

На правах рукописи

Черных Анатолий Игоревич

**ОСОБЕННОСТИ РАЗВИТИЯ ЛОКАЛЬНОЙ
ИНСУЛИНОРЕЗИСТЕНТНОСТИ
ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ БОЛЕЗНИ АЛЬЦГЕЙМЕРА**

14.03.03 – патологическая физиология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Томск– 2018

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования "Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого" Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научный руководитель:

доктор медицинских наук, профессор

Салмина Алла Борисовна

Официальные оппоненты:

Мухамедьяров Марат Александрович - доктор медицинских наук, доцент, профессор кафедры нормальной физиологии федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования "Казанский государственный медицинский университет" Министерства здравоохранения Российской Федерации

Пономарева Наталия Васильевна - доктор медицинских наук, заведующая лабораторией возрастной физиологии мозга и нейрокибернетики федерального государственного бюджетного научного учреждения "Научный центр неврологии" (ФГБНУ НЦН) Министерства науки и высшего образования Российской Федерации

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт физиологии и фундаментальной медицины» (ФГБНУ НИИФФМ, г. Новосибирск)

Защита состоится «__» _____ 201 г. в ____ часов на заседании диссертационного совета Д 208.096.01 при Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации по адресу: 634050, г. Томск, Московский тракт, 2

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России и на сайте <http://ssmu.ru>

Автореферат разослан «__» _____ 2018г.

Ученый секретарь диссертационного совета

Петрова Ирина Викторовна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования и степень ее разработанности

Немногие проблемы в современной биомедицине вызвали столько же научных интересов и общественного беспокойства, как болезнь Альцгеймера (БА). На сегодняшний день в мире насчитывается около 40 миллионов пациентов, страдающих данной патологией [Selkoe DJ, Hardy J, 2016]. БА является нейродегенеративным расстройством, которое патологически определяется обширной потерей нейронов и накоплением внутриклеточных нейрофибриллярных клубков и внеклеточных амилоидных бляшек в головном мозге. Генетические, биохимические и невропатологические данные свидетельствуют о том, что агрегация патологического белка бета-амилоида (А β) является центральной для инициирования патогенеза БА [Lashley T., et al., 2018].

В настоящее время все больше ученых считают, что решающее значение в развитии БА играют олигомерные формы А β , и их образование объясняет раннюю потерю памяти при БА [VanItallie T.B., 2017].

В последние годы внимание исследователей сосредоточено на изучении роли формирования локальной инсулинорезистентности в патогенезе БА. В настоящее время общепризнанной является точка зрения о том, что именно инсулинорезистентность в ткани головного мозга обуславливает развитие когнитивной дисфункции и способствует прогрессированию дегенеративных изменений [Cholerton B., et al., 2011; А.Б. Салмина, 2013; Blázquez E., et al., 2014].

Значительный вклад в развитие локальной инсулинорезистентности в ткани головного мозга вносит нейровоспаление за счет гиперпродукции провоспалительных цитокинов, активации астроглии и микроглии, нарушения процессов репаративного нейрогенеза. Вместе с тем, в литературе имеются данные, что центральная инсулинорезистентность и как следствие нарушенный метаболизм глюкозы могут привести к различным молекулярным повреждениям и эффектам, например апоптозу, митохондриальной дисфункции и окислительному стрессу в клетках, что стимулирует образование бета-амилоидных бляшек и формированию нейрофибриллярных клубков [Горина Я.В. и соавт., 2014]. Согласно этим результатам, локальная инсулинорезистентность и изменение центрального метаболизма глюкозы, может служить ранним маркером для диагностики БА [Chen Z., Zhong C., 2014].

Таким образом, локальная инсулинорезистентность в соответствующих регионах головного мозга может быть одной из ключевых причин когнитивных дефицитов при хронической нейродегенерации. [de la Monte S.M., 2014].

В противоположность обилию результатов исследований механизмов дисрегуляции когнитивных функций, практически не изученными являются механизмы реализации сложных форм поведения при БА. В литературе присутствуют лишь отдельные наблюдения о механизмах нарушения сложных форм поведения и эмоционального статуса при этой патологии, тогда как клиническая значимость этих событий не может быть переоценена [Jacus JP., 2017]. У пациентов с БА наблюдаются существенные нарушения запоминания, связанного с эмоциональными ассоциациями, что свидетельствует о вовлеченности миндалины головного мозга в этот процесс.

Интересно, что в последние 2 года появились единичные работы, связанные с изучением роли миндалины головного мозга при инсулинорезистентности, например, применительно к пищевому поведению, а также о молекулярных механизмах эффектов инсулина в этой структуре головного мозга [Areias M.F., Prada P.O., 2015].

Вместе с тем, в расшифровке механизмов развития инсулинорезистентности при хронической нейродегенерации остается много неуточненных моментов, а именно какие молекулярные механизмы нарушаются в инсулин-опосредованной сигнальной трансдукции в клетках нейрональной и глиальной природы в ткани головного мозга при БА, и как они сопряжены с развитием нейровоспаления.

Цель исследования: Изучить молекулярные механизмы развития локальной инсулинорезистентности в миндалевидном теле головного мозга, обусловленные нейровоспалением при моделировании болезни Альцгеймера.

Задачи исследования:

1. Изучить особенности реализации когнитивных функций, в том числе эмоциональной памяти, при моделировании экспериментальной болезни Альцгеймера и у *Nlrp3* нокаутных мышей.

2. Исследовать влияние растворимых олигомеров A β 1-42 на особенности экспрессии и функциональной активности молекул-компонентов инсулинорезистентности (IRAP, GLUT4) в клетках миндалины головного мозга мышей дикого типа.

3. Изучить вклад NLRP3 инфламмасом в прогрессирование нарушений эмоциональной сферы при экспериментальной БА.

4. Определить роль NLRP3 инфламмасом в регуляции экспрессии глюкозного транспортера GLUT4 и IRAP в клетках миндалина головного мозга *Nlrp3* нокаутных мышей.

5. Исследовать вклад нейровоспаления, вызванного действием растворимых олигомеров A β , на передачу сигнала инсулина в головном мозге мышей C57Bl/6 и *Nlrp3* нокаутных мышей.

Научная новизна

Получены новые данные о фундаментальных механизмах развития локальной инсулинорезистентности в ткани головного мозга при БА.

Получены новые данные о механизмах формирования эмоциональной памяти в (пато)физиологических условиях.

Впервые описана роль инфламмасом NLRP3 в формировании локальной инсулинорезистентности при моделировании БА. Полученные данные подтверждают протективный NLRP3-нокаутный фенотип. Отсутствие инфламмасом NLRP3 защищает от развития инсулинорезистентности в головном мозге после инъекции растворимых форм бета-амилоида.

Впервые выявлено, что мыши, нокаутные по *Nlrp3* гену, проявляют частичные нарушения ассоциативного обучения, и запоминания, что свидетельствует о расстройстве в сфере эмоционального поведения. Выявлена роль формирования локального стерильного воспаления, опосредованного NLRP3 инфламмасомами, в процессах запоминания.

Теоретическая значимость исследования

Установлены молекулярные механизмы дизрегуляции эффектов инсулина при болезни Альцгеймера, существенной для формирования нарушений эмоциональной сферы, прогрессии нейровоспаления и нейродегенерации.

Практическая значимость исследования

Установленные молекулярные механизмы формирования локальной инсулинорезистентности в миндалине головного мозга, обусловленные нейровоспалением при экспериментальной БА, могут стать фундаментальной основой при разработке новых фармакологических подходов. Экспериментальное и теоретическое обоснование новых подходов к патогенетической терапии нейродегенерации при болезни Альцгеймера.

Методология и методы исследования

Работа носит экспериментальный характер. Для решения поставленных задач проведено тестирование животных с применением метода «Условно-рефлекторного замирания», иммуногистохимическое исследование срезов головного мозга, иммуноферментный анализ. Объект исследования – мыши,

самцы линии CD1 и C57BL/6, B6.129S6-Nlrp3tm1Bhk/JJ с нокаутированием гена *Nlrp3*; предмет исследования – оценка маркеров инсулинорезистентности, нейровоспаления в экспериментальных группах. Достоверность полученных данных подтверждена методами математической статистики.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Олигомеры амилоида А β , введенные интрацеребрально мышам, приводят к нарушению в эмоциональной сфере, нарушению ассоциативного обучения и запоминания, что свидетельствует о вовлеченности в патологический процесс миндалины головного мозга.

2. В миндалине головного мозга аккумуляция А β , приводит к нарушению экспрессии молекул, ассоциированных с инсулинорезистентностью и нейровоспалением.

3. Базальный уровень экспрессии NLRP3 инфламмасом необходим для процессов запоминания, внутриклеточной транслокации глюкозного транспортера GLUT4 и инсулиновой сигнализации; увеличение экспрессии NLRP3 инфламмасом сопровождается развитием болезни Альцгеймера; подавление экспрессии NLRP3 является протективным по отношению к нейротоксическим эффектам А β .

Степень достоверности результатов

Научные положения и выводы обоснованы и получены с применением системного анализа поставленной проблемы, современных методов патофизиологии, выборкой исследуемых животных в соответствии с основными принципами работы с лабораторными живыми объектами и большим объемом материала, который подвергнут адекватному статистическому анализу.

Внедрение результатов исследования

Результаты исследования внедрены в учебный процесс кафедры биологической химии с курсами медицинской, фармацевтической и токсикологической химии, научный процесс НИИ молекулярной медицины и патобиохимии ФГБОУ ВО «Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Апробация материалов диссертации

Основные результаты работы были доложены на российских и зарубежных конференциях в виде устных и стендовых докладов: XXIII Съезд физиологического общества им. И.П. Павлова, 2017, г. Воронеж; Новые возможности в метаболизме (*Frontiers in Metabolism*), 2017, г. Лозанна,

Швейцария; NeuroFrance 2017, г. Бордо, Франция; 12 Съезд немецкого нейронаучного общества, 2017, г. Геттинген, Германия; Нейронаука для медицины и психологии: XIII Международный Междисциплинарный Конгресс, 2017, Судак, Крым, Россия; Мозг, 2017 (Brain 2017), г. Берлин, Германия.

Публикации по теме диссертации

По материалам диссертации опубликовано 12 печатных работ, в том числе 4 статьи в журналах, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией Министерства образования и науки РФ для публикации материалов диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, 1 учебное пособие.

Объем и структура работы

Диссертация оформлена в соответствии с Национальным стандартом Российской Федерации ГОСТ Р7.0.11-2011. Материал диссертации изложен на 158 страницах машинописного текста, иллюстрирован 30 рисунками. Работа состоит из введения, обзора литературы, глав: материал и методы, результаты собственных исследований, обсуждения, выводов, списка литературы. Список литературы включает 265 источников, в том числе 11 отечественных и 254 зарубежных.

Личный вклад автора

Основные научные результаты по теме исследования получены лично автором. Совместно с научным руководителем определены цели, задачи, объем исследования, его этапы и направления. Соискателем самостоятельно разработаны протоколы и схемы экспериментов, сформированы экспериментальные группы. Участие соискателя в работе представлено в опубликованных трудах. Диссертант провел статистическую обработку и анализ полученного материала, поиск и критический анализ литературы по теме диссертации.

Финансовая поддержка диссертации

Эксперименты в рамках данной диссертационной работы проведены при поддержке грантов:

Грант Президента РФ для государственной поддержки ведущих научных школ РФ 2016-2017 (НШ-10241.2016.7).

Грант Президента РФ для поддержки ведущих научных школ РФ 2018-2019 (НШ-6240.2018.7).

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материал и методы исследования

Исследование выполнялось на базе кафедры биологической химии с курсами медицинской, фармацевтической и токсикологической химии, Научно-исследовательском институте молекулярной медицины и патобиохимии ФГБОУ ВО «Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого» Министерства здравоохранения Российской Федерации. Исследование одобрено локальным этическим комитетом ФГБОУ ВО «КрасГМУ им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого» Минздрава РФ.

Объект исследования: Эксперименты проводились с использованием самцов мышей линии CD1 и C57BL/6 в возрасте 3-4 месяцев, весом 25-30 г, n=7-10 для каждой группы. В ряде экспериментов были использованы животные линии B6.129S6-Nlrp3tm1Bhk/JJ с нокаутированием гена *Nlrp3*: *Nlrp3*^{-/-} или NLRP3 KO, созданные в лаборатории The Jackson Laboratory (USA) на генетическом фоне C57BL/6.

Настоящее исследование состояло из трех блоков:

I. Исследование влияния действия растворимых олигомеров бета-амилоида A β 1-42 на инсулин-регулируемое перемещение глюкозного транспортера

II. Оценка влияния экспрессии NLRP3 (маркера воспаления) в клетках головного мозга на инсулин-регулируемое перемещение глюкозного транспортера

III. Исследование вклада нейровоспаления, вызванного действием растворимых олигомеров A β , на передачу сигнала инсулина.

Дизайн исследования представлен на рисунке 1.

Исследования на животных проводили в соответствии с соблюдением принципов гуманности, изложенных в Директиве Европейского сообщества (2010/63/ЕС).

Для моделирования болезни Альцгеймера использовали протокол моделирования с введением растворимых олигомерных форм амилоида A β 1-42 в гиппокамп мышей. Использовали A β 1-42 (Sigma-Aldrich), который растворяли в стерильном 0,1 М PBS (pH 7,4) и получали раствор в концентрации 50 μ M. A β 1-42 подвергали олигомеризации путем инкубации при 37°C в течение 7 дней перед введением. Полученные олигомеры A β 1-42 вводили интрагиппокампально в CA1 зону с двух сторон с помощью микрошприца (Hamilton) по следующим координатам ML \pm 1,3 мм, в AP - 2,0

мм. DV - 1,9 мм. Объем инъекции 1 мкл A β 1-42 для экспериментальных групп или 1 мкл фосфатно-солевого буфера (PBS) для ложно-оперированных животных осуществляли постепенно (1 мкл/мин) [Epelbaum S., et al., 2015].

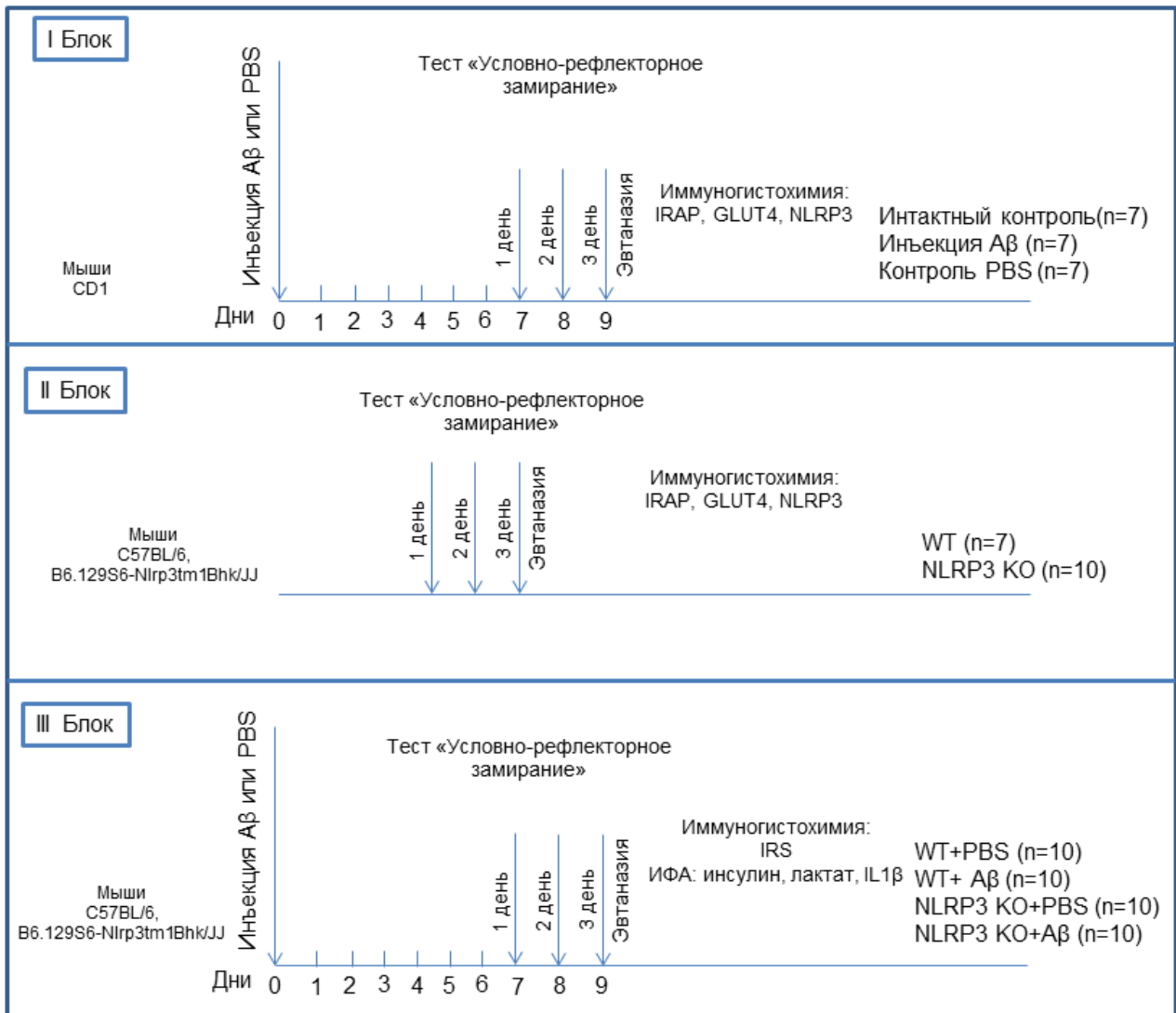


Рисунок 1 – Дизайн эксперимента.

Нейроповеденческое тестирование с целью определения эмоциональной памяти осуществляли с помощью теста «Условно-рефлекторного замирания» (FC), который проводили по стандартной схеме [Shoji H., et al., 2014]. Тест проводили в течение 3 последовательных дней. Первый день заключался в создании условий для замирания (тест условных сигналов), второй день – контекстный тест и третий день – сигнальный тест, связан со стимулом условного замирания. Каждый день поведенческого тестирования был записан с помощью веб-камеры, подсоединенной к компьютеру с программным обеспечением ANY MAZE software (Stoelting Co., USA).

Иммуногистохимическое окрашивание. С помощью транскардиальной перфузии 4% раствором параформальдегида фиксировали головной мозг. Срезы изготавливали толщиной 50 мкм с помощью вибратора (Thermo Scientific) в сагитальном направлении с использованием стереотаксического атласа для определения локализации миндалина головного мозга (базолатеральной миндалины).

Свободно плавающие срезы головного мозга окрасили по стандартному протоколу двойного/тройного мечения методом иммуногистохимии.

Для изучения маркеров инсулинорезистентности и метаболизма глюкозы оценивали экспрессию GLUT4, IRAP, p-IRS-Ser. Исследование нейровоспаления проводили детекцию NLRP3 инфламмасом. Изображения были сделаны с объективом 60× на конфокальном флуоресцентном микроскопе (Olympus FluoView) и обрабатывались с использованием программного обеспечения Olympus FluoView software (Ver.4.0a). Подсчет вели в поле зрения в миндалевидном теле головного мозга (базолатеральная миндалина), определяли количество клеток, одновременно экспрессирующих два исследуемых маркера. В полученных результатах описывали экспрессию белка. В некоторых экспериментах определяли интенсивность свечения в пикселях и для определения колокализации определяли коэффициент перекрытия по Manders, который указывает на перекрытие сигналов и, таким образом, отражает истинную степень колокализации. Значения коэффициента находятся в диапазоне от 0 до 1,0. Расчет коэффициента проводился с использованием программы Olympus FluoView software (Ver.4.0a).

Окраска с тиофлавином S для детекции олигомеров A β проводилась для детекции бета-складчатой структуры белков, таких как амилоидные олигомеры [Ly P.T., et al., 2011].

Иммуноферментный анализ проводили с целью определения концентрации инсулина (Mouse Ultrasensitive Insulin ELISA 96 tests (80-INSMSU-E01); определение лактата проводили согласно протоколу, представленному в наборе: L-Lactate Assay Kit (Colorimetric/Fluorometric); для определения IL-1 β использовали набор: IL-1 beta Mouse ELISA Kit 96 tests (KMC0011).

Статистическая обработка данных. Статистический анализ полученных результатов включал методы описательной статистики с использованием программы GraphPad Prism7 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA). В пределах каждой выборки определяли среднее арифметическое и ошибку среднего.

Критерий Колмогорова-Смирнова использовали для оценки нормальности распределения.

При несоблюдении условий нормальности распределения сравнение двух групп осуществляли с помощью непараметрического U критерия Манна-Уитни. При сравнении трех групп применяли непараметрический аналог однофакторного дисперсионного анализа (one-way ANOVA) с использованием критерия Краскела — Уоллиса с последующим множественным сравнением по критерию Данна. Для оценки влияния двух факторов (*Генотип* × *Операция*), (*Генотип* × *Стимул*), (*Генотип* × *Время*), (*Группа* × *Время*) применяли двухфакторный ANOVA (*two-way ANOVA*). Последующее попарное сравнение групп проводили с помощью *post-hoc* Sidak's теста множественных сравнений.

Уровень значимости при проверке гипотез принимали $p \leq 0,05$. Все результаты представлены в виде $M \pm SE$, где M – среднее значение, SE – ошибка среднего, p – уровень значимости.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты исследование влияния действия растворимых олигомеров Аβ1-42 эмоциональную память и на инсулин-регулируемое перемещение глюкозного транспортера

В первый день тестирования, когда подается белый шум (условный раздражитель) и электрический сигнал (безусловный раздражитель), процент времени замирания достоверно не отличался у животных экспериментальной группы с введением Аβ, ложно-оперированных мышей и мышей контрольной группы ($p=0,66$, непараметрический дисперсионный анализ с использованием критерия Краскела-Уоллиса).

Был зафиксирован во второй контекстный день статистически достоверно меньший процент замирания у экспериментальной группы после инъекции Аβ ($17,64 \pm 2,45\%$) по сравнению с группой контрольных мышей ($29,14 \pm 3,02\%$) ($p=0,0387$, критерий Данна), а также при сравнении с группой ложного контроля ($31,99 \pm 4,04\%$) ($p=0,0106$, критерий Данна). В третий день тестирования (сигнальный), когда создаются новые условия в испытательной камере и осуществляется подача белого шума, но без электрического сигнала, были выявлены статистически значимые различия во времени замирания между группами контрольных интактных животных ($38,59 \pm 3,29\%$) и животных с введением Аβ ($27,8 \pm 1,48\%$) ($p=0,0253$), а также статистически значимые различия между группой с введением PBS ($40,11 \pm 2,39\%$) и инъекцией Аβ

($27,8 \pm 1,48\%$) ($p=0,0008$, критерия Данна). Таким образом, инъекция растворимых форм А β приводит к нарушениям ассоциативного обучения и запоминания у животных, а именно существенно подавляется процесс консолидации памяти страха (Рисунок 2).

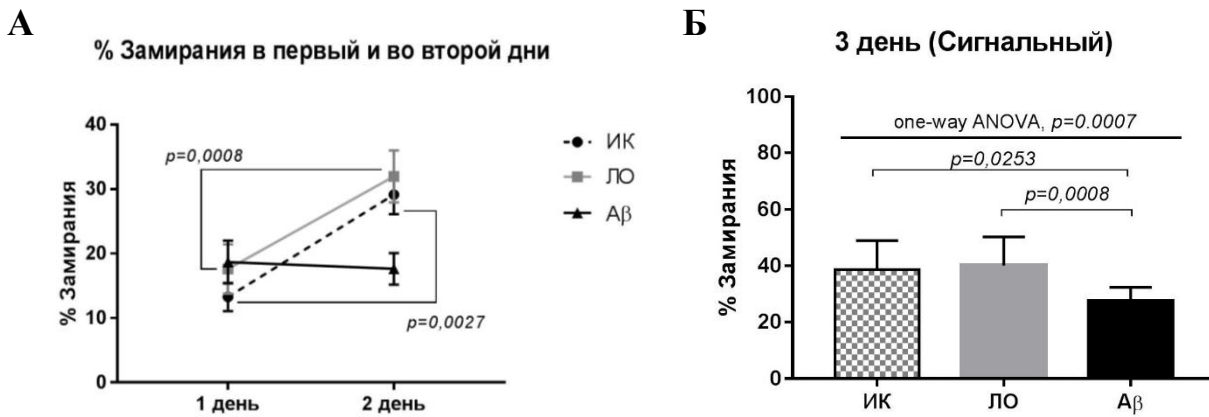


Рисунок 2 – Результаты теста «Условно-рефлекторного замирания»: изменение во времени замирания у мышей с экспериментальной БА. (А) – Сравнение замирания в первый и второй дни тестирования: увеличение времени замирания в группе контрольных мышей во второй день по сравнению с первым днем ($p=0,0027$, Sidak's критерий); увеличение времени замирания в группе с проведением ложной операции во второй день по сравнению с первым днем ($p=0,0008$, Sidak's критерий). (Б) – % замирания в третий день тестирования (сигнальный). Статистически значимые отличия между группами ($p=0,0007$, Критерий Краскела-Уоллиса, множественные сравнения с использованием критерия Данна). ИК – интактный контроль (CD1), ЛО – ложная операция (CD1+PBS), А β – инъекция бета-амилоида 1-42 (CD1+А β).

При изучении паттерна экспрессии GLUT4 и IRAP маркеров при моделировании БА было выявлено статистически значимое снижение количества клеток, экспрессирующих одновременно IRAP и GLUT4. При экспериментальной БА количество GLUT4/IRAP+ клеток в поле зрения было $9,34 \pm 1,03$ по сравнению мышами после введения фосфатно-молевого буфера ($23,09 \pm 2,01$) ($p < 0,0001$, U критерий Манна-Уитни)

Однако, общее количество клеток, экспрессирующих IRAP в базолатеральной миндалине после инъекции А β , увеличивалось. Таким образом, инъекция олигомеров А β в гиппокамп мышей приводит к значимому снижению GLUT4 в миндалине головного мозга, но не IRAP.

При изучении экспрессии маркера IRAP в нейронах не выявлено статистически значимого изменения количества IRAP/NeuN+ клеток после введения А β ($13,47 \pm 4,1$) по сравнению с проведением ложной операции ($21,75 \pm 3,25$) ($p=0,14$) (U критерий Манна-Уитни). Тем не менее, при определении коэффициента перекрытия по Manders в полях зрения было отмечено, что интенсивность IRAP при моделировании БА была выше

($0,49 \pm 0,055$) по сравнению с ложно-оперированными животными ($0,32 \pm 0,05$) ($p=0,0411$) (U критерий Манна-Уитни) (Рисунок 3А).

При исследовании количества GFAP+ астроцитов, экспрессирующих инсулин-зависимую аминопептидазу IRAP, определили, что у мышей с инъекцией A β также не отмечается статистически достоверного снижения таких клеток и составляет в поле зрения $9,6 \pm 4,5$, у мышей с ложной операцией – $19,41 \pm 4,2$ клеток экспрессируют одновременно GFAP/IRAP ($p=0,13$) (U критерий Манна-Уитни). Однако, аналогично экспрессии в нейронах, при изучении коэффициента перекрытия по Manders в астроцитах выявили, что он был статистически значимо выше у мышей после инъекции A β ($0,38 \pm 0,07$) по сравнению с контрольными мышами ($0,18 \pm 0,06$) ($p=0,0478$) (U критерий Манна-Уитни) (Рисунок 3Б).

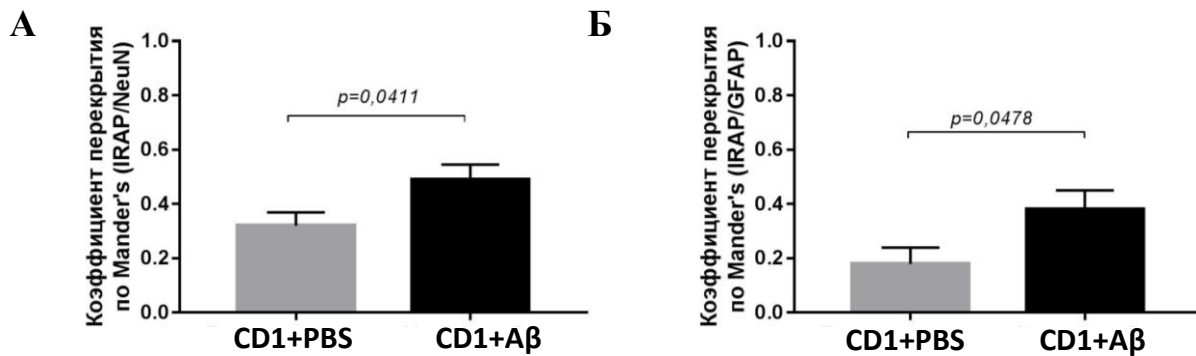


Рисунок 3 – Экспрессия IRAP в клетках нейрональной и астроглиальной природы при экспериментальной БА: коэффициент перекрытия сигналов по Manders. (А) – при наложении сигналов от IRAP и NeuN; (Б) – при наложении сигналов от IRAP и GFAP. * – $p < 0,05$. U критерий Манна-Уитни. CD1+PBS – группа ложного контроля; CD1+A β – группа с инъекцией A β .

При иммуногистохимическом исследовании выявили, что инъекция A β приводит к увеличению количества зрелых нейронов, колокализованных с NLRP3, в миндаине головного мозга ($34,90 \pm 4,03$) в сравнении с ложно-оперированными животными ($19,09 \pm 2,01$) ($p=0,0043$) (U критерий Манна-Уитни) (Рисунок 17А-В) (Рисунок 4).

Таким образом, в текущем исследовании было показано, что инъекция A β в дорсальный гиппокамп приводит к изменениям, ассоциированным с миндалиной. А именно бета-олигомеры вызвали нарушения в этапах формирования памяти (консолидации, хранения и извлечения), что сопровождалось снижением экспрессии инсулин-зависимого глюкозного переносчика GLUT4 и увеличении инсулин-регулируемой аминопептидазы IRAP в зрелых нейронах и активированных астроцитах. Кроме того, инъекция бета-олигомеров сопровождалась гиперэкспрессией NLRP3 инфламмасом в

нейронах. Полученные данные подтверждают, что нейродегенерация ассоциирована с развитием локальной инсулинорезистентности и нейровоспаления, что приводит к когнитивному дефициту.

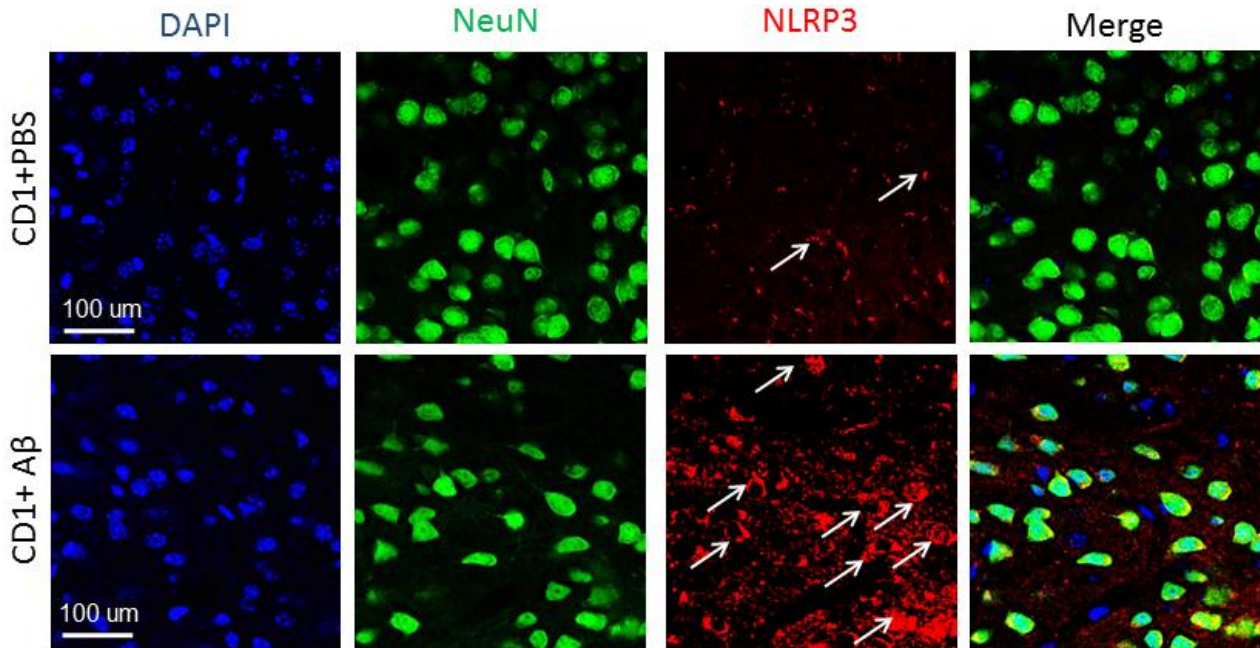


Рисунок 4 – Экспрессия NLRP3 в зрелых нейронах базолатеральной миндалины головного мозга мышей с экспериментальной БА. Тройное иммунофлуоресцентное окрашивание: ядра клеток – DAPI (синий), экспрессия NeuN (зеленый), экспрессия NLRP3 (красный), наложение сигналов (Merge). Масштабная шкала – 100мкм.

Результаты изучение роли *Nlrp3* (локального воспаления) в реализации эмоциональной памяти и инсулин-регулируемой транслокации глюкозного транспортера

Интересным и не описанным до этого результатом стало то, что *Nlrp3* нокаутные мыши замирали в каждый день тестирования достоверно меньше по сравнению с группой контрольных мышей. В связи с этим было исследовано поведение мышей с течением времени в каждый тестируемый день. В первый день тестирования можно оценить приобретение памяти с течением времени, анализируя изменение времени замирания от предъявления первой пары стимулов CS-US1 и третьей CS-US3. Так показано, что процент замирания у NLRP3 KO мышей не отличается при сравнении CS-US1 ($19,5 \pm 4,38\%$) и CS-US3 ($32,45 \pm 6,8\%$) ($p=0,66$, Sidak's критерий), что, вероятно, можно интерпретировать как нарушение приобретения ассоциированного с шумом страха (Рисунок 5).

Во второй день было отмечено статистически значимое влияние генотипа ($F(1,50) = 36,74, p < 0,0001$), и времени ($F(4,50) = 3,59, p = 0,0073$) (двухфакторный ANOVA). В третий день тестирования мыши контрольной группы замирают дольше до предъявления стимула ($61,74 \pm 5,31\%$) по сравнению с *Nlrp3* нокаутными мышами ($35,72 \pm 8,7\%$) ($p = 0,0151$, Sidak's критерий).

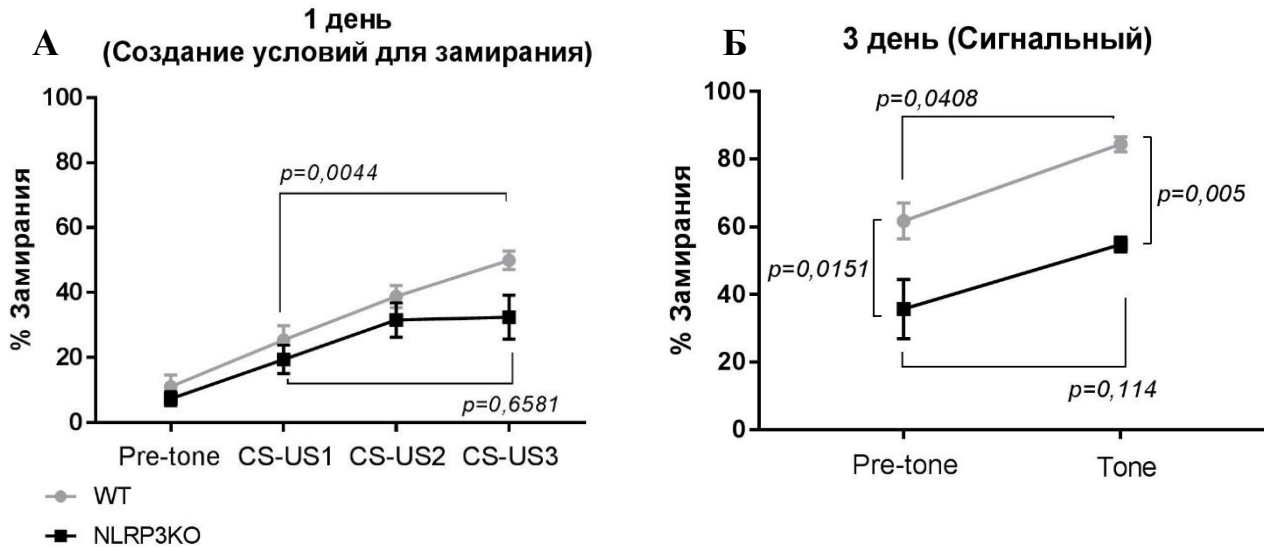


Рисунок 5 – Результаты теста «Условно-рефлекторного замирания» у мышей с обычной и выключенной экспрессией NLRP3. (А) – % замирания в первый день тестирования (создания условий для замирания). Pre-tone – до предъявления стимулов; CS-US1-3 – комбинация условного и безусловного стимула (CS – conditioned stimulus, условный стимул; US – unconditioned stimulus, безусловный стимул). (Б) – % замирания в третий день тестирования (сигнальный). Pre-tone – до предъявления условного стимула; Tone – после предъявления условного стимула. WT – группа контрольных мышей, NLRP3KO – NLRP3 нокаутные мыши.

После предъявления стимула в группе нокаутных животных различия во времени замирания зафиксировано не было: время до предоставления слухового стимула в новом контексте составило ($35,72 \pm 8,7\%$), после – ($54,8 \pm 2,16\%$) ($p = 0,11$, Sidak's критерий).

При выполнении иммуногистохимии с использованием анти-GFAP-антител и конфокальной микроскопии наблюдалось снижение количества астроцитов у NLRP3 KO мышей (Рисунок 6). Зафиксировали снижение положительных клеток GFAP ($184,8 \pm 11,54$ клеток/ мм^2 в базолатеральной миндалине NLRP3 KO мышей и $418,3 \pm 20,34$ клеток/ мм^2 в контроле, $p < 0,001$, *U* критерий Манна-Уитни). Также было отмечено, что морфология астроцитов была значительно изменена в мозге у *Nlrp3* нокаутных мышей. С помощью качественного анализа было отмечено, что астроцитарные отростки, исходящие из тела, менее ветвящиеся в экспериментальной группе NLRP3 KO группе по

сравнению с контрольными мышами. Длина отростков в астроцитах у NLRP3 КО мышей также была короче по сравнению с контрольными мышами дикого типа (Рисунок 6).

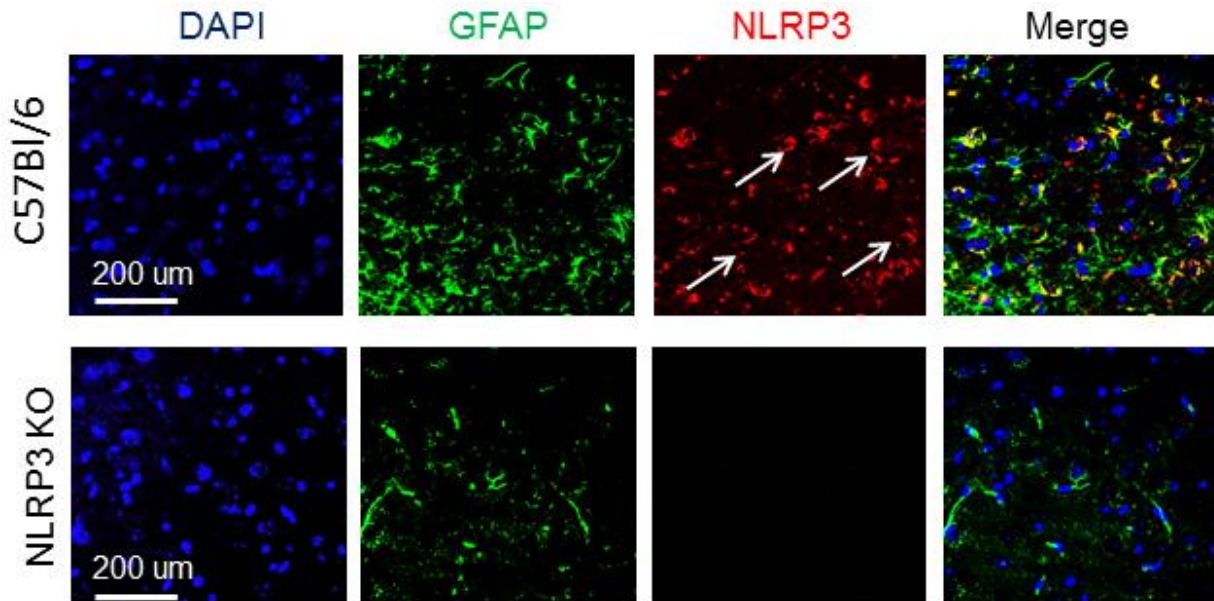


Рисунок 6 – Экспрессия NLRP3 инфламмасом в базолатеральной миндалине головного мозга мышей. Тройное иммунофлуоресцентное окрашивание: ядра клеток – DAPI (синий), экспрессия GFAP (зеленый), экспрессия NLRP3 (красный), наложение сигналов (Merge). Масштабная шкала – 200мкм. C57Bl/6 – группа контрольных мышей (WT), NLRP3KO – *Nlrp3* нокаутные мыши.

Также следует отметить, что было подтверждено, что *Nlrp3* нокаутные мыши не экспрессируют NLRP3, что проявлялось отсутствием иммуносигнала при окрашивании, в то время как у животных дикого типа обнаружена экспрессия NLRP3. Ранее мы подтвердили экспрессию NLRP3 в клетках нейрональной и астроглиальной природы в группе контрольных мышей [Черных А.И., 2018].

Полученные данные при анализе колокализации маркеров GLUT4/IRAP указывают на статистически достоверное снижение клеток, которые одновременно экспрессируют GLUT4/IRAP у *Nlrp3* нокаутных мышей ($8,5 \pm 1,75$) по сравнению с контрольными животными дикого типа ($29,75 \pm 3,18$) ($p < 0,0001$, *U* критерий Манна-Уитни) (Рисунок 7).

При определении колокализации IRAP/NeuN выявили, что у мышей, не экспрессирующих NLRP3, отмечается статистически значимое снижение количества зрелых нейронов, экспрессирующих инсулин-зависимую аминопептидазу ($2,05 \pm 0,30$) по сравнению с этим же показателем в группе контрольных мышей ($28,25 \pm 4,10$) ($p < 0,0001$) (*U* критерий Манна-Уитни).

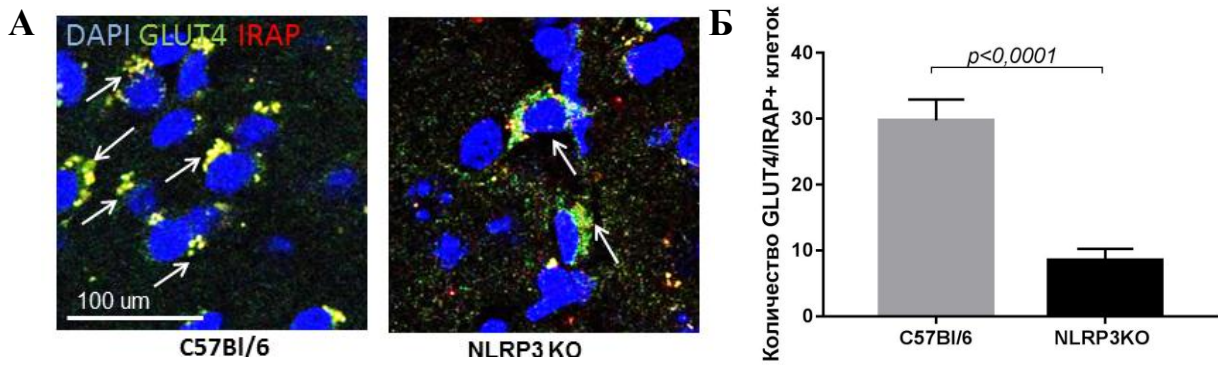


Рисунок 7 – Экспрессия IRAP и GLUT4 в базолатеральной миндалине головного мозга мышей. (А) – Тройное иммунофлуоресцентное окрашивание: ядра клеток – DAPI (синий), экспрессия GLUT4 (зеленый), экспрессия IRAP (красный), наложение сигналов (Merge). Масштабная шкала – 200мкм. **(Б)** – Количество GLUT4/IRAP+ клеток. C57Bl/6 – группа контрольных мышей (WT), NLRP3KO – *Nlrp3* нокаутные мыши.

В GFAP+ астроцитах было также зафиксировано статистически достоверное снижение экспрессии IRAP в группе *Nlrp3* нокаутных мышей ($2,64 \pm 0,35$) по сравнению с мышами дикого типа ($13,6 \pm 2,16$) ($p = 0,0003$) (*U* критерий Манна-Уитни).

Таким образом, было показано, что у *Nlrp3* нокаутных животных нарушен процесс приобретения памяти в первый день создания условий для замирания и этап извлечения памяти, тестируемый в третий сигнальный день, что сопровождалось снижением экспрессии GLUT4. Однако у *Nlrp3* нокаутных мышей сохранена генерализация контекста во второй день тестирования, что, возможно, объясняется подавленным уровнем экспрессии IRAP. Также экспрессия NLRP3 необходима для формирования нормальной морфологии астроцитов.

Исходя из полученных данных, можно предположить, что формирование локального стерильного воспаления сопровождается процессы запоминания.

Результаты исследования вклада нейровоспаления, вызванного действием растворимых олигомеров Аβ, на передачу сигнала инсулина и эмоциональную память

Было изучено формирование памяти, ассоциированной со страхом (условно-рефлекторной) у мышей NLRP3KO, которым с целью моделирования нейродегенерации вводили Аβ интрагиппокамально. С помощью данного эксперимента оценивали роль NLRP3 инфламмасом при БА. В первый день тестирования мы отметили статистически значимое влияние генотипа ($F(1,29)$

= 8,095, $p=0,0081$), и операции ($F(1,29) = 5,72$, $p=0,0235$) (двухфакторный ANOVA) (Рисунок 8).

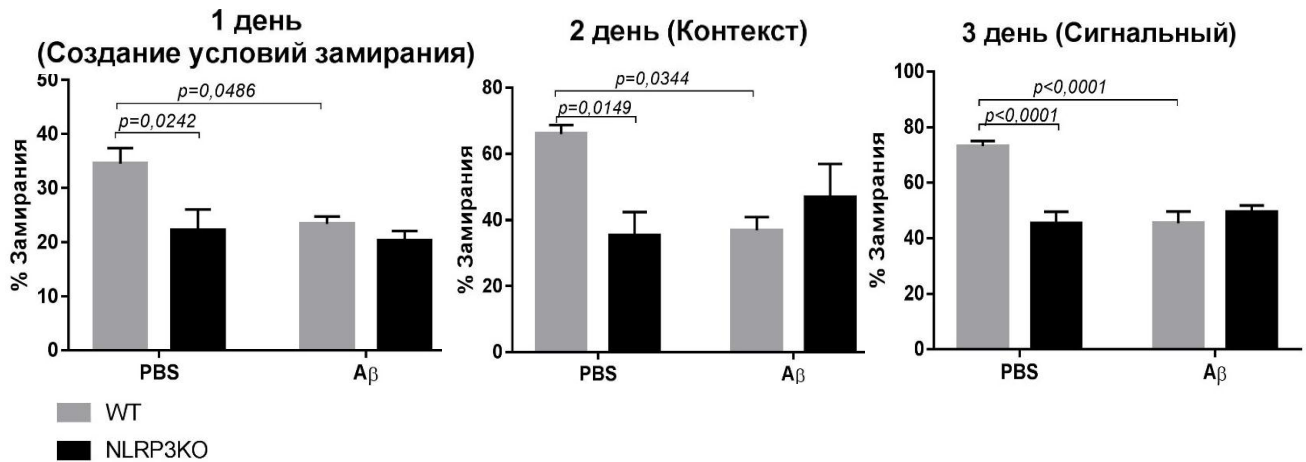


Рисунок 8 – Результаты теста «Условно-рефлекторного замирания»: изменение во времени замирания в разные дни тестирования у NLRP3 нокаутных мышей с экспериментальной БА. WT – группа контрольных мышей линии C57Bl/6, NLRP3KO – *Nlrp3* нокаутные мыши, PBS – мыши с проведением ложной операции с инъекцией фосфатно-солевого буфера PBS, Aβ – мыши с инъекцией олигомеров бета-амилоида 1-42.

Во второй день было отмечено статистически значимое влияние взаимодействия двух факторов (генотипа и операции) в реакции замирания у мышей NLRP3 KO и контрольных мышей во время тестирования ($F(1,30)=8,631$, $p=0,0063$) (двухфакторный ANOVA). На третий день тестирования при предъявлении стимула в условиях новой среды у контрольной группы мышей WT и у NLRP3KO мышей было замирание в ответ на слуховой стимул в новом контексте. Было отмечено статистически значимое влияние двух факторов (генотипа и операции) у мышей NLRP3 KO и WT с введением Aβ и PBS ($F(1,32)=22,03$, $p<0,0001$, двухфакторный ANOVA).

Весьма интересной является находка, что введение Aβ мышам, нокаутным по гену *Nlrp3*, не приводит к изменению времени замирания по сравнению с группой соответствующего контроля. При этом у *Nlrp3* нокаутных мышей наблюдается свойственная консолидации памяти генерализация контекста. На основании полученных экспериментальных данных можно заключить, что нокаут *Nlrp3* обладает протекторным действием в ответ на повреждающее действие олигомеров Aβ1-42.

При исследовании влияния инъекции Aβ на экспрессию патологического субстрата к инсулиновому рецептору (IRS), фосфорилированному по серину, было установлено статистически значимое влияние взаимодействия двух факторов на экспрессию pIRS-Ser ($F(1,16)=17,32$, $p=0,0007$, двухфакторный ANOVA). Также значимым было влияние операции ($F(1,16)=25,38$, $p=0,0001$) и

генотипа ($F(1,16)=5,81$, $p=0,028$) (Рисунок 9). Это подтверждает участие олигомеров в формировании локальной инсулинорезистентности в головном мозге.

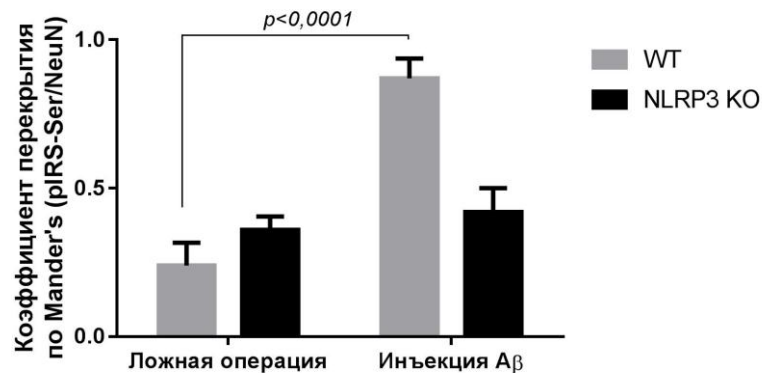


Рисунок 9 – Экспрессия pIRS-Ser в нейронах головного мозга экспериментальных животных: коэффициент перекрытия по Mander's (pIRS-Ser/NeuN) в исследуемых группах. WT – группа контрольных мышей, NLRP3KO – *Nlrp3* нокаутные мыши. Двухфакторный ANOVA с последующим множественным сравнением с помощью критерия Sidak's.

При сравнении групп не выявлено влияния взаимодействия двух факторов (генотипа и операции) ($F(1,28)=0,0024$, $p=0,9615$), влияние генотипа ($F(1,28)=0,0027$, $p=0,9590$) и операции ($F(1,28)=0,0115$, $p=0,9155$) незначимы. Исследуя уровень инсулина после введения Аβ контрольным мышам наблюдалась тенденция к увеличению инсулина ($0,345\pm 0,075$ нг/мг белка) по сравнению с ложно-оперированными мышами ($0,185\pm 0,051$ нг/мг белка) ($p=0,32$, Sidak's критерий). Инъекция Аβ *Nlrp3* нокаутным мышам не влияет на концентрацию инсулина в головном мозге ($0,125\pm 0,082$ нг/мг белка) по сравнению с ложно-оперированными мышами ($0,2\pm 0,082$ нг/мг белка) ($p=0,84$, Sidak's критерий).

В данном исследовании определили концентрацию ILβ в миндалях и выявили статистически значимое влияние взаимодействия двух факторов (генотипа и операции) – $F(1,28)=5,171$, $p=0,0308$. При исследовании уровня IL1β во всех группах *Nlrp3* нокаутных животных были определены следовые количества IL1β. При множественном сравнении выявлено является увеличение экспрессии IL1β в миндалях головного мозга в группе контрольных животных при моделировании БА ($43,6\pm 8,84$ пг/мг белка) по сравнению с ложно-оперированными мышами ($21,52\pm 4,2$ пг/мг белка) ($p=0,0174$, Sidak's критерий).

Таким образом, показано, что развитие воспаления в ткани головного мозга при нейротоксическом действии Аβ связано, по всей видимости, с формированием NLRP3-инфламмосом, гиперпродукцией провоспалительного

интерлейкина 1 в миндаляне головного мозга, что в конечном итоге может приводить к нарушению процессов, ассоциированных с реализацией когнитивных функций.

Полученные данные текущего исследования позволили дополнить схемы патогенеза болезни Альцгеймера и роли нейровоспаления (Рисунок 10).

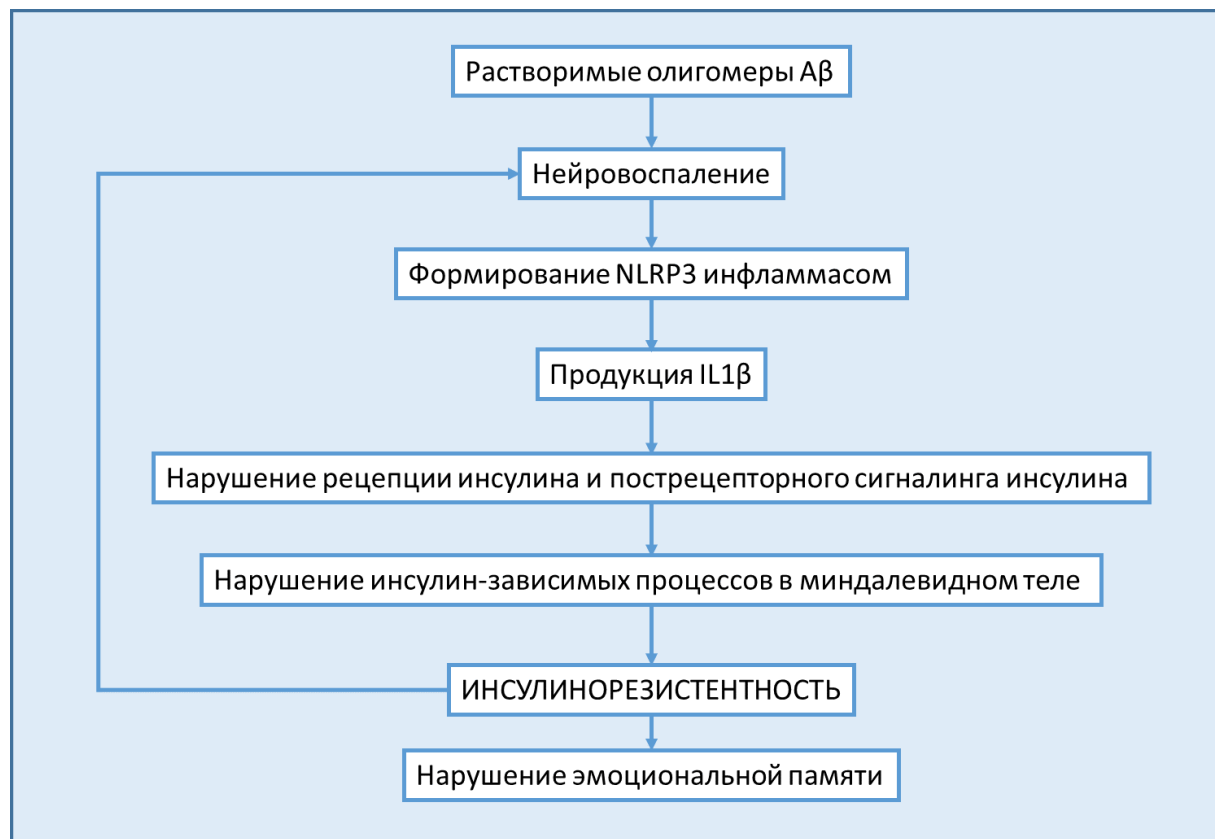


Рисунок 10 – Особенности развития локальной инсулинорезистентности при болезни Альцгеймера в эксперименте.

С помощью экспериментального подхода моделирования болезни Альцгеймера исследованы новые молекулярные механизмы дисрегуляции инсулиновой сигнализации в миндаляне головного мозга во взаимосвязи с процессами нейровоспаления и нарушениями эмоциональной сферы. Установлено, что экспериментальная БА сопровождается нарушением экспрессии и функциональной активности молекул-компонентов инсулин-опосредованных сигнальных путей и развитием инсулинорезистентности на фоне активации процесса нейровоспаления, в ткани миндаляны головного мозга. Этот каскад патологических реакций находит свое отражение в расстройстве эмоционального поведения. Продемонстрированы NLRP3-зависимые механизмы в миндаляне головного мозга в норме и при развитии нейродегенерации. Экспериментально доказано, что предотвращение развития локальной инсулинорезистентности за счет блокирования NLRP3 инфламмасом и опосредованного ими и нейровоспаления следует считать патогенетически

обоснованным подходом к коррекции нарушений эмоциональной сферы при БА. Изученные молекулярные механизмы, связывающие развитие локальной инсулинорезистентности с нейровоспалением (с участием pIRS, GLUT4, IRAP, NLRP3) и нарушениями когнитивной и эмоциональной сферы, открывает новые возможности для профилактики и коррекции нейродегенерации при болезни Альцгеймера.

ВЫВОДЫ

1. Развитие экспериментальной болезни Альцгеймера из-за повреждающего действия олигомеров A β сопровождается нарушением ассоциативного обучения и запоминания, что проявляется снижением времени замирания в второй контекстный день: после инъекции A β (17,64 \pm 2,45%) по сравнению с группой контрольных мышей (29,14 \pm 3,02%) ($p=0,0387$), при сравнении с группой ложного контроля (31,99 \pm 4,04%) ($p=0,0106$), а также значительным снижением времени замирания в третий сигнальный день: у мышей с введением A β (27,8 \pm 1,48%) по сравнению контрольными интактными животными (38,59 \pm 3,29%) ($p=0,0253$), а также с группой с введением PBS (40,11 \pm 2,39%) ($p=0,0008$), что свидетельствует о вовлеченности в патологический процесс миндалевидного тела головного мозга.

2. Растворимые олигомеры A β приводят к снижению количества клеток, экспрессирующих инсулин-зависимый переносчик глюкозы GLUT4, локализованного с IRAP (9,34 \pm 1,03 клеток в поле зрения при моделировании БА), по сравнению с ложно-оперированными животными (23,09 \pm 2,01) ($p<0,0001$), при этом отмечается увеличение интенсивности экспрессии инсулин-зависимой аминопептидазы в клетках нейрональной природы при моделировании болезни Альцгеймера (0,49 \pm 0,055) по сравнению с ложно-оперированными животными (0,32 \pm 0,05) ($p=0,0411$), что указывает на развитие локальной инсулинорезистентности в миндалевидном теле головного мозга.

3. Мыши, нокаутные по *Nlrp3* гену, проявляют частичные нарушения ассоциативного обучения, поскольку время замирания в третий сигнальный день тестирования до предъявления шума (35,72 \pm 8,7%) не отличалось статистически значимо от времени замирания после его предоставления (54,8 \pm 2,16%) ($p=0,11$), что свидетельствует о расстройстве в сфере эмоционального поведения. В связи с этим формирование локального стерильного воспаления, опосредованного NLRP3 инфламмосомами сопровождается процессами запоминания.

4. Устранение NLRP3-ассоциированных событий провоспалительного характера в миндалевидном теле головного мозга не является индифферентным для инсулиновой сигнализации и сопровождается снижением количества клеток, экспрессирующих одновременно GLUT4 и IRAP, ($8,5 \pm 1,75$) по сравнению с контрольными животными дикого типа ($29,75 \pm 3,18$) ($p < 0,0001$); сокращением числа зрелых нейронов, экспрессирующих IRAP ($2,05 \pm 0,30$) по сравнению с группой контрольных мышей ($28,25 \pm 4,10$) ($p < 0,0001$), снижением количества GFAP-позитивных астроцитов, колокализованных с IRAP ($2,64 \pm 0,35$) по сравнению с мышами дикого типа ($13,6 \pm 2,16$) ($p = 0,0003$).

5. Подавление нейровоспаления за счет предотвращения экспрессии инфламмасом *Nlrp3* у нокаутных животных имеет протективное значение при развитии болезни Альцгеймера, сопровождаемых инсулинорезистентностью, за счет модуляции экспрессии pIRS-Ser, проявляющейся неизменным коэффициентом колокализации при введении олигомеров A β ($0,42 \pm 0,18$) по сравнению с введением PBS ($0,36 \pm 0,1$) ($p > 0,05$), а также следовым количеством уровня IL1 β в миндалевидном теле головного мозга в группе с моделированием болезни Альцгеймера и ложной операцией.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ
Публикации в журналах, рекомендованных ВАК Министерства образования
и науки РФ для публикации материалов диссертаций
на соискание ученой степени кандидата наук

1. Горина Я.В., Комлева Ю.К., Лопатина О.Л., Волкова В.В., Черных А.И., Шабалова А.А., Семенчуков А.А., Оловяникова Р.Я., Салмина А.Б. Батарея тестов для поведенческого фенотипирования стареющих животных в эксперименте // Успехи геронтологии.- 2017.- №1. - С.49-55. (**Журнал перечня ВАК, журнал МБД Scopus №876**).

2. 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. - №4 (16). - С.106-115. (**Журнал перечня ВАК №103, журнал МБД WoS №328**).

3. Горина Я.В., Лопатина О.Л., Комлева Ю.К., Черных А.И., Салмина А.Б. Экспрессия MAPK и инфламмасом в клетках головного мозга при экспериментальной болезни Альцгеймера // Анналы клинической и

экспериментальной неврологии. - 2017. - №4 (11). - С.45-51. (**Журнал перечня ВАК №60**).

4. Горина Я.В., Иптышев А.М., Лопатина О.Л., Комлева Ю.К., Черных А.И., Салмина А.Б. Анализ пространственной памяти у NLRP3-нокаутных животных // Сибирское медицинское обозрение. - 2017. - № 6. - С.50-56. (**Журнал перечня ВАК №2124**).

Статьи из базы данных РИНЦ

Черных А.И., Комлева Ю.К., Горина Я.В., Лопатина О.Л., Пащенко С.И., Салмина А.Б. Провоспалительный фенотип периваскулярной астроглии и CD133+-клеток-предшественников эндотелиоцитов при моделировании болезни Альцгеймера у мышей // Фундаментальная и клиническая медицина. - 2018. - 3(1). - С.6-15.

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ

БА – Болезнь Альцгеймера

A β – бета-амилоид

CA1 – зона гиппокампа, Аммонов рог

CS (conditioned stimulus) – условный раздражитель

DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) – краситель для ядер клеток

FC (Fear conditioning) – Тест «Условно-рефлекторного замирания»

GFAP – глиальный кислый фибриллярный белок

GLUT4 – глюкозный транспортёр тип 4, инсулинзависимый белок-переносчик глюкозы

IL1 β – интерлейкин 1 β

IRAP (Insulin-regulated aminopeptidase) – инсулин-регулируемая аминопептидаза

IRS-1,2 – субстраты инсулинового рецептора

NeuN-позитивных зрелых нейронах

NLRP3 – NOD-подобное семейство рецепторов, пириновый домен, содержащий 3

NLRP3 KO – мыши, нокаутные по гену *Nlrp3*

p IRS-Ser – субстрат инсулинового рецептора, фосфорилированный по серину

PAMPs/DAMPs – патоген- / ассоциированные с опасностью молекулярные структуры

PBS – фосфатно-солевой буфер

US (unconditioned stimulus) – безусловный стимул

WT – мыши дикого типа