzheimer’s disease (line Tg 6799), б – control group (line C57BL / 6), с – animals with intrahippocampal administration of beta-amyloid, д – false-operated animals. Magnification  $\times 10$

В совокупности это свидетельствовало о нарушении контекстуальной и долговременной ассоциативной памяти у животных с генетической моделью БА. Поскольку время замирания у ложно-оперированных животных и мышей контрольной группы статистически значимо не отличалось, было целесообразно привести сравнительные данные только по двум группам – у животных с интрагиппокампулярным введением бета-амилоида и ложно-оперированных животных.

Оказалось, что на 2-й день тестирования у животных после моделирования нейродегенера-

ции время замирания ( $52,92 \pm 7,35$ ) статистически значимо ( $p = 0,038$ ) снижалось по сравнению с таковым на 1-й день тестирования ( $89,70 \pm 15,91$ ), тогда как у ложно-оперированных животных время замирания статистически значимо не изменялось ( $p = 0,690$ ) (рис. 4, б). При этом показатель  $KZ_k$  у ложно-оперированных животных и мышей опытной группы составил  $1,55 \pm 0,31$  и  $0,85 \pm 0,15$  соответственно ( $p = 0,024$ ). При этом стоит отметить, что на 3-й день тестирования время замирания ( $113,43 \pm 7,25$ ) с у животных с интрагиппокампулярным введением бета-амилоида

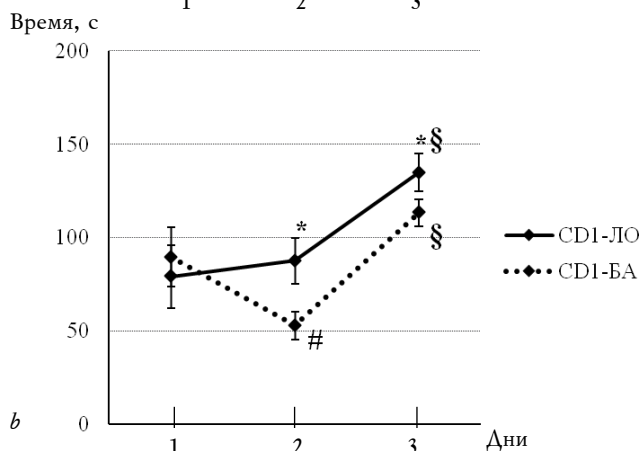
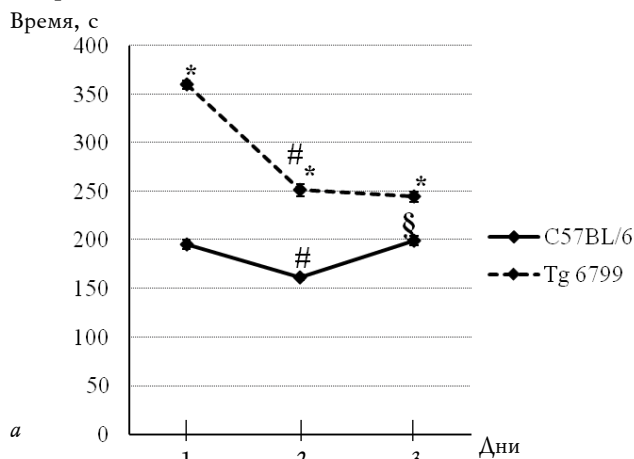


Рис. 4. Результаты нейро-поведенческого тестирования Fear conditioning животных с экспериментальной моделью болезни Альцгеймера: а – время замирания у животных с генетической моделью болезни Альцгеймера, б – время замирания у животных с интрагиппокампулярным введением бета-амилоида

\* сравнение опытной и контрольной группы ( $p \leq 0,05$ ); # – сравнение в группе на 1- и 2-й день тестирования ( $p \leq 0,05$ ); § – сравнение в группе на 2- и 3-й день тестирования ( $p \leq 0,05$ )

Fig. 4. Results of neurobehavioral testing “Fear conditioning” of animals with the experimental model of Alzheimer’s disease: а – time of freezing behaviour in animals with a genetic model of Alzheimer’s disease, б – time of freezing behaviour in animals with intrahippocampal administration of beta-amyloid

\*comparison between the experimental and control group ( $p \leq 0,05$ ); # – comparison on the 1st and 2nd day of testing ( $p \leq 0,05$ ); § – comparison on the 2nd and 3rd day of testing ( $p \leq 0,05$ )

в ответ на смену обстановки и подачу звукового сигнала статистически значимо ( $p < 0,001$ ) увеличилось по сравнению с таковым на 2-й день и соответствовало ( $52,92 \pm 7,35$ ) с (рис. 4, *b*). Аналогичная ситуация наблюдалась и в группе ложно-оперированных животных (рис. 4, *b*). При этом показатель  $KZ_a$  у ложно-оперированных животных и мышей опытной группы составил  $1,92 \pm 0,26$  и  $1,95 \pm 0,30$  соответственно ( $p = 0,937$ ), что указывало на нарушение контекстуальной памяти без видимых деструктивных изменений долговременной ассоциативной памяти у животных после моделирования нейродегенерации.

## ОБСУЖДЕНИЕ

Известно, что некоторые популяции нейронов в головном мозге экспрессируют GLUT4, в частности в гиппокампе и миндалинах, где эти транспортеры глюкозы, вероятно, вовлечены в осуществление когнитивных функций [25]. Экспрессия GLUT4 в нейронах головного мозга, с одной стороны, характеризует эффективность инсулин-опосредованной регуляции транспорта глюкозы [26], с другой стороны, является объектом контроля со стороны IRAP.

В представленном исследовании выявлено, что нейротоксическое действие интрагиппокампально введенного бета-амилоида вызывает снижение уровня IRAP на клетках нейрональной и глиальной природы, а также уменьшение количества клеток IRAP+/GLUT4+ (нейронов) в миндалине головного мозга. Аналогичная ситуация наблюдалась и у животных с генетической моделью БА.

Группой зарубежных ученых было показано, что у мышей, дефицитных по IRAP, выявлены слабо выраженные фенотипические признаки, а также значительно снижен уровень GLUT4 в жировой и мышечной ткани (до 80%), что в свою очередь приводит к снижению поглощения клетками глюкозы [27]. Это может служить объяснением того, что снижение уровня IRAP вызывает уменьшение экспрессии GLUT4 [28].

Установлено, что у животных с генетической моделью БА на начальной стадии развития заболевания наблюдалось нарушение контекстуальной и долговременной ассоциативной памяти, тогда как после моделирования нейродегенерации выявлялось нарушение контекстуальной памяти без видимых деструктивных изменений долговременной ассоциативной памяти.

H.R. Yeatman и соавт. было показано, что у IRAP-нокаутных мышей в 3-месячном возрасте

наблюдался значительный дефицит пространственной памяти, а также распознавания объекта на фоне отсутствия нарушений оперативной памяти, что указывает на значительную роль IRAP в постнатальном развитии мозга и нормальном функционировании гиппокампа во взрослом возрасте [29].

Как известно, ангиотензин IV (AngIV) – пептид ренин-ангиотензиновой системы, принимает участие в регуляции нескольких функций мозга – обучение, память, эмоциональный ответ и обработка сенсорной информации [30]. Группа зарубежных ученых синтезировала серию молекул ангиотензина IV на основе соединений, которые являются метаболически стабильными, проникают через гематоэнцефалический барьер и предназначены для взаимодействия с IRAP, что в свою очередь дает возможность предотвратить негативные последствия развития нейродегенеративных заболеваний, в частности БА [31]. Показано, что у мышей, получавших холестерол-содержащую диету, обнаруживалась дисрегуляция ренин-ангиотензиновой системы в головном мозге [32] и снижался уровень цитоскелет-ассоциированного белка (Arc) – ключевого белка, участвующего в процессах консолидации памяти [33]. Данный патологический процесс регистрировали также в головном мозге при БА [32].

Таким образом, полученные нами данные об изменении поведенческого (эмоционального) статуса животных с экспериментальной моделью БА в совокупности с новыми данными о снижении экспрессии IRAP и GLUT4 в клетках миндалины подтверждает гипотезу о роли IRAP/GLUT4-опосредованных механизмов в нарушении сложных форм поведения при экспериментальной БА. Наиболее простым вариантом такого механизма может являться торможение транспорта глюкозы и развитие локального гипометаболизма глюкозы в ткани миндалины. Не менее интересным предполагаемым механизмом может быть также нарушение рецепции ангиотензина IV – лиганда IRAP – в ткани миндалины, что требует дополнительного экспериментального подтверждения.

В целом полученные нами результаты открывают потенциальную роль IRAP-контролируемого транспорта глюкозы в клетках миндалины головного мозга в развитии эмоциональных расстройств при хронической нейродегенерации Альцгеймеровского типа.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Снижение экспрессии IRAP на нейронах и астроцитах, а также IRAP/GLUT4 в клетках

миндалины у животных с экспериментальной моделью БА свидетельствует о развитии инсулинорезистентности в миндалине головного мозга, находящейся в тесной взаимосвязи с гиппокампом при реализации когнитивных функций и запоминания, сопряженных с эмоциональной окраской событий, что дает ценную информацию для разработки новых стратегий в терапии нейродегенеративных заболеваний, как было предложено ранее [34].

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ И ВКЛАД АВТОРОВ

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи, и сообщают о вкладе авторов. Горина Я.В. – интерпретация данных иммуногистохимического исследования. Комлева Ю.К. – разработка концепции и дизайна эксперимента. Лопатина О.Л. – интерпретация данных нейроповеденческого тестирования. Черных А.И. – анализ данных нейроповеденческого тестирования и иммуногистохимического исследования. Салмина А.Б. – проверка критически важного интеллектуального содержания и окончательное утверждение для публикации рукописи.

## ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при поддержке гранта Президента РФ для государственной поддержки ведущих научных школ РФ (НШ-10241.2016.7).

## СООТВЕТСТВИЕ ПРИНЦИПАМ ЭТИКИ

Исследования на животных проводились с соблюдением принципов гуманности, которые изложены в Директиве Европейского сообщества (2010/63/ЕС). Исследование одобрено на заседании биоэтической комиссии по работе с животными при локальном этическом комитете ФГБОУ ВО «Красноярский государственный медицинский университет им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого» Минздрава России (выписка из протокола № 20 от 7 октября 2015 г.).

## ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Hane F.T., Robinson M., Lee B.Y., Bai O., Leonenko Z., Albert M.S. Recent Progress in Alzheimer's Disease Research, Part 3: Diagnosis and Treatment // *J. Alzheimers Dis.* 2017; 57 (3): 645–665. DOI: 10.3233/jad-160907.
- Schain M., Kreisl W.C. Neuroinflammation in Neurodegenerative Disorders-a Review // *Curr. Neurol. Neurosci. Rep.* 2017; 17 (3): 25. DOI: 10.1007/s11910-017-0733-2.
- Nugent S., Castellano C.A., Bocki C., Dionne I., Fulop T., Cunnane S.C. Relationship of metabolic and endocrine parameters to brain glucose metabolism in older adults: do cognitively-normal older adults have a particular metabolic phenotype? // *Biogerontology.* 2016; 17 (1): 241–255. DOI: 10.1007/s10522-015-9595-7.
- Riepe M.W., Walther B., Vonend C., Beer A.J. Drug-induced cerebral glucose metabolism resembling Alzheimer's Disease: a case study // *BMC Psychiatry.* 2015; 15: 157. DOI: 10.1186/s12888-015-0531-9.
- Calsolaro V., Edison P. Alterations in Glucose Metabolism in Alzheimer's Disease // *Recent. Pat. Endocr. Metab. Immun. Drug. Discov.* 2016; 10 (1): 31–39.
- Yeatman H., Albiston A., Chai S. Insulin-regulated aminopeptidase in astrocytes: Role in Alzheimer's disease? // *Alzheimer's & Dementia: The Journal of the Alzheimer's Association.* 2011; 7 (4): 668.
- Keller S.R., Scott H.M., Mastick C.C., Aebersold R., Lienhard G.E. Cloning and characterization of a novel insulin-regulated membrane aminopeptidase from Glut4 vesicles // *J. Biol. Chem.* 1995; 270 (40): 23612–23618.
- Bernstein H.G., Myller S., Dobrowolny H., Wolke C., Lendeckel U., Bukowska A., Keilhoff G., Becker A., Trübner K., Steiner J., Bogerts B. Insulin-regulated aminopeptidase immunoreactivity is abundantly present in human hypothalamus and posterior pituitary gland, with reduced expression in paraventricular and suprachiasmatic neurons in chronic schizophrenia // *Eur. Arch. Psychiatry Clin. Neurosci.* 2016. DOI: 10.1007/s00406-016-0757-7. [Epub ahead of print].
- Li X., Wang H., Tian Y., Zhou S., Li X., Wang K., Yu Y. Impaired White Matter Connections of the Limbic System Networks Associated with Impaired Emotional Memory in Alzheimer's Disease // *Front Aging Neurosci.* 2016; 8: 250. DOI: 10.3389/fnagi.2016.00250.
- McDonald A.J., Mott D.D. Functional neuroanatomy of amygdalohippocampal interconnections and their role in learning and memory // *J. Neurosci. Res.* 2017; 95 (3): 797–820. DOI: 10.1002/jnr.23709.
- Chen Y., Lippincott-Schwartz J. Selective visualization of GLUT4 storage vesicles and associated Rab proteins using IRAP-pHluorin // *Methods Mol. Biol.* 2015; 1298: 173–179. DOI: 10.1007/978-1-4939-2569-8\_14.
- Fernando R.N., Albiston A.L., Chai S.Y. The insulin-regulated aminopeptidase IRAP is colocalised with GLUT4 in the mouse hippocampus – potential role in modulation of glucose uptake in neurones? // *Eur. J. Neurosci.* 2008; 28: 588–598. DOI: 10.1111/j.1460-9568.2008.06347.x.
- Yeh T.Y., Sbodio J.I., Tsun Z.Y., Luo B., Chi N.W. Insulin-stimulated exocytosis of GLUT4 is enhanced by IRAP and its partner tankyrase // *Biochem. J.* 2007; 402 (2): 279–290. DOI: 10.1042/bj20060793.
- Shah K., Desilva S., Abbruscato T. The role of glucose transporters in brain disease: diabetes and Alzheimer's Disease // *Int. J. Mol. Sci.* 2012; 13 (10): 12629–12655. DOI: 10.3390/ijms131012629.

15. Albiston A.L., Diwakarla S., Fernando R.N., Mountford S.J., Yeatman H.R., Morgan B., Pham V., Holien J.K., Parker M.W., Thompson P.E., Chai S.Y. Identification and development of specific inhibitors for insulin-regulated aminopeptidase as a new class of cognitive enhancers // *Br. J. Pharmacol.* 2011; 164 (1): 37–47. DOI: 10.1111/j.1476-5381.2011.01402.x.
16. Diwakarla S., Nylander E., Grönbladh A., Vanga S.R., Khan Y.S., Gutiérrez-de-Terán H., Ng L., Pham V., Sävmarker J., Lundbäck T., Jenmalm-Jensen A., Andersson H., Engen K., Rosenström U., Larhed M., Ekvist J., Chai S.Y., Hallberg M. Binding to and Inhibition of Insulin-Regulated Aminopeptidase by Macrocyclic Disulfides Enhances Spine Density // *Mol. Pharmacol.* 2016; 89 (4): 413–424. DOI: 10.1124/mol.115.102533.
17. Bernstein H.G., Müller S., Dobrowolny H., Wolke C., Lendeckel U., Bukowska A., Keilhoff G., Becker A., Trübner K., Steiner J., Bogerts B. Insulin-regulated aminopeptidase immunoreactivity is abundantly present in human hypothalamus and posterior pituitary gland, with reduced expression in paraventricular and suprachiasmatic neurons in chronic schizophrenia // *Eur. Arch Psychiatry Clin Neurosci.* 2016. DOI: 10.1007/s00406-016-0757-7. [Epub ahead of print].
18. Loyens E., De Bundel D., Demaegdt H., Chai S.Y., Vanderheyden P., Michotte Y., Gard P., Smolders I. Antidepressant-like effects of oxytocin in mice are dependent on the presence of insulin-regulated aminopeptidase // *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 2013; 16 (5): 1153–11563. DOI: 10.1017/s1461145712001149.
19. Paxinos G., Franklin K.B.J. *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates: Compact Second Edition.* San Diego, CA: Academic Press, 2012: 360.
20. Epelbaum S., Youssef I., Lacor P.N., Chaurand P., Duplus E., Brugg B., Duyckaerts C., Delatour B. Acute amnesic encephalopathy in amyloid- $\beta$  oligomer-injected mice is due to their widespread diffusion *in vivo* // *Neurobiol Aging.* 2015; 36 (6): 2043–2052. DOI: 10.1016/j.neurobiolaging.2015.03.005.
21. Комлева Ю.А., Малиновская Н.А., Горина Я.В., Лопатина О.Л., Волкова В.В., Салмина А.Б. Экспрессия молекул CD38 и CD157 в олифакторных луковицах головного мозга при экспериментальной болезни Альцгеймера // *Сибирское медицинское обозрение.* 2015; 95 (5): 45–49.
22. Komleva Ju.K., Malinovskaia N.A., Gorina Ja.V., Lopatina O.L., Volkova V.V., Salmina A.B. Ehkspressiya molekul CD38 i CD157 v ol'faktornykh lukovicach golovnogo mozga pri ehksperimental'noj bolezni Al'cgejmera [Expression of CD38 and CD157 molecules in the olfactory bulb of the brain in experimental Alzheimer's disease] // *Sibirskoe medicinskoe obozrenie – Siberian Medical Review.* 2014; 5: 45–49 (in Russian).
23. Lugo J.N., Smith G.D., Holley A.J. Trace fear conditioning in mice // *J. Vis. Exp.* 2014; Mar 20 (85). DOI: 10.3791/51180.
24. Горина Я.В., Комлева Ю.К., Лопатина О.Л., Волкова В.В., Черных А.И., Шабалова А.А., Семенчуков А.А., Оловянникова Р.Я., Салмина А.Б. Батарея тестов для поведенческого фенотипирования стареющих животных в эксперименте // *Успехи геронтологии.* 2017; 130 (1): 49–56.
25. Gorina Ja.V., Komleva Ju.K., Lopatina O.L., Volkova V.V., Chernyh A.I., Shabalova A.A., Semenchukov A.A., Olovjannikova R.Ja., Salmina A.B. Batateja testov dlja povedencheskogo fenotipirovanija starejushhih zhivotnyh v jeksperimente [The battery of tests for behavioral phenotyping of aging animals in the experiment] // *Uspehi gerontologii – Successes of Gerontology.* 2017; 1: 49–56 (in Russian).
26. Encinas J.M., Enikolopov G. Identifying and Quantitating Neural Stem and Progenitor Cells in the Adult Brain // *Methods Cell Biol.* 2008; 85 (1): 243–272. DOI: 10.1016/s0091-679x(08)85011-x.
27. Jurcovicova J. Glucose transport in brain – effect of inflammation // *Endocr Regul.* 2014; 48 (1): 35–48.
28. Vannucci S.J., Koehler-Stec E.M., Li K., Reynolds T.H., Clark R., Simpson I.A. GLUT4 glucose transporter expression in rodent brain: effect of diabetes // *Brain Res.* 1998; 797 (1): 1–11.
29. Keller S.R., Davis A.C., Clairmont K.B. Mice deficient in the insulin-regulated membrane aminopeptidase show substantial decreases in glucose transporter GLUT4 levels but maintain normal glucose homeostasis // *J. Biol. Chem.* 2002; 277 (20): 17677–17686. DOI: 10.1074/jbc.M202037200.
30. Jordens I., Molle D., Xiong W., Keller S.R., McGraw T.E. Insulin-regulated aminopeptidase is a key regulator of GLUT4 trafficking by controlling the sorting of GLUT4 from endosomes to specialized insulin-regulated vesicles // *Mol. Biol. Cell.* 2010; 21 (12): 2034–2044. DOI: 10.1091/mbc.E10-02-0158.
31. Yeatman H.R., Albiston A.L., Burns P., Chai S.Y. Forebrain neurone-specific deletion of insulin-regulated aminopeptidase causes age related deficits in memory // *Neurobiol Learn Mem.* 2016; 136: 174–182. DOI: 10.1016/j.nlm.2016.09.017.
32. Xu B., Li H. Brain mechanisms of sympathetic activation in heart failure: Roles of the renin-angiotensin system, nitric oxide and pro-inflammatory cytokines (Review) // *Mol. Med. Rep.* 2015; 12(6): 7823–7829. DOI: 10.3892/mmr.2015.4434.
33. Wright J.W., Kawas L.H., Harding J.W. The development of small molecule angiotensin IV analogs to treat Alzheimer's and Parkinson's diseases // *Prog Neurobiol.* 2015; 125: 26–46. DOI: 10.1016/j.pneurobio.2014.11.004.
34. Mateos L., Ismail M.A., Gil-Bea F.J., Leoni V., Winblad B., Björkhem I., Cedazo-Munguez A. Upregulation of brain renin angiotensin system by 27-hydroxycholesterol in Alzheimer's disease // *J. Alzheimers Dis.* 2011; 24 (4): 669–679. DOI: 10.3233/jad-2011-101512.
35. Mateos L., Akterin S., Gil-Bea F.J., Spulber S., Rahman A., Björkhem I., Schultzberg M., Flores-Morales A., Ce-



dazo-Mnnguez A. Activity-regulated cytoskeleton-associated protein in rodent brain is downregulated by high fat diet in vivo and by 27-hydroxycholesterol in vitro // *Brain Pathol.* 2009; 19 (1): 69–80. DOI: 10.1111/j.1750-3639.2008.00174.x.

36. Chai S.Y., Yeatman H.R., Parker M.W., Ascher D.B., Thompson P.E., Mulvey H.T., Albiston A.L. Development of cognitive enhancers based on inhibition of insulin-regulated aminopeptidase // *BMC Neurosci.* 2008; 9 Suppl 2: S14. DOI: 10.1186/1471-2202-9-S2-S14.

Поступила в редакцию 05.05.2017

Утверждена к печати 08.11.2017

**Горина Яна Валерьевна**, канд. фарм. наук, доцент, кафедра биохимии с курсами медицинской, фармацевтической и токсикологической химии, КГМУ имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого, г. Красноярск.

**Комлева Юлия Константиновна**, канд. мед. наук, доцент, кафедра биохимии с курсами медицинской, фармацевтической и токсикологической химии, КГМУ имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого, г. Красноярск.

**Лопатина Ольга Леонидовна**, канд. биол. наук, доцент, кафедра биохимии с курсами медицинской, фармацевтической и токсикологической химии, КГМУ имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого, г. Красноярск.

**Черных Анатолий Игоревич**, врач-хирург, Красноярская межрайонная клиническая больница № 20 имени И.С. Берзона, г. Красноярск.

**Салмина Алла Борисовна**, д-р мед. наук, профессор, зав. кафедрой биохимии с курсами медицинской, фармацевтической и токсикологической химии, руководитель НИИ молекулярной медицины и патобиохимии, КГМУ имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого, г. Красноярск.

(✉) Горина Яна Валерьевна, e-mail: yana\_20@bk.ru.

УДК 577.175.722:612.396.2:612.82:616.894-053.8-092.9

DOI: 10.20538/1682-0363-2017-4-106–115

For citation: Gorina Ya.V., Komleva Yu.K., Lopatina O.L., Chernykh A.I., Salmina A.B. The effect of insulin resistance on amygdale glucose metabolism alterations in experimental Alzheimer's disease. *Bulletin of Siberian Medicine.* 2017; 16 (4): 106–115.

## The effect of insulin resistance on amygdale glucose metabolism alterations in experimental Alzheimer's disease

Gorina Ya.V.<sup>1</sup>, Komleva Yu.K.<sup>1</sup>, Lopatina O.L.<sup>1</sup>, Chernykh A.I.<sup>2</sup>, Salmina A.B.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Krasnoyarsk State Medical University (KSMU) named after Prof. V.F. Voino-Yasenetsky 1, Partizan Zheleznyak Str., Krasnoyarsk, 660022, Russian Federation

<sup>2</sup> Krasnoyarsk Interdistrict Clinical Hospital № 20 named after I.S. Berzon 12A, Instrumental Str., Krasnoyarsk, 660123, Russian Federation

### ABSTRACT

**Purpose.** Glucose metabolism is tightly regulated in the brain. Aberrant glucose metabolism is an important feature of neurodegenerative diseases, as in Alzheimer's disease. The transport of glucose to the cell membrane is realized through the activity of insulin-regulated aminopeptidase (IRAP) which controls transfer of glucose transporter to the plasma membrane. IRAP is considered as one of the key markers of insulin resistance in Alzheimer's disease. However, the question of the mechanism of the action of the IRAP remains open. The aim of the study was to study the effect of IRAP expression on cells of the neuronal and glial lineage, glucose transporter (GLUT4) expression in the brain amygdala on emotional memory in animals with experimental Alzheimer's disease.

**Materials and methods.** The study was performed with two experimental models of Alzheimer's disease in mice. The experimental group was mice of the CD1 line, males aged 4 months (Alzheimer's disease model with the intra-hippocampal administration of beta-amyloid 1-42 (1 µl) bilaterally in the CA1 area). The control

group was mice of the CD1 line, males aged 4 months (sham-operated animals with the intrahippocampal administration of Phosphate buffered saline (1  $\mu$ l) bilaterally in the CA1). The genetic model of Alzheimer's disease is the B6SLJ-Tg line mice (APP<sup>SwF1L</sup>on, PSEN1\*<sup>M146L</sup>\*<sup>L286V</sup>) 6799Vas, males aged 4 months. The control group consisted of C57BL/6xSJL mice, males aged 4 months. Evaluation of emotional memory was carried out using "Fear conditioning" protocol. Expression of molecule-markers of insulin-resistance in the amygdala was studied by immunohistochemistry followed by confocal microscopy.

**Results.** Aberrant associative learning and emotional memory was revealed in animals with an experimental model of Alzheimer's disease. A decrease ( $p \leq 0,05$ ) of IRAP expression on cells of neuronal and glial nature, associated with GLUT4 down-regulation was detected in amygdala of brain in animals with experimental Alzheimer's disease.

**Conclusion.** Decreased number of IRAP-immunopositive neuronal and astroglial cells, as well as IRAP+/GLUT4+ in cells of amygdala in animals with an experimental model of Alzheimer's disease, indicates the development of insulin resistance in amygdala of brain, which was in correlation with the hippocampus in performing cognitive functions and memorizing associated with emotionally colored events.

**Key words:** IRAP, GLUT4, emotional memory, Alzheimer's disease.

Received May 05.2017  
Accepted November 08.2017

**Gorina Yana V.**, PhD, Associate Professor, Department of Biological Chemistry with Courses of Medical, Pharmaceutical and Toxicological Chemistry, KSMU named after Prof. V.F. Voino-Yasenetsky, Krasnoyarsk, Russian Federation.

**Komleva Yuliya K.**, PhD, Associate Professor, Department of Biological Chemistry with Courses of Medical, Pharmaceutical and Toxicological Chemistry, KSMU named after Prof. V.F. Voino-Yasenetsky, Krasnoyarsk, Russian Federation.

**Lopatina Ol'ga L.**, PhD, Associate Professor, Department of Biological Chemistry with Courses of Medical, Pharmaceutical and Toxicological Chemistry, KSMU named after Prof. V.F. Voino-Yasenetsky, Krasnoyarsk, Russian Federation.

**Chernykh Anatolii I.**, Surgeon, Krasnoyarsk Clinical Hospital No 20 named after I.S. Berzona, Krasnoyarsk, Russian Federation.

**Salmina Alla B.**, DM, Professor, Head of the Department of Biological Chemistry with Courses of Medical, Pharmaceutical and Toxicological Chemistry, Head of the Research Institute of Molecular Medicine and Pathological Biochemistry, KSMU named after Prof. V.F. Voino-Yasenetsky, Krasnoyarsk, Russian Federation.

(✉) **Gorina Yana V.**, e-mail: yana\_20@bk.ru.