

На правах рукописи

Панина Юлия Анатольевна

**КЛЕТОЧНО-МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ
НЕЙРОВОСПАЛЕНИЯ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ АУТИЗМЕ**

14.03.03 – патологическая физиология

03.03.04 - клеточная биология, цитология, гистология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Томск – 2016

Работа выполнена в Государственном бюджетном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В. Ф. Войно-Ясенецкого» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научные руководители:

доктор медицинских наук, профессор

**Салмина Алла
Борисовна**

доктор медицинских наук

**Малиновская Наталия
Александровна**

Официальные оппоненты:

доктор медицинских наук, профессор, ведущий научный сотрудник Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний» (г. Кемерово)

**Григорьев Евгений
Валерьевич**

доктор медицинских наук, профессор, руководитель лаборатории иммунологии Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт экспериментальной и клинической медицины» (г.Новосибирск)

**Трунов Александр
Николаевич**

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт физиологии им. И.П. Павлова Российской академии наук» (г. Санкт-Петербург)

Защита состоится “ ___ ” _____ 2016 г. в ___ часов на заседании диссертационного совета Д 208.096.01 при ГБОУ ВПО СибГМУ Минздрава России по адресу: 634050, г. Томск, ул. Московский тракт 2, (3822) 53-04-23.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ГБОУ ВПО СибГМУ Минздрава России.

Автореферат разослан “ ___ ” _____ 2016 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета

Петрова Ирина Викторовна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. В настоящее время все большее распространение получают нарушения развития головного мозга, которые имеют свои истоки в эмбриогенезе или раннем детстве, причем неблагоприятные факторы, оказывающие влияние на человека в детстве или юности, могут существенным образом исказить нормальный ход развития мозга и привести к патологии многие годы спустя. Нарушения клеточно-молекулярных механизмов развития головного мозга в пренатальном и раннем детском периодах приводят к выраженным поведенческим нарушениям в социальной и несоциальной сфере, что имеет своим результатом нарушение социализации и коммуникации человека (Салмина А.Б. и др., 2012; Vale T. et al. 2010).

Примером такого рода патологии являются расстройства аутистического спектра, которые представляют собой глобальную социально значимую проблему здравоохранения. Так, в 2012 году в мире, в среднем, на 10000 человек приходилось 62 случая аутизма (Andres C., 2002, Elsabbagh M. et al., 2012). С начала 80-х годов XX столетия отмечается выраженный рост заболеваемости в развитых странах, что связано как с улучшением методов диагностики (Newschaffer C.J. et al., 2007), так и с влиянием новых, пока не изученных факторов (Rutter M., 2005). В настоящее время много исследований направлено на поиск генетических предикторов развития РАС. При этом не отрицается роль факторов внешней среды, а так же нарушение центральной секреции окситоцина. Ввиду отсутствия единого мнения о патогенезе аутизма, нет и эффективной патогенетической терапии. Рост заболеваемости, наличие расстройств психики, требующих постоянного ведения пациента, высокая частота задержки умственного развития у пациентов требуют более глубокого изучения данной проблемы, понимания ее причин, механизмов развития и разработки новых подходов к терапии.

Степень разработанности темы исследования

Важным компонентом патогенеза аутизма может быть нейровоспаление, роль которого в развитии заболеваний аутистического спектра находит все больше экспериментальных и клинических подтверждений, однако по-прежнему остается

наименее изученным механизмом нарушений развития головного мозга. Вместе с тем, роль нейровоспаления не оспаривается при других патологических состояниях в центральной нервной системе, в частности, при ишемическом повреждении или нейродегенерации. Более того, появляются единичные данные о некотором сходстве в патогенезе нейродегенеративных заболеваний и нарушения развития головного мозга, что связывают с особенностями экспрессии амилоида, обмена холестерина, нарушения нейрогенеза (Zeidan-Chulia F. et al., 2014). Изучение механизмов развития нейровоспаления при аутизме поможет не только идентифицировать новые молекулы-маркеры и молекулы-мишени для диагностики и терапии этого заболевания, но и расширит существующие представления о развитии головного мозга, патогенезе нейродегенерации. В целом, изучение механизмов нейровоспаления остается актуальным вопросом патологической физиологии, клеточной биологии, нейробиологии, неврологии и психиатрии.

Цель исследования - выявить клеточно-молекулярные механизмы нарушения сложных форм поведения и памяти при экспериментальном аутизме.

Задачи исследования:

1. Провести фенотипирование животных с экспериментальной моделью аутизма по параметрам сложных форм поведения, запоминания, уровню окситоцина в отдельных регионах головного мозга.
2. Изучить особенности развития апоптоза, экспрессии молекул-маркеров нейровоспаления (CD11 β , CD18, CD38, CD157, NLRP3, HMGB1, IL-1 β и синаптогенеза (PSD95) в аффектированных регионах головного мозга (гиппокамп, кора, миндалина) при экспериментальном аутизме и в контроле на 5, 15, 25, 60 и 90 сутки развития; сравнить полученные данные с экспрессией NLRP3, CD38, CD157 и IL-1 β при нейродегенерации (экспериментальная болезнь Альцгеймера).
3. Выявить взаимосвязи между экспрессией NLRP3, HMGB1, IL-1 β при экспериментальном аутизме во взаимосвязи с признаками активации микроглии, развитием нейроповеденческих расстройств; дополнить существующие представления о роли нейровоспаления в развитии головного мозга в (пато)физиологических условиях.

Научная новизна исследования

1. Впервые изучены особенности экспрессии молекул-маркеров нейровоспаления (CD11 β , CD18, CD38, CD157, NLRP3, HMGB1, IL-1 β) синаптогенеза (PSD95) в раннем онтогенезе при экспериментальном аутизме в сравнении с физиологическим развитием головного мозга и при нейродегенерации, установлены регион-специфические изменения в головном мозге при развитии экспериментального аутизма, в том числе в сравнении с моделью нейровоспаления при хронической нейродегенерации.

2. Впервые продемонстрировано нарушение центральной секреции окситоцина у животных при экспериментальном аутизме, индуцированном введением вальпроевой кислоты, преимущественно в гипоталамусе и гипофизе на ранних сроках развития патологии, в миндалинах – в отдаленном периоде.

3. Впервые представлены данные о возможности HMGB1-индуцируемого формирования инфламмосом NLRP3 и продукции IL-1 β в ткани головного мозга при экспериментальном аутизме, а также в физиологических условиях и при нейродегенерации альцгеймеровского типа.

4. Впервые обнаружены новые доказательства роли активированных клеток микроглии в патогенезе экспериментального аутизма, установлено, что для животных с аутизмом характерен реактивный регион-специфический микроглиоз, характер изменения которого совпадает с изменением секреции интерлейкина-1 β и может быть зарегистрирован по изменению коэкспрессии CD157/CD11 β /CD18 в клетках микроглии.

Теоретическая значимость работы состоит в выявлении новых клеточно-молекулярных механизмов нейровоспаления при экспериментальном аутизме. Получена новая информация о механизмах патогенеза хронической нейродегенерации детского возраста: экспрессия НАД⁺-конвертирующих ферментов (CD157, CD38), экспрессия маркеров нейровоспаления (CD11 β , CD18, HMGB1, NLRP3, IL-1 β), особенности развития апоптоза, синаптогенеза (PSD95), снижение уровня нейропептида окситоцина в гипоталамо-гипофизарной и лимбической системе. Полученные экспериментальные результаты расширяют

существующие взгляды на роль нейровоспаления в нормальном развитии и при нарушениях формирования головного мозга, характерных для расстройств аутистического спектра.

Практическая значимость и внедрение результатов

Получено экспериментальное доказательство того, что развитие нейровоспаления характерно для животных с экспериментальным аутизмом, индуцированным пренатальным введением вальпроевой кислоты. Выраженность воспаления определяется характером активации клеток микроглии на самых ранних этапах постнатального развития животных, что сопровождается нарушением процессов апоптоза, синаптогенеза и соответствует – в более поздние периоды онтогенеза – нарастанию признаков нарушения социального взаимодействия, доминирования агрессии, тревожности и стереотипий. Полученные данные могут найти применение при разработке патогенетически-обоснованной стратегии диагностики и терапии аутизма.

Результаты работы внедрены в учебный процесс кафедры биологической химии с курсом медицинской, фармацевтической и токсикологической химии, научный процесс НИИ молекулярной медицины и патобиохимии ГБОУ ВПО КрасГМУ им. проф. В. Ф. Войно-Ясенецкого. Полученные результаты будут представлять значительный интерес для специалистов в области нейрофармакологии, нейробиологии, клеточной биологии, патологической физиологии, неврологии и психиатрии.

Методология и методы исследования

Диссертационная работа носит экспериментальный характер. Объектом исследования были белые крысы линии Wistar. Было проведено моделирование экспериментального аутизма и экспериментальной нейродегенерации альцгеймеровского типа, поведенческое фенотипирование животных и оценка сложных форм поведения и когнитивных функций, использовались клеточно-биологические методы исследования на полученных срезах и гомогенатах головного мозга; значимость полученной информации подтверждена методами статистического анализа.

Положения, выносимые на защиту

1. При экспериментальном аутизме в динамике с 5 по 90 сутки развития регистрируется увеличение экспрессии HMGB1, NLRP3, IL-1 β в ткани головного

мозга, что характеризует развитие нейровоспаления и соответствует характеру нарушения сложных форм поведения и запоминания. Нарушение социального поведения соответствует снижению уровня окситоцина в гипоталамо-гипофизарной системе и в миндалине головного мозга к 90 суткам постнатального развития при экспериментальном аутизме.

2. Развитие нейровоспаления в головном мозге при экспериментальном аутизме сопровождается изменением экспрессии НАД⁺-конвертирующих ферментов (CD38, CD157) в CD11 β +CD18⁺-клетках микроглии, что характеризует реактивный глиоз. Указанные изменения носят регион-специфичный характер и по своей выраженности не уступают изменениям, характерным для нейродегенерации.

3. Отдаленный период развития (60 и 90 сутки постнатального периода) характеризуются появлением у животных с экспериментальным аутизмом усиления тревожности, расстройства социального распознавания, увеличения агрессивности, усугубления стереотипного поведения, чему предшествует активация микроглии, нарушение синаптогенеза в коре, гиппокампе и миндалине, пик проявления неврологической симптоматики приходится на интенсификацию синаптогенеза в миндалине.

Степень достоверности полученных результатов

Все научные положения и выводы были обоснованы с помощью системного анализа поставленных вопросов, современных методов исследования в нейробиологии, достоверной выборкой исследуемых животных, большим объемом фактического материала, проанализированных статистически.

Апробация работы

Материалы диссертации доложены и обсуждены на 81-й Всероссийской Байкальской научно-практической конференции молодых учёных и студентов с международным участием «Актуальные вопросы современной медицины»/Baikal Russian scientific-practical conference of young scientists and students with international participation "Actual problems of modern medicine, 2014 г; на международном конгрессе по нейронаукам, г. Красноярск, 2014 г., на международном саммите (Университет Канадзавы, Япония), 2014 г.; на научно-практической конференции «Расстройства аутистического спектра и другие психические нарушения детского возраста. Современные подходы и перспективы межведомственного взаимодействия», г.Тула, 1-2 октября 2015 г;); на VI Международном Молодёжном

Медицинском Конгрессе «Санкт-Петербургские научные чтения – 2015», г. Санкт-Петербург, 2-4 декабря 2015 г.; научных семинарах научно-образовательного центра «Трансляционная медицина», НИИ молекулярной медицины и патобиохимии КрасГМУ (Красноярск, 2013-2015 г).

Публикации по теме диссертации

По материалам диссертации опубликовано 11 печатных работ, в том числе 5 статей в журналах, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией Министерства образования и науки РФ для публикации материалов диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, 2 – в зарубежных изданиях, в том числе 1 – в журнале, индексируемом в базе данных Web of Science.

Объем и структура диссертации

Диссертация изложена на 178 страницах машинописного текста и состоит из введения, 4 глав (обзор литературы, материал и методы, результаты собственных исследований, обсуждение полученных результатов), выводов, практических рекомендаций, списка сокращений, списка литературы. Работа иллюстрирована 40 рисунками, 18 таблицами и 11 приложениями. Библиографический список состоит из 220 источников (20 отечественных и 200 зарубежных).

Личный вклад автора

Разработка дизайна исследования, анализ литературных данных, сбор, анализ, статистическая обработка материала, написание диссертации и научных публикаций по теме исследования выполнены лично автором. Результаты изучения механизмов нейровоспаления при экспериментальной болезни Альцгеймера получены совместно с к.м.н. Ю.К. Комлевой, изучения уровня окситоцина – совместно с к.б.н. О.Л. Лопатиной.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материал и методы исследования

Эксперименты на животных были одобрены биоэтической комиссией по работе с лабораторными животными и локальным этическим комитетом КрасГМУ. Исследование поддержано грантом Совета по грантам Президента РФ для поддержки ведущих научных школ РФ (НШ-1172.2014.7, 2014-2015 гг.), целевого финансирования Министерства здравоохранения РФ (2014-2015 гг.).

Объектом исследования стали крысы обоего пола в возрасте от 1 до 90 суток (модель аутизма, n=45) и контроль (введение физиологического раствора, n=44),

которые были получены от самок репродуктивного возраста белых линейных (линия Wistar) крыс, массой 200-300 г. У животных забирали головной мозг, из которого впоследствии получали парафиновые срезы, гомогенаты аффекированных участков мозга (гипоталамус, гипофиз, миндалина). Для моделирования БА использовались крысы мужского пола линии Wistar, возрастом 7 месяцев: опытная (интрагиппокампальное введение бета-амилоида) и контрольная (интрагиппокампальное введение фосфатно-буферного раствора) группы (по 7 в группе, всего 14).

Экспериментальная модель аутизма создавалась путем подкожных инъекций беременным самкам крыс на 12-й день после зачатия 500 мг/кг веса вальпроевой кислоты в физиологическом растворе, в контроле - введение физиологического раствора из расчета 1 мл/кг веса (Schneider T., Przewlocki R., 2005; Rouillet F. I. et al, 2010; Rodier P. M. et al, 1997). **Моделирование экспериментальной болезни Альцгеймера** проводилось путем стереотаксического введения животным бета-амилоида (Li X. et al., 2011).

Тесты поведенческого фенотипирования животных с моделью аутизма включали оценку нейropsychического статуса животных с момента рождения по 17-е сутки ежедневно, NSS-тест, тесты для оценки памяти (водный лабиринт Морриса, тест на распознавание нового объекта), социальное поведение (тест с трубой на агрессию, 3-камерная активность, социальный пятипопыточный тест), эмоциональной сферы животных (открытое поле, приподнятый крестообразный лабиринт) и подтверждение эффективности создания модели – осмотр на наличие признаков аутизма (аутогруминг, рытье подстилки).

Иммуногистохимическая флуоресцентная оценка экспрессии антигенов и детекция апоптоза клеток головного мозга методом TUNEL проводились на парафиновых срезах головного мозга (гиппокамп, кора, миндалина) согласно стандартным протоколам: прямого и непрямого методов иммуногистохимии; для коэкспрессии антигенов – одновременного или последовательного комбинированного окрашивания; для TUNEL – по протоколу набора “In situ Direct DNA Fragmentation (TUNEL) Assay Kit (Abcam Plc, UK). **Флуоресцентная микроскопия** проводилась с помощью микроскопа Olympus CX41 с видеокамерой Olympus DP72, **конфокальная микроскопия** - Olympus FV10i-W

(фирма Olympus, Япония). Параметры экспрессии (относительная площадь для HMGB1, IL-1 β ; абсолютное количество – для CD11 β , CD18, CD38, CD157, NLRP3, апоптоза; отношение интенсивности флуоресценции PSD95 к DAPI в программе MacBiorphotonics ImageJ – для PSD95) подсчитывались не менее, чем в 5 полях зрения.

Уровень окситоцина определяли в гомогенате гипоталамуса, гипофиза и миндалина методом ИФА по протоколу производителя (Assay Designs Inc., Ann Arbor, MI, USA), содержание белка - с помощью протокола набора Bio-Rad protein assay kit.

Статистическая обработка результатов проводилась с помощью программы Statplus Professional, сборка 5.9.8.5/Core v.5.9.33. Данные представлены в виде: Me (Q1...Q3), где Me – медиана, Q1...Q3 – межквартильный размах. Анализ зависимостей между изученными признаками проводили с использованием рангового коэффициента корреляции Спирмена. Для сравнения показателей в независимых выборках применяли критерий Манна-Уитни, сравнение зависимых выборок осуществляли с помощью критерия Уилкоксона. Различия принимали значимыми при $p \leq 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

При создании экспериментальной модели аутизма на крысах линии Wistar забор исследуемого материала проводился на 5, 15, 25, 60, 90 сутки развития, пики развития неврологической симптоматики приходились на 60-90 сутки. Основные особенности поведения животных отмечены в таблице 1. У крыс с вальпуровой моделью аутизма зафиксировано нарушение эмоционального поведения в виде появления тревожности и синдрома гиперактивности и дефицита внимания, характерных также, согласно последним данным, и для PAC (Sanz-Cervera P. et al., 2015, Пичугина Ю.А. и др. 2009). При этом отмечается повышенный уровень агрессии в сравнении с контролем, страдает социальное распознавание, прогрессирующее с возрастом (знакомое животное воспринимается как ранее незнакомое).

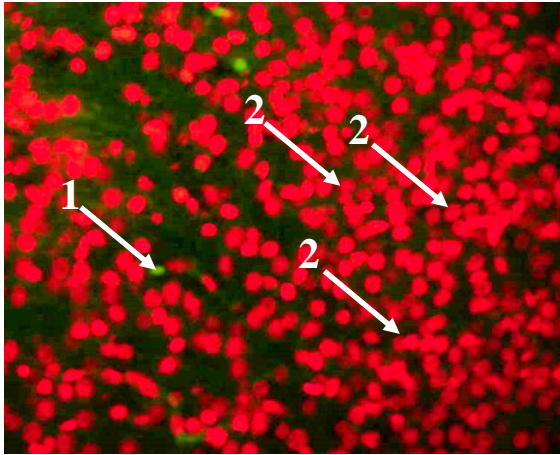
При экспериментальном аутизме отмечается увеличение массы головного мозга, что согласуется с литературными данными о превышающем возрастные нормы увеличении головного мозга при аутизме у детей (Courchesne E. et al., 2001), тенденция сначала к чрезмерному набору веса до 25 суток, а затем снижение массы тела, по сравнению с контролем.

Таблица 1 – Сравнительная оценка поведения животных с экспериментальным аутизмом и контрольной группой

Возраст	Контроль	Аутизм
P1-P17	Средний возраст открытия глаз - P15	Средний возраст открытия глаз - P16
	Нормальная мышечная сила в возрасте P15-P17	↓ мышечной силы в P15, сохранение мышечной силы в возрасте P16-P17
P25	Нормальная когнитивная функция	Сохранение когнитивной функции
	Нормальное социальное распознавание	Нарушение социального распознавания
P60	Нормальная функция вегетативной системы	Дисфункция вегетативной системы (↑ количества болюсов, уринаций)
	Нормальная подвижность, скорость, дистанция	↑ подвижности, скорости, пройденной дистанции
	Отсутствие стереотипий (↓ аутогруминг, рытье подстилки)	Наличие стереотипий (↑ аутогруминг, рытье подстилки)
	Нормальное социальное распознавание	Нарушение социального распознавания
	↓ тревожности и агрессии	↑ тревожности и агрессии
P90	Нормальная функция вегетативной системы	Дисфункция вегетативной системы (↑ количества болюсов)
	Нормальная подвижность, скорость, дистанция	Нет изменений подвижности, скорости, дистанции
	Отсутствие стереотипий (↓ аутогруминг, рытье подстилки)	Наличие стереотипий (↑ аутогруминг, рытье подстилки)
	Нормальное социальное распознавание	Нарушение социального распознавания
	↓ тревожности и агрессии	↑ тревожности и агрессии

Выявлено значимое уменьшение количества апоптотических клеток (рисунок 1) во всех регионах мозга в группе экспериментального аутизма, за исключением коры в возрасте 60 и 90 суток, миндалины на 5-е сутки, и гиппокампа на 90-е сутки постнатального развития. тмечается тенденция к увеличению числа клеток в исследуемых регионах в сравнении с контролем и значимо отличается в гиппокампе на 60-е и 90-е сутки, коре и миндалине на 5-е и 15-е сутки.

(a)



(б)

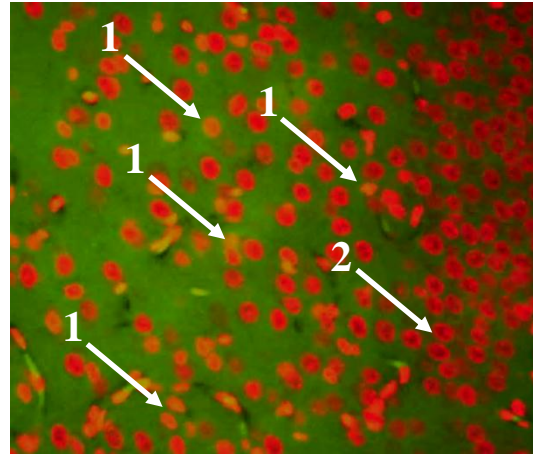
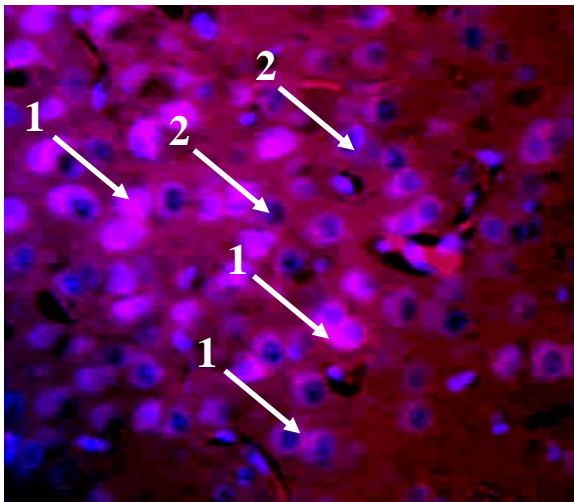


Рисунок 1 – Апоптоз в гиппокампе головного мозга крыс в вальпроевой модели аутизма (а) и контроле (б): 1 - FITC-позитивные клетки, 2 – FITC-негативные клетки. Окраска по методу TUNEL, ув. 400.

При оценке внеклеточной экспрессии $\text{IL-1}\beta$ выявлено значимое ее увеличение при экспериментальном аутизме (рисунок 2), отмечается тенденция к ее увеличению от 5 до 25 суток, а затем – значимое снижение к 90-м суткам развития. В контрольной группе имеется тенденция к уменьшению экспрессии с 5 до 25 суток, а на 60-х и 90-х сутках ее вовсе не отмечается. При экспериментальной БА также отмечается высокий уровень $\text{IL-1}\beta$: его относительная площадь экспрессии составляет в гиппокампе 3,58 (2,08...4,66), в коре 4,17 (3,52...6,5), в миндалине 4,42 (3,08...5,86).

(a)



(б)

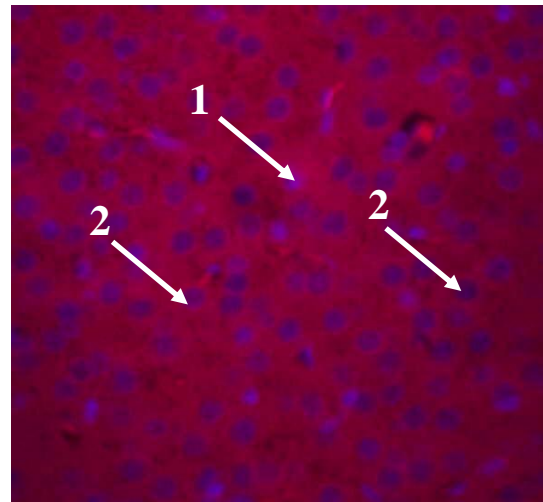


Рисунок 2 – Экспрессия $\text{IL-1}\beta$ в коре головного мозга при экспериментальном аутизме (а) и в контроле (б): 1 - внеклеточная экспрессия $\text{IL-1}\beta$, 2 – ядра клеток. Иммуногистохимическая окраска (красный – $\text{IL-1}\beta$, синий – DAPI), ув.400.

Обнаружено значимое увеличение площади экспрессии HMGB1 (рисунок 3) при экспериментальном аутизме в сравнении контролем во всех исследуемых регионах головного мозга с тенденцией к увеличению площади с 5-х к 25 суткам в гиппокампе; в коре и миндаляне аналогичное изменение наблюдалось с 5-х до 15-х суток, затем тенденция к уменьшению площади экспрессии.

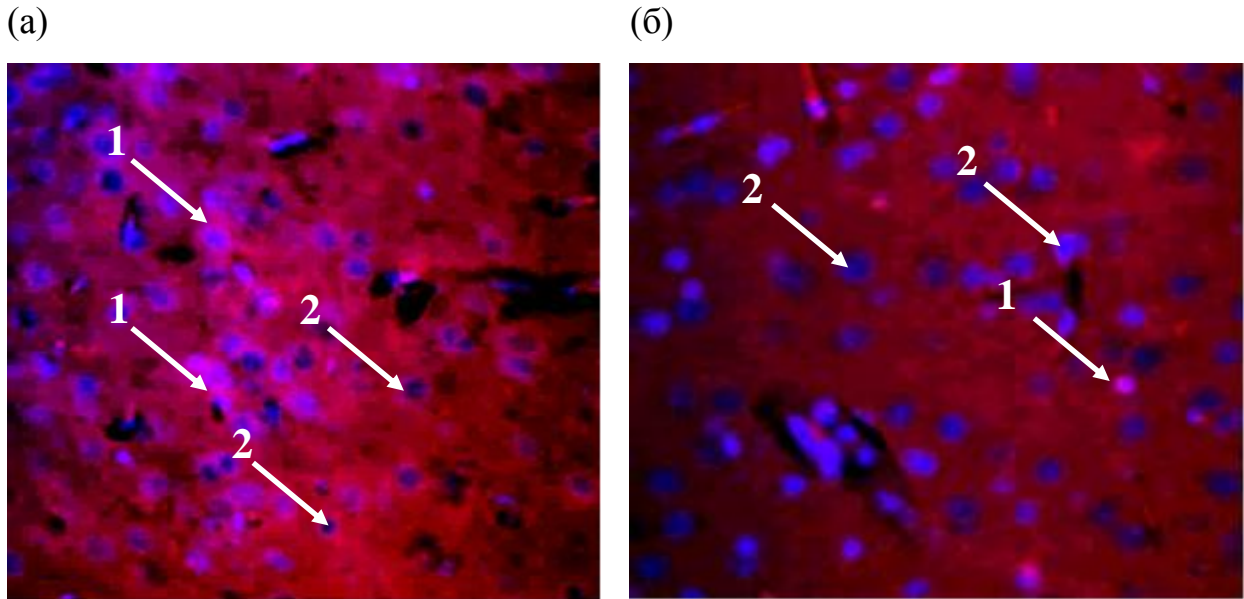
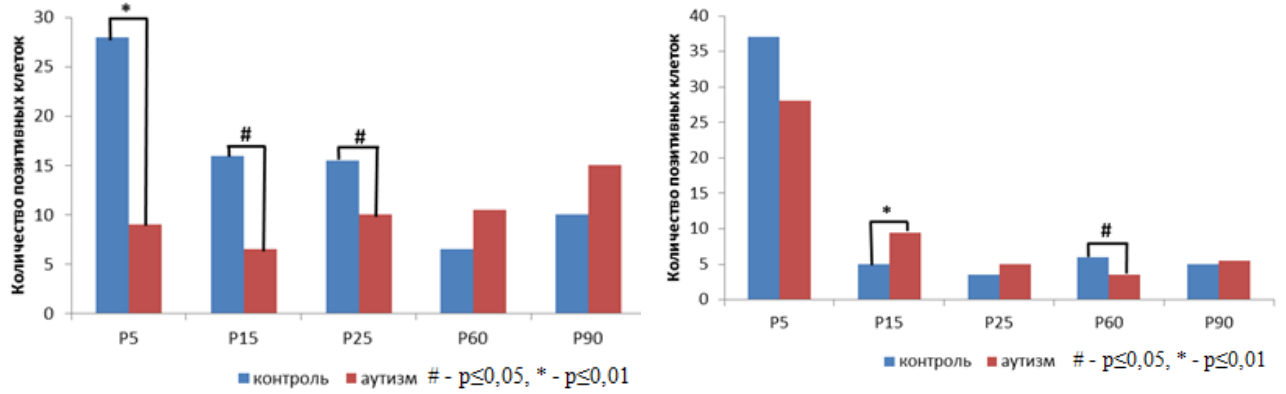


Рисунок 3 – Экспрессия HMGB1 в миндалине головного мозга при экспериментальном аутизме (а) и в контроле (б): 1 - внеклеточная экспрессия HMGB1, 2 – ядра клеток. Иммуногистохимическая окраска (красный – HMGB1, синий – DAPI), ув.400.

Экспрессия CD157 при экспериментальном аутизме на клетках микроглии носит регион-специфичный характер: активация микроглии приходится на 15-е сутки в гиппокампе и на 5-е сутки в коре и миндаляне. При исследовании хронической нейродегенерации коэкспрессия Neun и CD157 в гиппокампе значимо не различается ($p=0,201$): при экспериментальной БА - 81,25% (69,57...83,33), у группы с ложной операцией процент коэкспрессирующих клеток составил 93,14 (82,66...96,14).

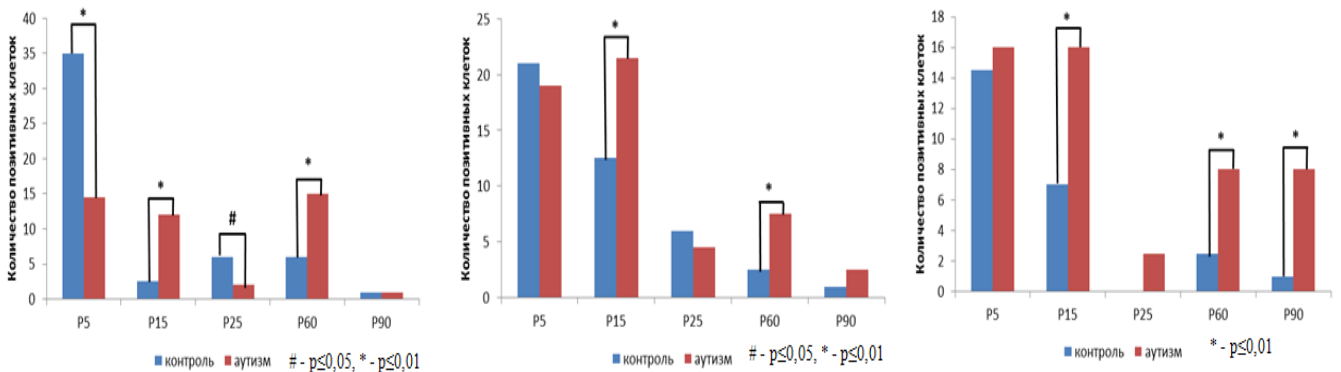


Гиппокамп

Кора

Рисунок 4 - Динамика экспрессии CD157 на клетках микроглии в гиппокампе и коре крыс контрольной группы и при экспериментальном аутизме.

При исследовании экспрессии CD38 на клетках микроглии выявлены следующие особенности: экспрессия так же носит регион-специфичный характер; активация микроглии приходится на 15-е сутки в гиппокампе и на 5-е сутки в коре и миндалине. Это согласуется с полученными данными по анализу экспрессии CD157 на клетках микроглии; активация экспрессии CD38 отмечается в среднем на 60-е сутки во всех исследуемых регионах. При экспериментальной БА процент экспрессии CD38 на нейронах (маркер NeuN) гиппокампа составила 68,42% (62,96...68,75), при проведении ложной операции - 41,17% (39,34...63,45), то есть значимо не отличается ($p=0,46$).



Гиппокамп

Кора

Миндалина

Рисунок 5 - Динамика экспрессии CD38 на клетках микроглии в гиппокампе, коре и миндалине крыс контрольной группы и при экспериментальном аутизме.

Выявлен повышенный уровень количества NLRP3-экспрессирующих клеток в гиппокампе, начиная с 5-х суток постнатального периода при экспериментальном аутизме (36 (32...45)) в сравнении с контролем (24 (16...30)). Далее наблюдалась тенденция к снижению экспрессии инфламмосомы в возрасте P15 (11,5 (5,25...16,75)) и P25 (5,5 (4,25...7,75)), затем – возобновление увеличения

количества NLRP3-позитивных клеток при сохранении значимой разницы с контрольной группой. Пик экспрессии CD11 β приходится на возраст P5, наиболее выраженный при пренатальном нарушении развития головного мозга (34 (19...39)), затем выявлено снижение его экспрессии с сохранением значимых различий. При оценке коэкспрессии NLRP3/CD11 β (рисунок 6) на клетках гиппокампа выявлено увеличение их количества у крыс с аутизмом. При моделировании хронической нейродегенерации у ложно-оперированных животных процент клеток, экспрессирующих NLRP3 и GFAP, составляет 77,38 (47,85... 86,46), а у животных с моделированием БА 29,17 (18,75...38,33), что значимо ($p=0,031$) различается и может свидетельствовать о роли нейровоспаления как нейропротективного механизма, либо об отсроченной реакции астроглии.

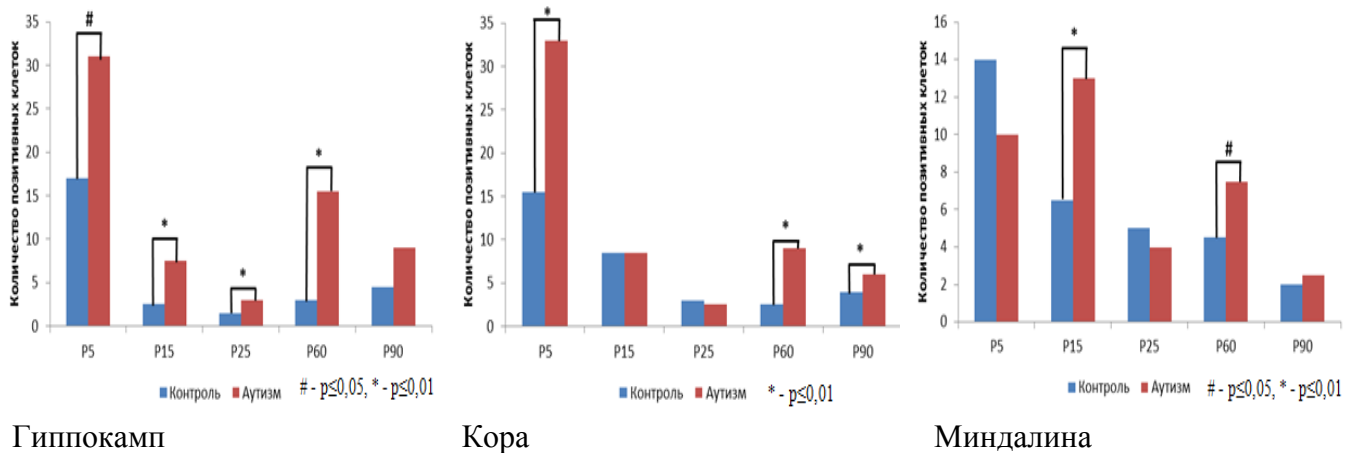


Рисунок 6 - Динамика экспрессии NLRP3 на клетках микроглии в гиппокампе, коре и миндалине крыс контрольной группы и при экспериментальном аутизме.

В коре головного мозга животных с аутизмом пик экспрессии NLRP3 приходится на период P5 (42 (32,5...55)) и значимо отличается от контроля (20 (16,75...24)). Экспрессия CD11 β значимо выше в первом исследуемом сроке (P5) в группе с аутизмом (35,5 (27,25...51)), что может свидетельствовать о запуске микроглия-зависимого нейровоспаления. В миндалине пик экспрессии NLRP3 в модели аутизма приходился на 15-е сутки постнатального периода (16,5 (13,25...18)) и значимо отличался от контроля (9 (7,25...10)), на 5-е сутки в опытной группе отмечался более низкий уровень экспрессии NLRP3 при сравнении с группой контроля. При оценке экспрессии CD11 β в миндалине головного мозга крыс в контроле пик приходится на возраст P5 (15 (14,25...18,25)) с постепенным снижением количества позитивных клеток; в опытной группе пик приходится на 15-е сутки постнатального развития (14,5 (13...18,25)), значимо отличаясь от контроля. Анализ коэкспрессии NLRP3/CD11 β в миндалине выявил значимое увеличение количества клеток с коэкспрессией у

крыс с аутизмом с периода P15 (13 (11...14,75)).

При экспериментальном аутизме отмечается уменьшение экспрессии PSD95 во всех исследуемых регионах головного мозга в сравнении с контролем в возрасте от 5 до 25 суток, а затем ее усиление на 60-е и 90-е сутки постнатального развития, что может свидетельствовать о подавлении и интенсификации синаптогенеза, соответствующим изменению активности микроглии.

При исследовании связей между относительной площадью экспрессии HMGB1 и Π -1 β выявлены: значимая отрицательная средняя по силе связь в коре ($r=-0,39$, $p\leq 0,05$), положительная средняя по силе связь в миндалине ($r=0,64$, $p\leq 0,05$) при экспериментальном аутизме в возрасте 25 суток, а также высокозначимая положительная средняя по силе связь в миндалине ($r=0,59$, $p\leq 0,01$) в эксперименте на 90-е сутки постнатального развития. Значимых корреляционных связей между относительной площадью экспрессии Π -1 β и абсолютным количеством клеток, экспрессирующих NLRP3, в контрольной и опытной группе не выявлено.

Схожие изменения экспрессии интерлейкина-1 β , NLRP3, CD38 и CD157 отмечены в экспериментальной модели болезни Альцгеймера, что характеризует хроническую нейродегенерацию, и в целом, позволяет судить о степени выраженности воспалительной реакции в ткани головного мозга при экспериментальном аутизме относительно «классической» модели нейровоспаления с использованием бета-амилоид-индуцированной модели БА.

Исследование на окситоцин показало значимые различия между контрольной и опытной группами. Наиболее выраженные различия отмечались в гипоталамо-гипофизарной системе с тенденцией к увеличению разницы в возрасте P60 и P90, в миндалине - на 90-е сутки развития (таблица 2).

Таблица 2 – Количественные показатели концентрации окситоцина при экспериментальном аутизме, пг/мл

Регион головного мозга	Группы				Уровни значимости
	Контроль		Аутизм		
	КР60 (n=7)	КР90 (n=9)	ЭР60 (n=9)	ЭР90 (n=12)	
Гипоталамус	29,28 (24,45...31,6)	17,06 (12,99...20,8)	6,94 (5,34...9,29)	5,28 (4,66...10,77)	$p_{K\rightarrow 60}=0,004$ $p_{K\rightarrow 90}=0,005$
Гипофиз	131,75 (116,14...208,86)	133,91 (97,84...157,3)	52,18 (8,32...89,65)	19,6 (3,46...27,22)	$p_{K\rightarrow 60}=0,035$ $p_{K\rightarrow 90}=0,012$
Миндалина	0,33 (0,13...0,42)	0,72 (0,33...2,14)	0,49 (0,41...0,68)	0,22 (0,14...0,35)	$p_{K\rightarrow 60}=0,125$; $p_{K\rightarrow 90}=0,016$

В целом, во всех регионах головного мозга у контрольных и экспериментальных животных в возрасте P5-P15 отмечаются признаки усиления нейровоспаления в сравнении с другими временными периодами, что может быть связано с активным изучением животными окружающей среды – «информационного всплеска», однако многие из этих параметров несколько «отстают» по времени у животных с аутизмом. Второй пик нейровоспаления, выраженное снижение апоптоза, разнонаправленные изменения синаптогенеза, наблюдаются только у животных с моделью аутизма в возрасте P60-P90 и могут быть связаны с реализацией программы нейровоспаления в ответ на ее «запуск» при нейродегенерации на предыдущих «этапах» развития повреждений (пренатальное действие вальпроевой кислоты, раннее постнатальное изменение апоптоза, клеточности и запуск нейровоспаления).

Примечательно, что в это же время (возраст P60-P90, соответствующий «подростковому» и «юношескому» периодам развития человека) доминируют нарушения сложных форм поведения (признаки усиления тревожности, гиперактивности, агрессии; усугубление стереотипий; нарушение социального контакта и распознавания) с сохранением нормальных когнитивных функций (но с тенденцией к их усугублению к возрасту P90). Известно, что при дисфункции гиппокампа преобладает когнитивный дефицит, при дисфункции миндалины – эмоционально-поведенческие расстройства (социальный дефицит, депрессия, тревожность), энторинальная кора является связующим звеном между гиппокампом и неокортексом и при ее повреждении могут отмечаться как эмоционально-поведенческие, так и когнитивные нарушения.

Указанные изменения поведения могут быть связаны с более ранним характером повреждения коры головного мозга и миндалины (при большей устойчивости миндалины к действию повторного стресса по сравнению с корой), в отличие от гиппокампа, повреждения которого носят отсроченный характер.

Выявленные изменения суммированы в схемах, отражающих регион-специфичный характер развития повреждений (рисунок 7-9).

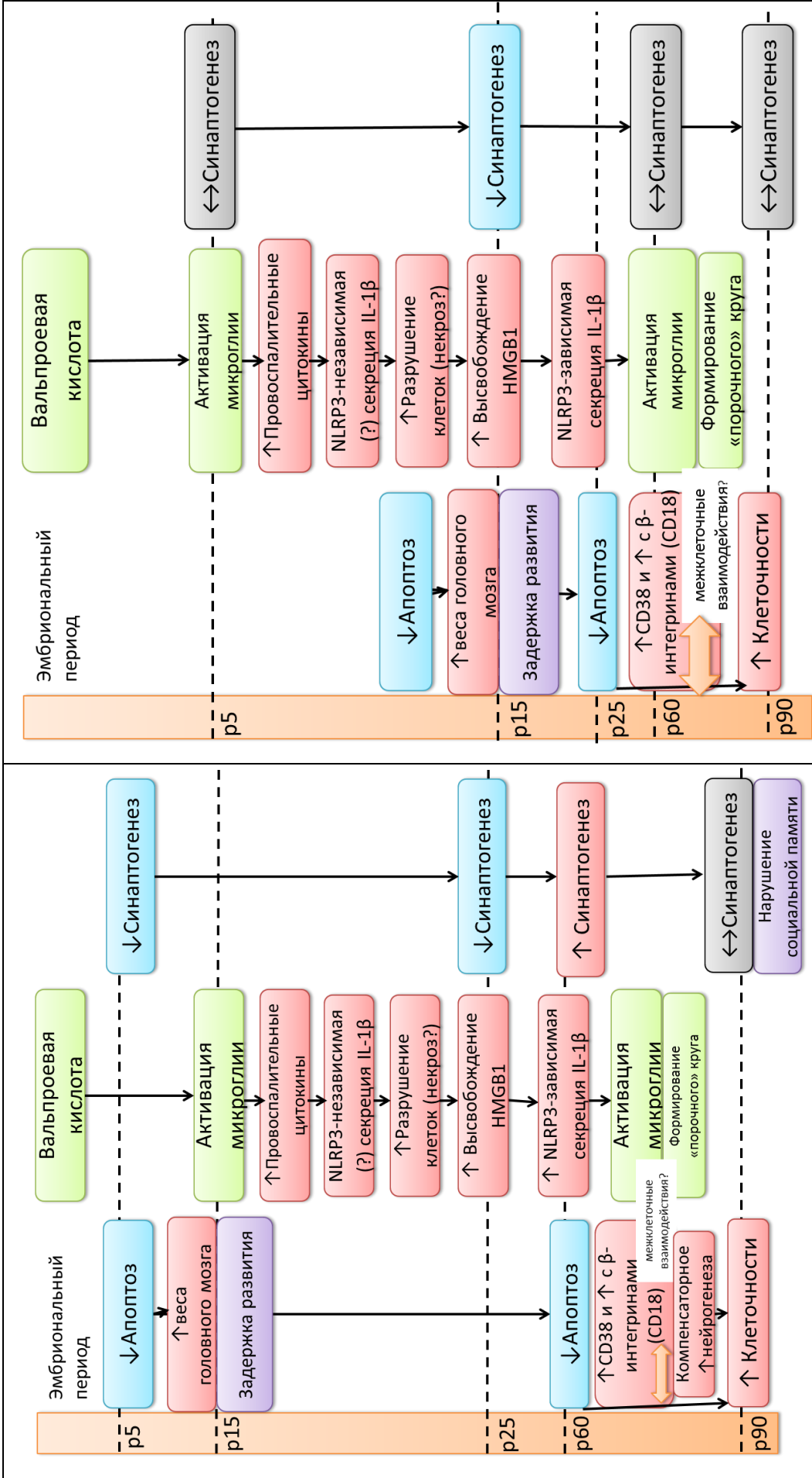
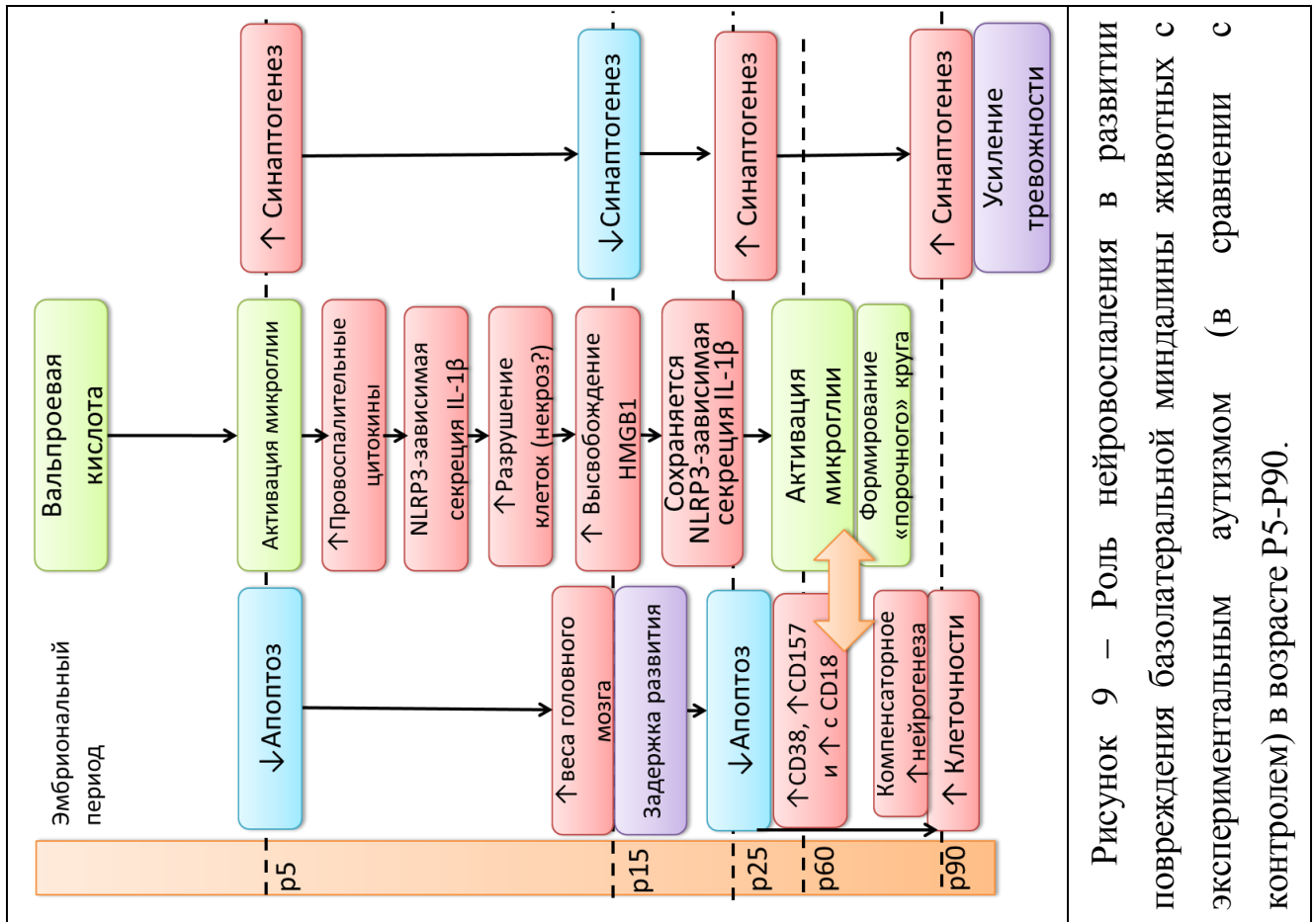


Рисунок 7 – Роль нейровоспаления в развитии повреждения гиппокампа у животных с экспериментальным аутизмом (в сравнении с контролем) в возрасте P5-P90.

Рисунок 8 – Роль нейровоспаления в развитии повреждения энторинальной коры животных с экспериментальным аутизмом (в сравнении с контролем) в возрасте P5-P90.



ВЫВОДЫ

1. При экспериментальном аутизме в сравнении с контролем отмечается задержка соматического развития, появление стереотипного поведения, тревожности, агрессивности к 60 суткам и их усугубление к 90 суткам развития; нарушение социального распознавания с 25 суток прогрессирующее к P90, но когнитивные функции, моторная, сенсорная и координаторная сферы не страдают. При пренатальном введении вальпроевой кислоты значимо снижен уровень окситоцина в гипоталамо-гипофизарной системе: в гипоталамусе в 4 раза ниже, чем в контроле, на 60 и 90 сутки; в гипофизе – в 2,5 раза ниже на 60-е, в 6 раз ниже на 90-е сутки; в миндалине 3-кратное уменьшение на 90 сутки.

2. Выявлены регион-специфичные и общие особенности экспрессии CD11β, CD18, CD38, CD157, NLRP3, HMGB1, интерлейкина-1β, PSD95, уровня апоптоза в аффецированных регионах головного мозга (гиппокамп, кора, миндалина) при экспериментальном аутизме и в контроле на 5, 15, 25, 60 и 90 сутки развития. Для гиппокампа характерен отсроченный характер развития повреждений при пренатальном введении вальпроевой кислоты: пик нейровоспаления с возраста P25 (увеличение экспрессии HMGB1, интерлейкина-1β, CD11β, CD18) с последующей

активацией экспрессии NLRP3 на 60-е сутки постнатального периода и NLRP3-зависимой секрецией интерлейкина-1 β ; активация экспрессии CD38, CD157 в возрасте P60; подавление синаптогенеза (экспрессия PSD95) на сроках P5-P25 с последующим усилением на 60-е сутки постнатального развития и нормализация до уровня контроля на P90; значимое снижение уровня апоптоза в период P5-P60 и тенденция к его интенсификации на P90, чему также соответствует тенденция к увеличению клеточности на 5-25-е сутки развития и значимое увеличение этого показателя к P60-P90. При экспериментальном аутизме в коре и миндалине процессы нейровоспаления запускаются ранее, с P15 (увеличение экспрессии HMGB1, интерлейкина 1 β , CD11 β , CD18), отмечается повышенная экспрессия NLRP3 на 15-е сутки постнатального развития со вторым пиком на P60; у животных с аутизмом в гиппокампе увеличивается экспрессия CD38 и его коэкспрессия с CD18 в возрасте P15 и P60, в энторинальной коре увеличивается экспрессия CD38, CD157 и их коэкспрессия с CD18 в возрасте P15 и P60, в миндалине увеличивается экспрессия CD18 в возрасте P25-P90, экспрессия CD38 и его коэкспрессия с CD18 P15-P90; процессы синаптогенеза (экспрессия PSD95) в миндалине интенсифицируются в возрасте P5 и в периоде P25-P90, снижаясь на 15-е сутки жизни.

3. Клеточно-молекулярные признаки нейровоспаления при аутизме сопоставимы по своей выраженности с «классическим» нейровоспалением при экспериментальной болезни Альцгеймера, которое характеризуется увеличением экспрессии NLRP3-инфламмасом, ИЛ-1 и НАД⁺-конвертирующих ферментов CD38 и CD157 в ткани головного мозга. Процессы запрограммированной клеточной гибели в коре головного мозга значимо подавлены при экспериментальном аутизме в период P5-P25, в миндалине – P5-P90, при этом в коре клеточность значимо выше примерно в те же сроки, а в миндалине – лишь в возрасте P5-P15.

4. Выявлены значимая отрицательная средняя по силе в коре, положительная средняя по силе связь в миндалине при пренатальном введении вальпроевой кислоты в возрасте 25 суток, высокозначимая положительная средняя по силе связь в миндалине при экспериментальном аутизме на 90 сутки постнатального развития при исследовании связей между относительной площадью экспрессии HMGB1 и интерлейкина-1 β .

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Потенциальными молекулами-маркерами при аутизме могут быть маркеры микроглии, нейровоспаления и метаболизма НАД⁺ (CD11 β , CD18, CD38, CD157, NLRP3, HMGB1, ИЛ-1 β), синаптогенеза (PSD95).

2. Оценка уровня окситоцина в гипоталамо-гипофизарной системе и миндалине головного мозга, в сочетании с тестами для оценки эмоционально-поведенческих и социальных расстройств в возрасте экспериментальных животных P60-P90, рекомендуются к использованию для верификации модели экспериментального аутизма.

3. Регион-специфический характер изменений (различия в миндалине, энторинальной коре головного мозга и гиппокампе) и возраст-зависимый характер изменения нейровоспаления необходимо учитывать при проведении дальнейших исследований на животных с моделями экспериментального аутизма и разработке препаратов с таргетным механизмом действия.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ
Статьи в журналах, рекомендованных ВАК на соискание ученой степени
кандидата наук

1. Молекулы-маркеры активации глии при нейровоспалении: новые возможности для фармакотерапии нейродегенерации / Н. А. Малиновская, С. В. Прокопенко, Ю. К. Комлева, Ю. А. Панина, Е. А. Пожиленкова, Р. В. Рябоконт, А. Б. Салмина // **Сибирское медицинское обозрение**. – 2014. – № 5. – С. 5–15. ИФ РИНЦ 0,152

2. Структурная и функциональная гетерогенность астроцитов головного мозга: роль в нейрогенезе и нейровоспалении / А. В. Моргун, Н. А. Малиновская, Ю. К. Комлева, О. Л. Лопатина, Н. В. Кувачева, Ю. А. Панина, Т. Е. Таранушенко, Т. Н. Замай, А. Б. Салмина // **Бюллетень сибирской медицины**. – 2014. – № 5. – С. 138–148. ИФ РИНЦ 0,331

3. Astroglial control of neuroinflammation: TLR3-mediated dsRNA-sensing pathways are in the focus / A. B. Salmina, Yu. K. Komleva, O. L. Lopatina, N. V. Kuvacheva, Ya. V. Gorina, Yu. A. Panina, Yu. A. Uspenskaya, M. M. Petrova, I. V. Demko, A. S. Zamay, N. A. Malinovskaya // **Reviews in the Neurosciences**. – 2015. – Vol.26, № 2. – P. 143-159. ИФ Web of Science 3,314

4. Воспаление и старение мозга / А. Б. Салмина, Ю. К. Комлева, Н. В. Кувачева, О. Л. Лопатина, Е. А. Пожиленкова, Я. В. Горина, Э. Д. Гасымлы, Ю. А. Панина, А. В. Моргун, Н. А. Малиновская // **Вестник Российской академии медицинских наук**. – 2015. – № 1. – С. 17–25. ИФ РИНЦ 0,757

5. Оценка социального взаимодействия и эмоционального поведения крыс с моделью аутизма / Ю. А. Панина, Н. А. Малиновская, А. Б. Салмина, О. Л. Лопатина, Р. В. Рябоконт, Г. Е. Герцог, С. К. Антонова // **Забайкальский медицинский вестник**. – 2015. – № 3. – С. 102-105. ИФ РИНЦ 0,335

Статья в международном журнале

6. CD38 and CD157 Expression: Glial Control of Neurodegeneration and Neuroinflammation / A. B. Salmina, Yu. K. Komleva, O. L. Lopatina, Ya. V. Gorina, N. A. Malinovskaya, E. A. Pozhilenkova, Yu. A. Panina, E. L. Zhukov, N. N. Medvedeva // Messenger. – 2014. – Vol. 3. – P. 78–85.

Материалы конференций

7. Панина, Ю. А. Оценка когнитивных функций и социального поведения животных с моделями пренатального нарушения развития головного мозга / Ю. А. Панина // Материалы 81-ой Всероссийской Байкальской научно-практической конференции молодых ученых и студентов с международным участием «Актуальные вопросы современной медицины». – Иркутск, 2014. – С. 297.

8. Assessment of social behavior of animals with models of prenatal developmental disorders of the brain / Yu. A. Panina, N. A. Malinovskaya, A. B. Salmina, O. L. Lopatina, Yu. K. Komleva, E. A. Pozhilenkova // International Congress on Neuroscience : Abstract book (Krasnoyarsk, June 19-21, 2014) / eds. A. B. Salmina, M. M. Petrova, E. A. Pozhilenkova. - Krasnoyarsk : [s. n.], 2014. – P. 68.

9. Neuroinflammation and neurogenesis: glial control / A. B. Salmina, Yu. K. Komleva, N. A. Malinovskaya, A. V. Morgun, E. A. Pozhilenkova, E. D. Khilazheva, N. V. Kuvacheva, O. L. Lopatina, Yu. A. Panina // International Congress on Neuroscience : Abstract book (Krasnoyarsk, June 19-21, 2014) / eds. A. B. Salmina, M. M. Petrova, E. A. Pozhilenkova. - Krasnoyarsk : [s. n.], 2014. – P. 85.

10. Тревожность и социальная активность у крыс ювенильного возраста с экспериментальным аутизмом / О. Л. Лопатина, Н. А. Малиновская, Ю. А. Панина, Р. В. Рябоконт, А. Б. Салмина // Научно-практическая конференция «Расстройства аутистического спектра и другие психические нарушения детского возраста. Современные подходы и перспективы межведомственного взаимодействия» : сб. тез. – Тула, 2015. – С. 40-41.

11. Панина, Ю. А. Экспрессия NLRP3 и IL-1B в миндалинах головного мозга при экспериментальном аутизме / Ю. А. Панина, Р. В. Рябоконт, В. А. Бурханова // VI Международный молодежный медицинский конгресс «Санкт-Петербургские научные чтения – 2015» : тезисы. Санкт-Петербург, 2-4 дек. 2015 г. – СПб., 2015. – С. 284–285.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

БА	– болезнь Альцгеймера
НАД	– никотинамидадениндинуклеотид
РАС	– расстройства аутистического спектра
ЦНС	– центральная нервная система
CD	– кластер дифференцировки антигенов
HMGB1	– амфотерин, белок из группы ядерных негистоновых белков
IL	– IL-1 β
MAC-1	– β 2-интегрин, состоящий из альфа (CD11 β) и бета (CD18) цепи
Neun	– neuronal nuclear marker
NLRP3	– Nod-подобный рецептор, основной компонент NALP инфламмасом
NSS	– шкала для оценки неврологического дефицита у животных
PSD95	– белок постсинаптической плотности
TUNEL	– метод детекции апоптоза (TdT-mediated dUPT nick end labeling)